

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES

ESTUDO DO EFEITO VASORRELAXANTE E HIPOTENSOR DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Polygala paniculata* L. EM
RATOS

CURITIBA
2008

KELLY CRISTINA NOGUEIRA SOARES

ESTUDO DO EFEITO VASORRELAXANTE E HIPOTENSOR DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Polygala paniculata* L. EM
RATOS

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o curso de Pós-Graduação em Farmacologia e apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lia Rieck

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cândida Aparecida Leite Kassuya

CURITIBA
2008

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos em busca do conhecimento e realização pessoal.

À minha família, pelo amor e incentivo e por estar presente no decorrer de todo este trabalho.

À professora orientadora Lia Rieck e à professora co-orientadora Cândida Aparecida Leite Kassuya, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos e ao professor Moacir G. Pizzolatti e seus alunos, pela preparação do extrato e isolamento dos compostos.

Ao meu marido, Fabio Antoniel dos Reis, pelo seu grande companheirismo, incentivo e compreensão demonstrados em todos os momentos desta jornada.

À Fernanda da Rocha Lapa, Yanna Dantas Rattmann e à Sandra Crestani, pela parceria e amizade no decorrer deste estudo.

À Faculdade Guairacá, pelo imenso apoio e ensinamentos que contribuíram decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Farmacologia da UFPR, pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.

Posso todas as coisas em Deus que me fortalece.

Filipenses 4:13

RESUMO

A *Polygala paniculata* L. é uma planta que cresce na costa Atlântica brasileira. É utilizado pela população para o tratamento de doenças respiratórias, problema renal, dor de estômago e diarreia. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides que já foram identificados e isolados da *Polygala paniculata* L. Neste estudo, avaliamos os efeitos do extrato bruto hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) *in vitro*, em aorta isolada de rato e *in vivo* em ratos normotensos anestesiados. Para isso ratos *Wistar* foram mortos, a aorta torácica isolada e seccionada em anéis, os quais foram acondicionados por meio de hastes metálicas em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit aerada com carbogênio. As preparações foram submetidas a uma tensão de 1g para o registro das concentrações isométricas por meio de transdutores de força. O EHPP nas concentrações de 300, 500 e 1000 µg/ml, promoveu relaxamento vascular de (3,7 ± 1,9 %; 8,3 ± 3,1 %; 39,5 ± 3,2 %, respectivamente) em aorta com endotélio íntegro, previamente contraído por fenilefrina (1 µM). O efeito vasorrelaxante foi abolido pela incubação prévia dos inibidores da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (10 µM; 0,2 ± 0,1 %) e ODQ (2,2 ± 1,6 %). A exposição dos anéis de aorta ao tetraetilamônio (10 mM; um bloqueador não seletivo de canais de K⁺) resultou em uma inibição parcial do relaxamento vascular induzido pelo EHPP. Na investigação da participação dos receptores muscarínicos, foi utilizada a atropina (1µM), que não modificou o relaxamento vascular promovido pelo EHPP. Na investigação *in vivo*, ratos normotensos foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg) via intramuscular para a canulação da veia femoral e artéria carótida. Através da veia femoral foram administrados inibidores e antagonistas, através da artéria carótida foi mensurada continuamente a pressão arterial. A administração via oral de EHPP (30, 100 e 300 mg/kg) apresentou a redução máxima da pressão arterial média (PAM) em 17,4 ± 1,98; 23,5 ± 2,7, e 27,1 ± 2,8 mmHg, respectivamente. A hipotensão causada pelo EHPP (100 mg/kg, v.o.) foi reduzida quando os animais foram infundidos com L-NAME (um inibidor do óxido nítrico sintase, 7 mg/kg/min) ou com azul de

metileno (um inibidor de guanilato ciclase, 150 nmol/kg/min). Porém, o tratamento com atropina (5 mg/kg, s.c.) e com TEA (360 µmol/kg, i.v.), não interferiu no efeito hipotensor do EHPP 100 mg/kg (v.o.). A administração via endovenosa da rutina, o composto majoritário do EHPP, promoveu redução da PAM em $29 \pm 2,8$ mmHg para a dose de 30 mg/kg (i.v.). Os resultados obtidos sugerem que a *P. paniculata* L. possui um ou mais componentes capazes de relaxar o músculo liso vascular (aorta de rato). Esse efeito independente da concentração e requer a integridade endotelial, porém não envolve a ativação de receptores muscarínicos, nossos resultados indicam que o possível mecanismo de ação do EHPP envolve a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial e a estimulação da enzima guanilato ciclase. E que o EHPP e também o composto isolado rutina apresentam efeito hipotensor em ratos normotensos, confirmando seu mecanismo *in vitro* através do envolvimento da via óxido nítrico – guanilato ciclase.

ABSTRACT

In the present study, the vasodilatory effect of hidroalcoholic extract of *P. paniculata* (HEPP), a plant popularly known as “barba-de-são-joão, bromil, vassourinha branca and mimosa” was investigated. It is used in the folk medicine for treatment of asthma, bronchitis, arthritis, stomach pain and diarrhea. Was investigated in thoracic rat aorta rings *in vitro* and in experimental models *in vivo* in rats. Addition of HEPP (at 300, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) induced a relaxation ($3,7 \pm 1,9 \%$; $8,3 \pm 3,1 \%$; $39,5 \pm 3,2 \%$, respectively) in phenylephrine – precontracted rings. This effect was abolished after endothelium removal. The incubation of atropine (1 μM ; a muscarinic receptor antagonist) did not alter HEPP induced relaxation. On the other hand, the non-selective nitric oxide (NO) synthase inhibitors L-NAME (10 μM) abolished the effects of EHPP. Futhermore, its relaxation was strongly inhibited by the guanylate cyclase inhibitors ODQ (10 μM). In addition, tetraethylammonium, a non – selective potassium channel blocker (10 mM) reduced the relaxation induced by HEPP. Normotensive Wistar rats were anaesthetized with cetamin (100 mg/kg) and xilazin (20 mg/kg). The rats were intubated with a polyethylene tube via a tracheostomy, the jugular vein was catheterized to permit injection drugs. The arterial pressure was continuously monitored through a catheter placed in the right carotid artery. The rats were treated with the HEPP, given orally (p.o.) (30, 100 e 300 mg/kg) that reduced the blood pressure $17,4 \pm 1,98$; $23,5 \pm 2,7$, e $27,1 \pm 2,8$ mmHg, respectively. The administration the non-selective nitric oxide (NO) synthase inhibitors L-NAME (7 mg/kg/min) and guanylate cyclase inhibitors methylene blue (150 nmol/kg/min) inhibited the hypotension induced by HEPP. The rutin 30 mg/kg (i.v.) shown hypotensive effect. Moreover, was possible to shown, that the HEPP and rutin presented hypotensive actions.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
	LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Família <i>Polygalaceae</i> e plantas do gênero <i>Polygala</i>	17
1.2	Pressão arterial.....	21
1.3	Mecanismos fisiológicos que atuam no controle da pressão arterial.....	23
1.4	Endotélio vascular e o controle do tônus vascular.....	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3-	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Animais.....	31
3.2	Classificação botânica.....	31
3.3	Preparação do extrato, identificação, isolamento e purificação dos compostos.....	32
3.3.1	Preparação do extrato e identificação dos compostos.....	32
3.3.2	Isolamento e purificação dos compostos.....	33
3.4	Drogas.....	33
3.5	Procedimento para isolamento da aorta torácica de rato.....	33
3.6	Protocolos experimentais <i>in vitro</i>	35
3.6.1	Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Polygala paniculata</i> L. (EHPP) sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato.....	35
3.6.2	Avaliação do envolvimento de receptores muscarínicos no efeito do	36

	extrato hidroalcoólico da <i>Polygala paniculata</i> L. (EHPP) sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato.....	
3.6.3	Estudo do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato.....	36
3.6.4	Investigação do envolvimento da enzima guanilato ciclase no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato.....	37
3.6.5	Estudo do envolvimento de canais de potássio no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato.....	38
3.7	Protocolos experimentais <i>in vivo</i>	38
3.7.1	Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados.....	38
3.7.2	Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) sobre os níveis pressóricos de ratos normotensos.....	39
3.7.3	Avaliação do efeito hipotensor em diferente tempo após a administração do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	40
3.7.4	Estudo do envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos normotensos.....	41
3.7.5	Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME ou azul de metileno.....	42
3.7.6	Investigação do envolvimento dos canais de Potássio na hipotensão causada pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP).....	33
3.7.7	Avaliação do efeito da rutina sobre os níveis pressóricos de ratos	43

	normotensos.....	
3.8	Análise dos resultados e testes estatísticos.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Efeito vasorrelaxante do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em anéis de aorta de rato.....	45
4.2	Efeito da atropina sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP).....	47
4.3	Participação do óxido nítrico no relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em anéis de aorta de rato.....	48
4.4	Efeito do inibidor da enzima guanilato ciclase sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP).....	49
4.5	Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP).....	50
4.6	Efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	51
4.7	Efeito hipotensor em diferentes tempos de administração do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	52
4.8	Efeito dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos normotensos.....	53
4.9	Participação do óxido nítrico no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	55

4.10	Participação do Azul de Metileno no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	57
4.11	Participação do Azul de Metileno no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	58
4.12	Efeito hipotensor da Rutina, composto isolado do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	59
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- acetilcolina
ADP	- difosfato de adenosina
AMPc	- monofosfato cíclico de adenina
ANOVA	- análise de variância
ATP	- trifosfato de adenosina
BK	- bradicinina
BKca	-canal de K ⁺ de condutância elevada ativada pelo Ca ⁺²
Ca⁺²	- íons cálcio
EDHF	- fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	- fator relaxante derivado do endotélio
EHPP	- extrato hidroalcoólico da <i>Polygala paniculata L.</i>
FAD	- dinucleotídeo de flavina e adenina
FEN	- fenilefrina
GCs	- guanilato ciclase solúvel
GMPc	- monofosfato cíclico de guanosina
GTP	- trifosfato de guanosina
IKca	- canal de K ⁺ de condutância intermediária ativada pelo Ca ⁺²
K⁺	- íons potássio
Kca	- canais de K ⁺ ativados Ca ⁺²
L-NAME	- N ^o -nitro-L-arginina metil éster
MLCK	- quinase da cadeia leve de miosina
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NO	-óxido nítrico
NOS	- óxido nítrico sintase
O₂	- oxigênio molecular
ODQ	-1-H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a]quinoxalin-1-one
PGI₂	- prostaciclina
PKA	- proteína quinase A
PKG	-proteína quinase G
PNA	- peptídeo natriurético atrial
Skca	- canal de K ⁺ de condutância baixa ativado pelo Ca ⁺²
TEA	-tetraetilamônio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Partes aéreas da <i>Polygala paniculata</i> L.....	20
Figura 2:	Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em aorta de rato.....	46
Figura 3:	Efeito da atropina sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em anéis de aorta de rato.....	47
Figura 4:	Efeito do inibidor da enzima óxido nítrico sintase sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em anéis de aorta de rato.....	48
Figura 5:	Efeito do inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em anéis de aorta de rato.....	49
Figura 6:	Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP).....	50
Figura 7:	Efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	51
Figura 8:	Efeito hipotensor em diferentes tempos de administração do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	52
Figura 9:	Efeito da ativação dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos normotensos.....	53
Figura 10:	Efeito hipotensor do EHPP na presença do inibidor da óxido nítrico sintase em ratos anestesiados.....	56
Figura 11:	Efeito hipotensor do EHPP na presença do inibidor da enzima guanilato ciclase em ratos normotensos	57
Figura 12:	Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre a ação hipotensora promovida pelo extrato hidroalcoólico da <i>P. paniculata</i> L. (EHPP) em ratos anestesiados.....	58

Figura 13: Efeito hipotensor da Rutina, composto isolado do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados 59

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento e cura das mais diversas patologias tem aumentado consideravelmente em todo mundo (CIRIGLIANO et al, 1998). O uso de plantas como medicamento, para o tratamento ou prevenção de doenças, se deve a presença de metabólitos secundários, geralmente de grande valor terapêutico, sintetizados pelas plantas. São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, diretos ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, como a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*), o taxol (*Taxus brevifolia*), o quinino (casca da *Chinchona sp*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (FARNSWORTH e BINGEL, 1997; CALIXTO, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; BOLDI, 2004).

Existe o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos (CORDELL, 2000), o Brasil apresenta grande biodiversidade, abrangendo cerca de 25% das espécies vegetais encontradas no mundo, sendo considerado um país com grande potencial de plantas medicinais e exóticas, criando um vasto campo comercial a ser explorado (MALUENDAS e PEITZ, 2001).

O Brasil apresenta influências da cultura indígena, africana e européia. Essas influências formam a base da medicina popular brasileira. “Em geral o conhecimento popular é desenvolvido por grupamentos culturais que ainda convivem intimamente com a natureza, observando-a de perto no seu dia-a-dia e, explorando suas potencialidades, mantendo vivo e crescente esse

patrimônio pela experimentação sistemática e constante (ELISABETSKY, 1997)".

Diversas plantas medicinais são utilizadas pela população para o tratamento de diversas patologias que afetam o sistema cardiovascular como a hipertensão, aterosclerose e a diabetes *mellitus* (VORA e MANSOOR, 2005). No entanto, poucas dessas plantas têm sua segurança, efetividade e mecanismo de ação confirmada cientificamente (VORA e MANSOOR, 2005). A validação das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros não podem ser feitos somente com base no conhecimento e usos populares. Por isso a autorização oficial do uso de plantas medicinais como medicamento é necessária e deve ser fundamentada em dados experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que demonstrem os benefícios obtidos a partir do uso de drogas de origem vegetal sejam superiores aos riscos que eles oferecem àqueles que os utilizam (YUNES et al, 2001).

Plantas do gênero *Polygala* são freqüentemente usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (HAMBURGER et al, 1985). Seus usos terapêuticos são descritos na medicina natural de longa data, embora a eficácia e a segurança do uso de suas preparações não tenham sido ainda todas comprovadas cientificamente, sua utilização vem sendo feita com base na tradição popular (LORENZI et al., 2002).

1.1 Família *Polygalaceae* e plantas do gênero *Polygala*

As plantas da família *Polygalaceae* são predominantemente encontradas em regiões tropicais. Entre as plantas desta família, incluem-se as do gênero *Polygala*, que compreende cerca de 500 espécies, apresentando-se a maior parte das vezes na forma de arbustos ou de pequenas trepadeiras que cobrem galhos de árvores. Suas flores apresentam cor rosa ou branca e variam entre as espécies (GENTRY, 1996).

Um grande número de espécies do gênero *Polygala* é utilizado pela população, com destaque na China, para o controle ou tratamento de várias doenças, onde são consumidas principalmente na forma de chás. Novas espécies da planta *Polygala* foram encontradas no Brasil, a *Polygala riograndensis*, encontrada na região sul, no estado de Rio Grande do Sul (LUDTKE et al, 2007) e a *Polygala marquesiana* encontrada no estado de Goiás (PASTORE et al, 2008).

Várias atividades biológicas têm sido descritas em algumas espécies de *Polygalas*. Entre elas destacam-se *Polygala tenuifolia* com propriedades expectorante, sedativa, tônica (JIANG et al, 2002), doenças de Alzheimer's (JIA et al., 2004), anti-stress (KAWASHIMA et al., 2004), *P. caudata* muito utilizada para o tratamento de tosse, hepatite e como agente sedativo e expectorante (LI et al.,1999), *P. telephioides* como desintoxicante de narcóticos (EGASHIRA, 2005), *P. sabulosa* com propriedades antinociceptivas e anestésico local (PIZZOLATTI et al. 2000), *P. cyparissias* com propriedades antinociceptivas (CAMPOS et al., 1997), anestésico de uso tópico e analgésica (PINHEIRO et al., 1998), *P. alpestris* com atividade antioxidante (CERVELLATI et al., 2004), e citotóxica (DALL'ACQUA et al., 2004), entre outras.

Os membros da família *Polygalaceae* são conhecidos por conter uma grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significativa atividade biológica. Investigações fitoquímicas em diferentes espécies de *Polygala* revelaram vários compostos incluindo lignanas citotóxicas (DALL'ACQUA *et al.*, 2002), saponinas (DESBENE *et al.*, 1999; ESTRADA *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2002), xantonas (EL SAYAH, *et al.*, 1999; MAK *et al.*, 2001; DALL'ACQUA *et al.*, 2002; CRISTIANO *et al.*, 2003), cumarinas e flavonóides (CRISTIANO *et al.*, 2003).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de uma série de constituintes químicos que já foram identificados e isolados na *Polygala paniculata* L., como xantonas, cumarinas e flavonóides (CRISTIANO *et al.*; 2003). Os flavonóides têm sido relacionados com uma redução na morte por doenças que atingem as artérias coronárias (HERTOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1996). E de acordo com vários autores esses compostos têm potencial vasodilatador (HERRERA *et al.*, 1996) tanto na presença (LEMOS *et al.*, 1999) quanto na ausência de endotélio vascular (HERRERA *et al.*, 1996).

Investigações sobre as ações de composto como xantonas, isoladas da *P. caudata*, em relação a ações cardiovasculares, demonstrou que as xantonas possuem atividade antioxidante e também exibiu efeito vasorrelaxante em anéis de aorta de ratos Wistar, esse relaxamento promovido é dependente da concentração (LIN, *et al.* 2005).

Em um estudo com outra planta da família *Polygalaceae*, a *P. cyparissias* St. Hillaire & Moquin, foi demonstrado que tanto o seu extrato hidroalcoólico quanto a 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, isolada a partir deste extrato, apresentaram notável atividade antinociceptiva quando

analisados nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e no modelo de hiperalgesia induzida pela bradicinina e substância P (CAMPOS *et al.*, 1997). Posteriormente, um estudo complementar, realizado pelo mesmo grupo, demonstrou através de experimentos *in vitro*, utilizando traquéia isolada de cobaia_não sensibilizada e sensibilizada por ovalbumina, que tanto o extrato hidroalcoólico quanto a 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, isolada da *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin., apresentaram importante efeito antiespasmódico, contra contrações induzidas pela acetilcolina, KCl, bradicinina, prostaglandina E₂, histamina, substância P, composto 48/80 (composto liberador de histamina) e U46619 (um análogo estável do tromboxano A₂) (EL SAYAH *et al.*, 1999).

Estudos com a *P. sabulosa* demonstrou que tanto o seu extrato hidroalcoólico quanto outras frações e compostos isolados a partir deste extrato, apresentaram notável atividade antinociceptiva quando analisados nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético (MEOTTI *et al.*, 2006). Outro grupo demonstrou que compostos isolados da *P. sabulosa*, dihidrostiril-2-pirona e estiril-2-pirona, possuem efeito anestésico (DUARTE *et al.*, 2007). Posteriormente, um estudo complementar, realizado pelo mesmo grupo, demonstrou através de experimentos *in vitro* e *in vivo* o efeito anticonvulsivante e ansiolítico destes compostos isolados da *P. sabulosa* (DUARTE *et al.*, 2008).

A *P. paniculata* L. (Fig. 1) é uma planta que cresce na costa Atlântica brasileira, sendo encontrada também no litoral de Santa Catarina. É conhecida popularmente como barba-de-são-joão, barba-de-bode, bromil, vassourinha branca e mimosa, sendo seu chá utilizado na medicina popular para o tratamento da asma, bronquite crônica, demais afecções do aparelho

respiratório, artrite, artrose, água no joelho, problemas renais, dor de estômago, diarreia, bem como tonificante (NEWALL *et al.*, 1996; LORENZI e MATOS, 2002).

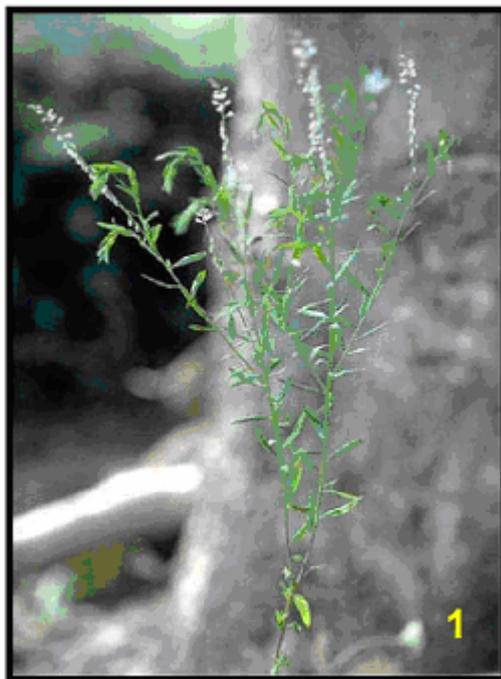


Figura 1: Partes aéreas da *Polygala paniculata* L.
Fonte: (Fig. 1) Warren L. Wagner (2005)

CRISTIANO *et al.* (2003) isolaram em suas análises três xantonas (denominadas, 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona e 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona), e também dois esteróis foram caracterizados como o espinasterol e delta 25-espinasterol.

Estudos mostraram que o extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) possui importante atividade antioxidante. Esta atividade foi relacionada ao seu efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida pelo tratamento crônico de camundongos com metilmercúrio (MeHg) (FARINA *et al.*, 2005). Os autores sugeriram que o efeito apresentado pelo extrato, está relacionado a

presença de xantonas e flavonóides, que são compostos que apresentam importante efeito antioxidante.

Posteriormente, um estudo complementar realizado pelo mesmo grupo demonstrou que a quercetina, um composto isolado da *Polygala paniculata* L. tem efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade provocado pelo MeHg (FRANCO et al, 2007).

Estudos com o extrato bruto hidroalcolico da *P. paniculata* L. demonstrou sua atividade gastroprotetora, os resultados obtidos com neste estudo mostraram pela primeira vez que o extrato bruto hidroalcolico da *P. paniculata* L. administrado sistematicamente por via oral foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol 70% e quando administrado pela via intraperitoneal também apresentou importante efeito citoprotetor (LAPA et al, 2007).

1.2 Pressão arterial

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de acompanhamento médico em pacientes de muitos países do mundo (YUSUF *et al*, 2001). Um dos principais fatores de risco para as desordens cardiovasculares é a pressão sanguínea elevada (CARRETERO *et al.*, 2000). A hipertensão é uma das doenças mais comuns em humanos, sendo que de 90 a 95% dos hipertensos desconhece a causa (KU, 2006). É considerada de origem multifatorial (JACOB, 1999), envolvendo predisposição genética e fatores ambientais (fisiológicos e psicológicos) como dieta, atividade física, obesidade e fumo (CRACKOWER, *et al.*, 2002; KAKAR, *et al.*, 2006). De

acordo com Ku (2006) a idéia mais aceita é que a hipertensão é causada por uma interação entre fatores gênicos, múltiplos fatores pressores patogênicos e desordens de fatores depressores fisiológicos.

O tratamento para a hipertensão se faz necessário para garantir a sobrevivência do paciente bem como a qualidade de vida do mesmo (MAR *et al.*, 2001). A hipertensão arterial é uma das principais causas de eventos cardiovasculares, como infartos, insuficiência cardíaca e AVCs (acidentes vascular cerebrais). É um dos fatores de risco cardiovascular mais preocupante porque, em 80% dos casos, não apresenta sintomas.

Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante períodos longos, está na adesão do paciente ao tratamento. Esta adesão ao tratamento pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural/Plantas Medicinais que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que “acreditam” na ação benéfica da planta e desta forma pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade. Além disto, as descobertas de novas substâncias com ação inédita irão aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (YUNES *et al.*, 2001).

Neste contexto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes que possam oferecer novas ações terapêuticas contra a hipertensão arterial.

1.3 Mecanismos fisiológicos que atuam no controle da pressão arterial

A pressão arterial é definida como a força que o sangue exerce contra as paredes dos vasos. Em seres humanos, a pressão sanguínea varia constantemente, porém, raramente desvia do normal mais do que 10 a 15% durante o dia. Em um adulto normal os níveis pressóricos se mantêm em média entre 120 e 80 mmHg, geralmente próximo à 100 mmHg. Entretanto ela pode ser elevada a mais de 160 mmHg em indivíduos com hipertensão ou até mesmo chegar a 0 nas pessoas que se encontram em situações que comprometem a circulação sanguínea normal (hemorragias) (GUYENET et al, 2006). Felizmente o organismo possui mecanismo de controle da pressão arterial que conseguem promover uma resposta adequada frente às ocasiões que a alteram (GUYENET et al, 2006).

De acordo com Guyton (1991) os mecanismos de controle da pressão sanguínea podem ser classificados de acordo com o tempo necessário para produzir uma ação. Uma resposta rápida (podendo reagir em segundos) é feita pelos barorreceptores, quimiorreceptores e o sistema nervoso central. O controle dos níveis pressóricos que ocorre em horas ou dias é feita pelos rins. O controle em médio prazo (ocorre em minutos) é feito pelos sistemas hormonais como renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, calicreína-cinina, fator natriurético atrial e autacóides derivados do endotélio.

Os barorreceptores estão situados nas paredes das artérias, no seio carotídeo e arco aórtico Estes são receptores de extensão que respondem alterações estruturais nas paredes dos vasos (distensão ou constrição). Consistem na primeira linha de defesa à hipertensão ou hipotensão aguda (GUYTON, 1991; OPIE, 1998), ajustam tanto o tônus vagal quanto o sistema

nervoso simpático. Os barorreceptores respondem à taxa de aumento de pressão induzida por deformações e a ações estáticas causada por mudanças contínuas na pressão arterial. Eles se originam de nervos aferentes do vago e nervos glossofaríngeos e se dirigem para o núcleo do trato solitário que faz parte do centro vasomotor na medula oblonga. Impulsos destes receptores são inibitórios por natureza, assim, na hipertensão aguda os baroreflexos geram uma transmissão neuronal aumentada para o centro vasomotor, com conseqüente inibição do sistema simpático e aumento do tônus vagal (OPIE, 1998). Essas mudanças reduzem a força e a freqüência cardíaca (OPIE, 1998; GUYENET, 2006) e induzem diminuição da resistência vascular periférica. Dessa forma um aumento agudo na pressão arterial induz mudanças que tendem a reduzi-la. No caso de hipotensão aguda, há uma redução na distensão produzida pela pressão nos barorreceptores, resultando em uma diminuição da freqüência de descarga reduzindo os sinais enviados ao centro vasomotor e um conseqüente aumento da atividade simpática e inibição do tônus vagal (GUYENET et al, 2006).

Também ocorre a ativação dos quimiorreceptores devido às concentrações elevadas de CO_2 (dióxido de carbono) e às baixas concentrações de O_2 (oxigênio) no sangue. Desta forma, um sinal é enviado aos centros cerebrais de controle da pressão sangüínea, causando a redução da mesma. Esse controle é extremamente importante durante a atividade física, onde o consumo de O_2 pelos músculos e a excreção de CO_2 são igualmente elevados (GUYENET et al, 2006).

O controle em longo prazo (horas ou dias) é feito principalmente pelos rins. Quando a pressão sobe além do normal os rins passam a excretar mais

água e sal, isso reduz a volemia e faz com que o coração bombeie menos sangue levando à queda da pressão arterial. Reciprocamente quando a pressão cai abaixo do normal há um aumento no balanço entre fluídos que entram e saem, aumentando assim as concentrações dos líquidos e eletrólitos corporais e a pressão sangüínea (GUYENET et al, 2006).

Os mecanismos intermediários são ativados minutos após a ativação dos controladores neurais da pressão. Um dos principais é o sistema renina-angiotensina, que tem função vasoconstritora ativada quando a baixa pressão sangüínea faz com que o fluxo de sangue para os rins caia abaixo do normal. Isso faz com que as células justaglomerulares dos rins secretem renina e a liberem na corrente sangüínea. A renina é uma enzima glicoproteica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II causa vasoconstrição ao longo dos vasos sangüíneos corporais e conseqüentemente restabelece os níveis pressóricos normais (GUYTON, 1991; OPIE, 1998; CRACKOWER *et al.*, 2002).

Opie (1998) propõe que a liberação de renina pelas células justaglomerulares ocorre em resposta a três estímulos principais: aumento da estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos; redução da pressão arterial renal e diminuição na reabsorção tubular de sódio (Na^+).

Outros sistemas hormonais participam do controle da pressão sangüínea como o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina. O ADH é um hormônio (peptídio) neurohipofisário envolvido em vários processos fisiológicos, inclusive regulação dos fluídos corporais, do tônus vascular e da contratilidade cardiovascular. Sua ativação ocorre com o aumento da osmolaridade

plasmática, principalmente ao sódio (Na^+), e redução da pressão intravascular. Atua aumentando a reabsorção de água, pelos túbulos renais, sem interferir na eliminação de sódio (Na^+), isso contribui para a elevação da sobrecarga sanguínea e conseqüentemente da pressão arterial (LEE *et al.*, 2003).

Os peptídeos são importantes no auxílio ao controle da pressão arterial, dentre eles destacamos o peptídeo natriurético atrial (PNA), que possui propriedades diuréticas/natriuréticas e vasodilatadoras e ambas contribuem para uma redução nos níveis pressóricos. Estes efeitos são mediados pela ligação do PNA a um receptor de superfície de membrana, que irá ativar a guanilato ciclase A (GC-A) que por sua vez aumentará as concentrações de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) (KU, 2006) que vai inibir a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e causar vasodilatação. O PNA também contribui para a inibição da secreção de aldosterona e é antagonista endógeno da angiotensina II (OPIE, 1998).

1.4 Endotélio vascular e o controle do tônus vascular

O endotélio vascular é considerado um órgão dinâmico que responde a diversos estímulos físicos e humorais, possui uma posição estratégica, na interface entre o sangue e o tecido que favorece o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular. Os vasos sanguíneos são constituído de três camadas: a camada íntima, a camada média e a camada adventícia. A camada íntima consiste em uma única camada de células delgadas, altamente ativas no controle da circulação. Elas produzem vários compostos vasoconstritores como a endotelina, a angiotensina II e o

tromboxano A_2 . E também produzem compostos vasodilatadores como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), as prostaciclina (PGI_2), e o óxido nítrico (NO). O endotélio através destes agentes tem influência sobre o fluxo sanguíneo e ainda sobre as células circulantes, como os leucócitos, as plaquetas e ainda sobre substâncias envolvidas na coagulação sanguínea. Todos estes efeitos contribuem para a modulação do tônus das paredes vasculares na hipertensão e participam no desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares. A camada média é composta principalmente de células musculares lisas, que com a estimulação apropriada contraem para estreitar o diâmetro da artéria. Outro componente desta camada é a matriz, que une as células musculares mantendo a orientação correta da parede do vaso. A camada adventícia, que é a mais externa, constituída de fibroblasto, colágeno e poucas células além das dos vasos sanguíneos. Nela também se encontram os vasos linfáticos e nervos autônomos que controlam o tônus arteriolar (OPIE, 1998).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina. Por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS). O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outra vez prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do

vaso sanguíneo. O NO derivado das células endoteliais é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico, a toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. A caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças (TODA et al, 2007).

Diversas pesquisas utilizando plantas medicinais têm procurado demonstrar a contribuição de substâncias de origem natural no efeito cardioprotetor e antihipertensivo (SUZUKI et al, 2002; TESTAI et al, 2002), pois se sabe, há muito tempo, que a redução vigorosa da pressão arterial a limites próximos ao normal proporciona enormes benefícios em termos da redução da morbidade e da mortalidade por causas cardiovasculares (MACGREGOR, 2000.; VAINIO et al; 2001).

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de investigar o efeito vasorrelaxante e hipotensor da planta *Polygala paniculata* L., por se tratar de uma ação que, futuramente, talvez possa auxiliar como meio farmacológico para o controle de distúrbios cardiovasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a possível atividade vasorrelaxante em aorta isolada de rato e hipotensora no modelo de medida de pressão arterial em rato normotenso anestesiado do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) *in vitro* e *in vivo*. Além disso, evidenciar através de protocolos experimentais farmacológicos os possíveis mecanismos envolvidos no efeito vasorrelaxante/hipotensor.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a possível atividade vasorrelaxante do EHPP em aorta isolada de rato, determinando as concentrações do EHPP necessária(s) para induzir relaxamento vascular *in vitro*.
- Verificar a participação do endotélio vascular no efeito vasorrelaxante do EHPP em aorta isolada de rato.
- Verificar o possível mecanismo de ação vasorrelaxante do EHPP em aorta isolada de rato através da utilização de inibidores seletivos dos segundos mensageiros envolvidos na via de sinalização, bem como utilizando antagonistas seletivos para vários receptores envolvidos no efeito vasorrelaxante.

- Verificar a possível atividade hipotensora da administração via oral do EHPP no modelo de medida de pressão arterial em rato normotenso anestesiado, determinando a(s) dose(s) bem como o tempo de duração deste efeito hipotensor.
- Verificar o possível mecanismo de ação vasorrelaxante do EHPP no modelo de medida de pressão arterial em rato normotenso anestesiado através da administração sistêmica de inibidores seletivos dos segundos mensageiros envolvidos na via de sinalização, bem como, de antagonistas seletivos para vários receptores envolvidos no efeito vasorrelaxante.
- Avaliar a ação vasorrelaxante e hipotensora da rutina, composto isolado majoritário da *P. paniculata* L. em aorta isolada de rato e no modelo de medida de pressão arterial em rato normotenso anestesiado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Ratus norvegicus*, variedade *Wistar* albinos, com idade entre 3 e 4 meses, fornecida pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Aproximadamente 2-3 horas antes da realização dos experimentos os animais foram transportados até o laboratório (continuam sob condições controladas) para que passem por um período de ambientação e sua pressão arterial média não sofra alterações em virtude do deslocamento. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFPR sob número 264.

3.2 Classificação botânica

A *Polygala paniculata* L. foi coletada no município de Florianópolis, na praia de Daniela (Estado de Santa Catarina) sendo identificada e classificada pelo Dr. Olavo de Araújo Guimarães, do Departamento de botânica da Universidade Federal do Paraná. Um exemplar está catalogado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o registro UPCNB 26027.

3.3 Preparação do extrato, identificação, isolamento e purificação dos compostos

3.3.1 Preparação do extrato e identificação dos compostos

A obtenção do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) e a identificação, isolamento e purificação dos compostos foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof^o Moacir Pizzolatti do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Cerca de 1000g da planta inteira, seca e triturada foram submetidos à extração, por maceração em 80% de etanol-água, à temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{C}$), por 14 dias. O etanol foi evaporado e o extrato (rendimento 50g) foi concentrado ao nível desejado.

Os estudos fitoquímicos conduzidos com o extrato da *P. paniculata* L demonstraram a presença de muitos constituintes (CRISTIANO et al, 2003). Usando métodos químicos e de espectroscopia (EIMS, IR, ^1H e ^{13}C NMR, NOE, DIF), foi identificadas a estrutura de duas xantonas (1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona e 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona) e a presença de outros compostos como cumarinas e o flavonóide rutina. Usando cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa, dois esteróis foram caracterizados (espinasterol e delta25-espinasterol) e uma xantona em menor quantidade (1-hidroxi-2, 3,5-trimetoxixantona).

3.3.2 Isolamento e purificação dos compostos

O composto isolado rutina foi obtido a partir do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* conforme descrito por Missau e colaboradores (dados não publicados).

3.4 Drogas

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), sulfato de magnésio (MgSO_4), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), D-Glucose, acetilcolina (todos Merck; Alemanha); fenilefrina, N^ω – nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), atropina, glibenclamina, tetraetilamônio, 1-H-[1, 2,4] Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), azul de metileno, (todos Sigma Chemical; EUA); ácido acético (Reagen). Todos os sais foram solubilizados em água destilada e as diluições das drogas, a partir das soluções estoques, foram preparadas com líquido nutritivo de Krebs-Henseleit.

3.5 Procedimento para isolamento da aorta torácica de rato

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente após, a aorta torácica foi cuidadosamente retirada e colocada em um recipiente (placa de Petry) contendo solução nutritiva previamente aquecida, no qual o tecido conectivo foi removido e a camada muscular seccionada em anéis medindo aproximadamente 4 mm de comprimento. Estes anéis foram

aconicionados, por meio de hastes, em cubas de vidro (com capacidade máxima de 3ml) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (sob temperatura constante de 37° C e aerada com solução carbogênica, 95% O₂ e 5% CO₂). Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força que, acoplado a um sistema computadorizado permite o registro de contrações isométricas. Em seguida, os anéis de aorta foram submetidos a uma tensão de 1g durante 60 minutos, período reservado para a estabilização da preparação, antes do início dos protocolos experimentais (o tempo de 60 minutos também foi respeitado nos intervalos entre as curvas). Neste período, o líquido nutritivo foi renovado a cada 15 minutos. Após a estabilização, foram adicionadas fenilefrina (1μM para a verificação da responsividade vascular ao estímulo contrátil) e, na seqüência, a acetilcolina (1μM para a confirmação da presença ou ausência de endotélio funcional nas preparações estudadas).

O líquido nutritivo Krebs-Henseleit, utilizado nos experimentos descritos neste estudo, apresenta a seguinte composição (concentrações em mM): NaCl (133), KCl (5,0), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,3), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (20) e Glicose (10). À solução pronta foi adicionado ácido acético (10%) para ajuste do pH em torno de 7,4.

3.6 Protocolos experimentais *in vitro*

3.6.1 Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, a presença ou ausência de endotélio foi confirmada através da administração de acetilcolina (1 μ M) aos anéis de aorta previamente contraídos por fenilefrina (1 μ M). Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela acetilcolina correspondeu a 80%. Para a execução dos protocolos experimentais em artérias desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica no lúmen do vaso.

Uma segunda resposta a fenilefrina foi obtida e, durante a fase tônica da contração resultante, foi incubado o EHPP nas concentrações de 30, 50, 100, 300, 500 e 1000 μ g/ml. Ao término deste procedimento, induziu-se uma nova contração por fenilefrina (1 μ M), seguida da adição por acetilcolina (1 μ M), com o objetivo de avaliar se o EHPP era capaz de comprometer a integridade das preparações.

3.6.2 Avaliação do envolvimento de receptores muscarínicos no efeito do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, a presença de endotélio funcional nos anéis de aorta foi confirmada através da administração de acetilcolina (1 μ M), em preparações previamente contraídas por fenilefrina (1 μ M). As preparações foram lavadas e, após 60 minutos, foi induzida uma nova contração por fenilefrina seguida pela adição do EHPP (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 μ g/ml). Após a troca de líquido nutritivo e um novo período de estabilização, diferentes preparações de aorta foram incubadas, durante 15 minutos, com atropina (1 μ M), um antagonista seletivo de receptores muscarínicos. Na presença deste antagonista foi induzida uma nova contração por fenilefrina e, na fase tônica da mesma, foi adicionado o EHPP (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 μ g/ml) foi adicionado. Os efeitos do EHPP na presença e na ausência da atropina foram posteriormente comparados.

3.6.3 Estudo do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato

Estes experimentos foram realizados em preparações com endotélio funcional. Após a confirmação da presença do endotélio vascular, induziu-se uma contração com fenilefrina seguida da administração do EHPP 30, 50, 100, 300, 500 e 1000 μ g/ml em sua contração sustentada. As preparações foram lavadas e, após 45 minutos, foram incubadas em diferentes preparações o L-NAME (10 μ M), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase, durante 15 minutos. Na presença dessa substância, uma nova contração induzida por

fenilefrina foi obtida e, na fase tônica desta contração, adicionou-se o EHPP (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 µg/ml).

A eficácia do L-NAME foi avaliada através da adição da acetilcolina (1µM) às preparações contraídas por fenilefrina e expostas a essas drogas.

3.6.4 Investigação do envolvimento da enzima guanilato ciclase no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato

Nestes experimentos, anéis de aorta com endotélio vascular íntegro foram contraídos por fenilefrina (1µM) e, na fase tônica desta contração, adicionou-se o EHPP em diferentes concentrações (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 µg/ml). Em seguida, as preparações foram lavadas e após um intervalo de estabilização (45 minutos), foi incubado o ODQ (10µM), durante 15 minutos e em diferentes preparações (totalizando 60 minutos de intervalo entre as curvas). Na presença do inibidor da enzima guanilato ciclase, foi obtida uma nova contração por fenilefrina e, na fase tônica desta contração, o EHPP (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 µg/ml) foi adicionado. Os efeitos do EHPP na presença e na ausência do ODQ foram comparados entre si.

Para verificar a funcionalidade do inibidor da síntese do GMPc, a acetilcolina (1µM) foi adicionada nas preparações previamente contraídas por fenilefrina (1µM) e expostas ao ODQ.

3.6.5 Estudo do envolvimento de canais de potássio no efeito relaxante do EHPP em aorta isolada de rato

Após a confirmação da presença de endotélio vascular nas preparações de aorta, o EHPP nas concentrações de 30, 50, 100, 300, 500 e 1000 µg/ml foram adicionadas à fase tônica da contração induzida pela fenilefrina (1µM). Depois da lavagem das preparações e de um intervalo de 45 minutos, foram incubados, em diferentes anéis de aortas, o tetraetilamônio (10 mM), um bloqueador inespecífico de canais de K⁺. Na presença desta substância foi induzida uma nova contração por fenilefrina e, na fase tônica desta contração, o EHPP (30, 50, 100, 300, 500 e 1000 µg/ml) foi adicionado. Os efeitos do EHPP na presença e na ausência deste bloqueador de canais de K⁺ foram comparados e estão mostrados na seção de resultados.

3.7 Protocolos experimentais *in vivo*

3.7.1 Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados

Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg), administrada pela via intramuscular e suplementada a intervalos de 45–60 minutos. Após a fixação do animal em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 10), destinado à administração de drogas e soluções. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina, diluída em solução salina, foi administrada para prevenir coágulos e obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia e mantidos

sob respiração espontânea. A artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um catéter de polietileno (PE 10), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial. Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma overdose de tiopental (superior a 40mg/kg i.v.).

Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, EUA) conectados a um computador Macintosh contendo um software específico de integração (Chart v4, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, Austrália).

3.7.2 Efeito do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) sobre os níveis pressóricos de ratos normotensos

Foi realizada a administração do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. EHPP em diferentes doses (30, 100 e 300 mg/kg) por via oral. Após 60 minutos foi feito o manuseio cirúrgico dos animais (item 3.7.1), após a artéria ter sido conectada ao transdutor, foi respeitado um período de aproximadamente quinze minutos para a estabilização da PAM. Em seguida

realizou-se a verificação da PAM. Os valores inseridos no gráfico são a pressões arterial média registrada no protocolo experimental de 6 animais. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais que receberam por gavagem água destilada.

3.7.3 Avaliação do efeito hipotensor em diferente tempo após a administração do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

Nesse experimento foi realizada a administração do EHPP na dose de 100 mg/kg por via oral. Após 30, 60, 90, 120 e 150 minutos os animais foram preparados para o registro da PAM como descrito no item 3.7.1 após a artéria ter sido conectada ao transdutor, foi respeitado o período para a estabilização da PAM. Em seguida realizou-se a verificação da PAM, para avaliar o tempo de latência e a duração do efeito hipotensor. Os valores inseridos no gráfico são a pressões arterial média registrada no protocolo experimental de 6 animais. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais que receberam por gavagem água destilada.

3.7.4 Estudo do envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos normotensos.

Para a realização deste protocolo foi feito 4 grupos de 6 animais, um grupo tratado com atropina, um antagonista muscarínico, e outro grupo controle, tratado com salina.

Para o grupo tratado, foi realizada a administração atropina 5 mg/kg pela via subcutânea (s.c), após 20 minutos foi feito a gavagem do EHPP na dose de 100 mg/Kg (v.o.) e em outro grupo após a administração da atropina 5 mg/kg pela via subcutânea (s.c), após 20 minutos foi feita a gavagem de água destilada (v.o.). Após 60 minutos foi feita a cirurgia e o período de estabilização foi respeitado.

Para o grupo controle foi realizada a administração de salina pela via subcutânea (s.c), após 20 minutos foi feito a gavagem do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. EHPP na dose de 100 mg/Kg por via oral e em outro grupo após a administração da salina foi feita a gavagem de água destilada (v.o.), após 60 minutos foi feita a cirurgia e o período de estabilização foi respeitado.

Em seguida realizou-se a verificação da PAM. Após esse período foi administrado, pela veia femoral, ACh na dose de 30 mg/kg, um controle positivo verificação da responsividade vascular.

3.7.5 Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME ou azul de metileno.

Nesse conjunto de experimentos os animais foram tratados com o extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. EHPP na dose de 100 mg/Kg (v.o.) e outro grupo foi feita a gavagem de água destilada. Em seguida à administração os animais foram preparados para o registro da PAM como descrito no item 3.7.1 e a veia femoral contra-lateral àquela utilizada para a administração em *bolus* foi igualmente canulada e conectada a uma bomba de infusão contínua (modelo EFF 311, Insight[®], Ribeirão Preto, SP). Após o período de estabilização da PAM os animais foram infundidos continuamente, durante 90 minutos com N^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) (7 mg/kg/min) ou azul de metileno (150 nmol/kg/min). Durante os primeiros 40 minutos, foi infundido apenas L-NAME ou azul de metileno. Após esse período foram feitas administrações de ACh na doses de 3, 10 e 30 nmol/kg para verificação da responsividade vascular.

Sendo assim o tempo total de infusão de L-NAME (7 mg/kg/min) ou azul de metileno (150 nmol/kg/min) foi de 90 minutos.

3.7.6 Investigação do envolvimento dos canais de Potássio na hipotensão causada pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP)

Nesse protocolo experimental foi feito 4 grupos de 6 animais, um grupo tratado com TEA e outro grupo controle, tratado com salina.

Foi administrado o TEA (360 $\mu\text{mol/kg}$) por via endovenosa e após 20 minutos os animais foram tratados com o EHPP na dose de 100 mg/Kg (v.o.) e outro grupo foi feita a gavagem de água destilada.

Para o grupo controle foi feita a administração de salina pela via intravenosa e após 20 minutos foi realizado a gavagem do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. EHPP na dose de 100 mg/kg por via oral e em outro grupo após a administração da salina foi feita a gavagem de água destilada (v.o.),

Após a cirurgia e período de estabilização, verificou-se a PAM. Nesse protocolo comparou-se o efeito hipotensor do EHPP na presença e na ausência do TEA (bloqueador de canais de K^+ não seletivo) com o seu efeito após a administração deste.

3.7.7 Avaliação do efeito da rutina sobre os níveis pressóricos de ratos normotensos

Após o manuseio cirúrgico dos animais (item 3.7.1), a artéria ter sido conectada ao transdutor, foi respeitado um período de aproximadamente quinze minutos para a estabilização da PAM. Em seguida realizou-se a

administração da rotina, composto isolado do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em diferentes doses (1, 3 e 10 mg/kg) e em diferentes seqüências, através da veia femoral. Os valores inseridos no gráfico são as diferenças entre a pressão arterial média registrada antes e após a aplicação de cada dose. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais normotensos que receberam acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg) por via endovenosa.

3.8 Análise dos resultados e testes estatísticos.

Os resultados foram apresentados de acordo com o programa GraphPad Prism 4.00. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística dos resultados para a comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste t de Bonferroni.

4- RESULTADOS

4.1 Efeito vasorrelaxante do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato

Em anéis de aorta providos de endotélio vascular e previamente contraídos por fenilefrina (1 μ M) o EHPP nas concentrações de 300, 500 e 1000 μ g/ml, promoveu relaxamento dependendo da concentração ($3,7 \pm 1,9\%$; $8,3 \pm 3,1\%$; $39,5 \pm 3,2\%$, respectivamente). O relaxamento produzido pelo EHPP foi abolido pela remoção do endotélio vascular $2,9 \pm 1,5\%$; $3,9 \pm 1,09\%$; $5,6 \pm 3,52\%$. A exposição dos anéis de aorta ao EHPP não alterou a responsividade vascular à fenilefrina ou à acetilcolina (resultados não mostrados). Não houve, portanto, comprometimento da integridade vascular após exposição ao EHPP (Figura 2).

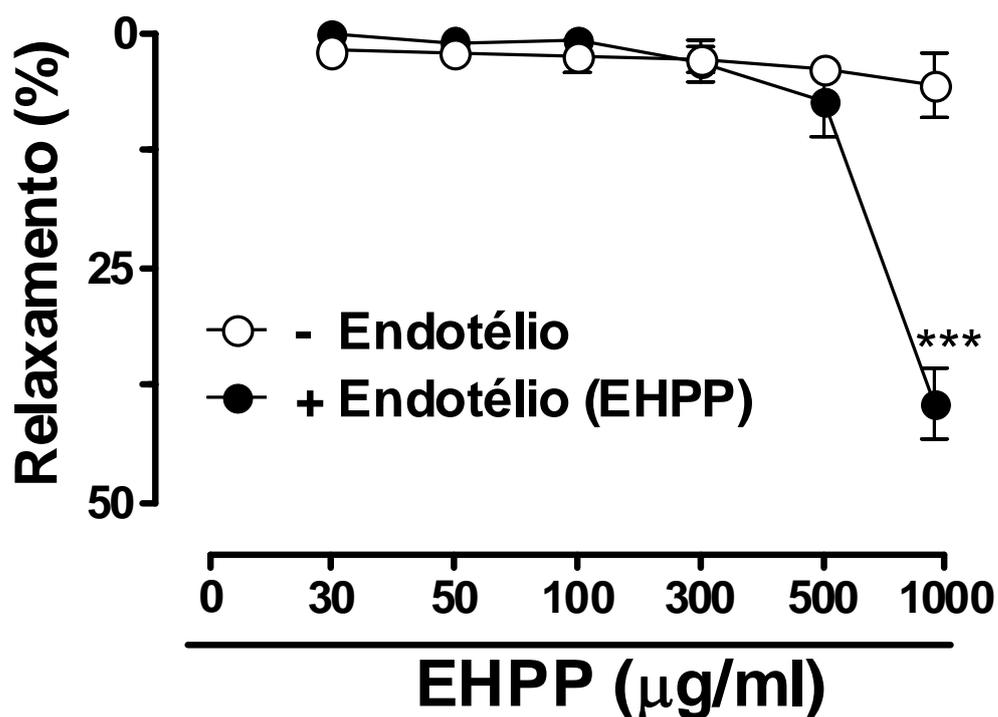


Figura 2: Efeito vasorrelaxante do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata L.* (EHPP) em aorta de rato. Em anéis com endotélio vascular íntegro e removido, previamente contraídos por fenilefrina (1 µM), os efeitos relaxantes do EHPP nas concentrações de 300, 500 e 1000 µg/ml foram comparados entre si. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão das médias de 6 ou 7 experimentos. ***p < 0,001 ao EHPP (1000 µg/ml) em artérias com endotélio vascular íntegro em relação a (30 µg/ml). (ANOVA de uma via, seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.2 Ausência do efeito da atropina sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP)

A incubação com atropina (1 μ M), antagonista de receptores muscarínicos, por 15 minutos não modificou de forma significativa o efeito vasorrelaxante do EHPP (300, 500 e 1000 μ g/ml), na ausência da atropina (6,1 \pm 5,1%; 12,9 \pm 7,4%; 50,0 \pm 6,5%) e na sua presença (0,4 \pm 0,3%; 2,1 \pm 1,3%; 40,6 \pm 6,9%), como demonstrado na Figura 3.

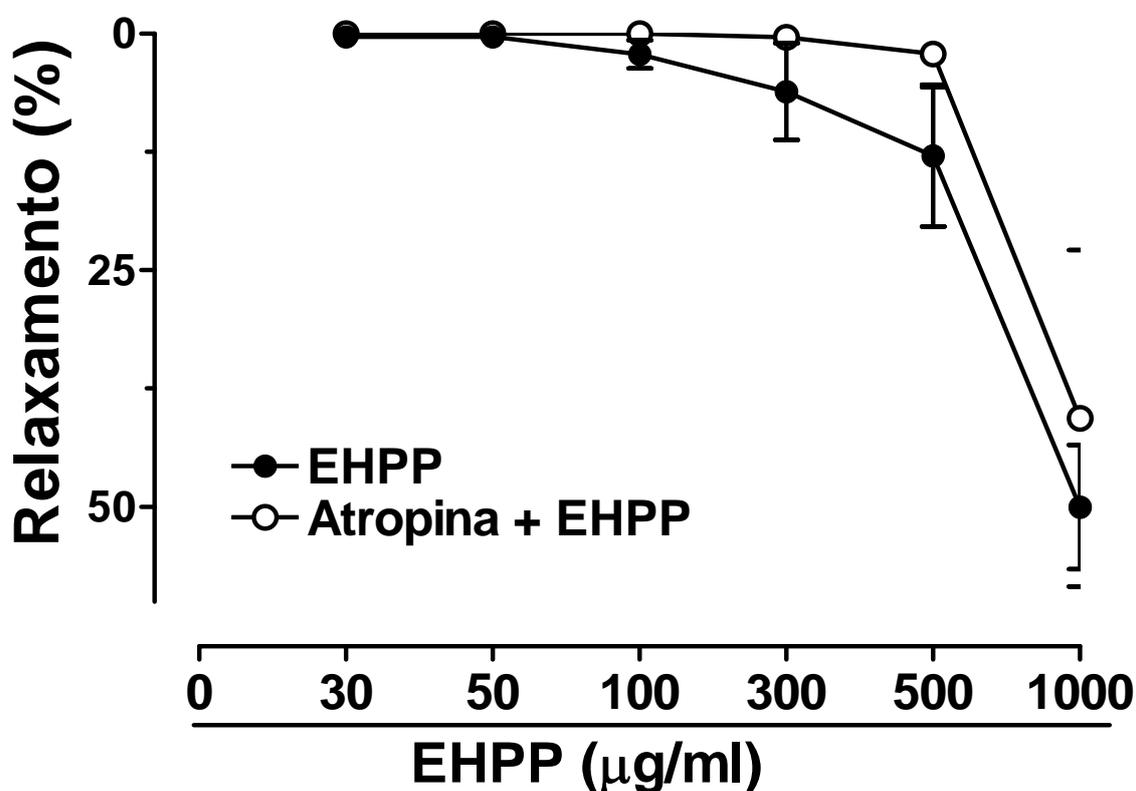


Figura 3: Efeito da atropina sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato. O efeito relaxante vascular induzido pelo EHPP (300, 500 e 1000 μ g/ml) foi avaliado na ausência e na presença da atropina (1 μ M), antagonista de receptores muscarínicos. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.3 Participação do óxido nítrico no relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato

O EHPP nas concentrações de 300, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, promoveu relaxamento vascular nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ($1\mu\text{M}$) ($3,7 \pm 1,9\%$; $8,3 \pm 3,1\%$; $39,5 \pm 3,2\%$, respectivamente). Este efeito foi totalmente inibido na presença do L-NAME ($10\mu\text{M}$; $0,2 \pm 0,1\%$), um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase, conforme ilustrado na Figura 4.

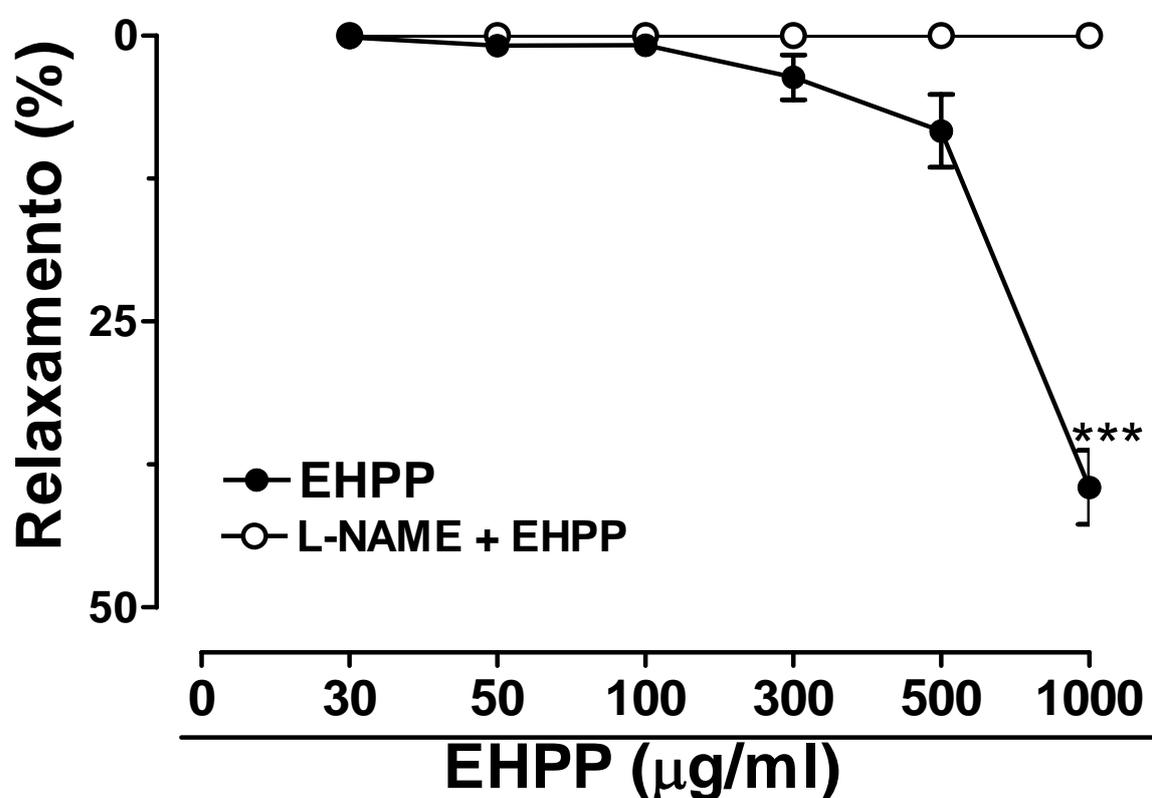


Figura 4: Efeito do inibidor da enzima óxido nítrico sintetase sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato. O gráfico apresenta o relaxamento vascular produzido pelo EHPP (300, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) na ausência e na presença do L-NAME ($10\mu\text{M}$). Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos $***p < 0,001$, em relação ao EHPP na ausência do L-NAME. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.4 Efeito do inibidor da enzima guanilato ciclase sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP)

Nestes experimentos, o relaxamento vascular promovido pelo EHPP (1000 $\mu\text{g/ml}$) na ausência do ODQ (10 μM ; $40,7 \pm 5,4\%$) foi praticamente abolido na presença deste inibidor da enzima da guanilato ciclase ($2,2 \pm 1,6\%$), conforme ilustrado na Figura 5.

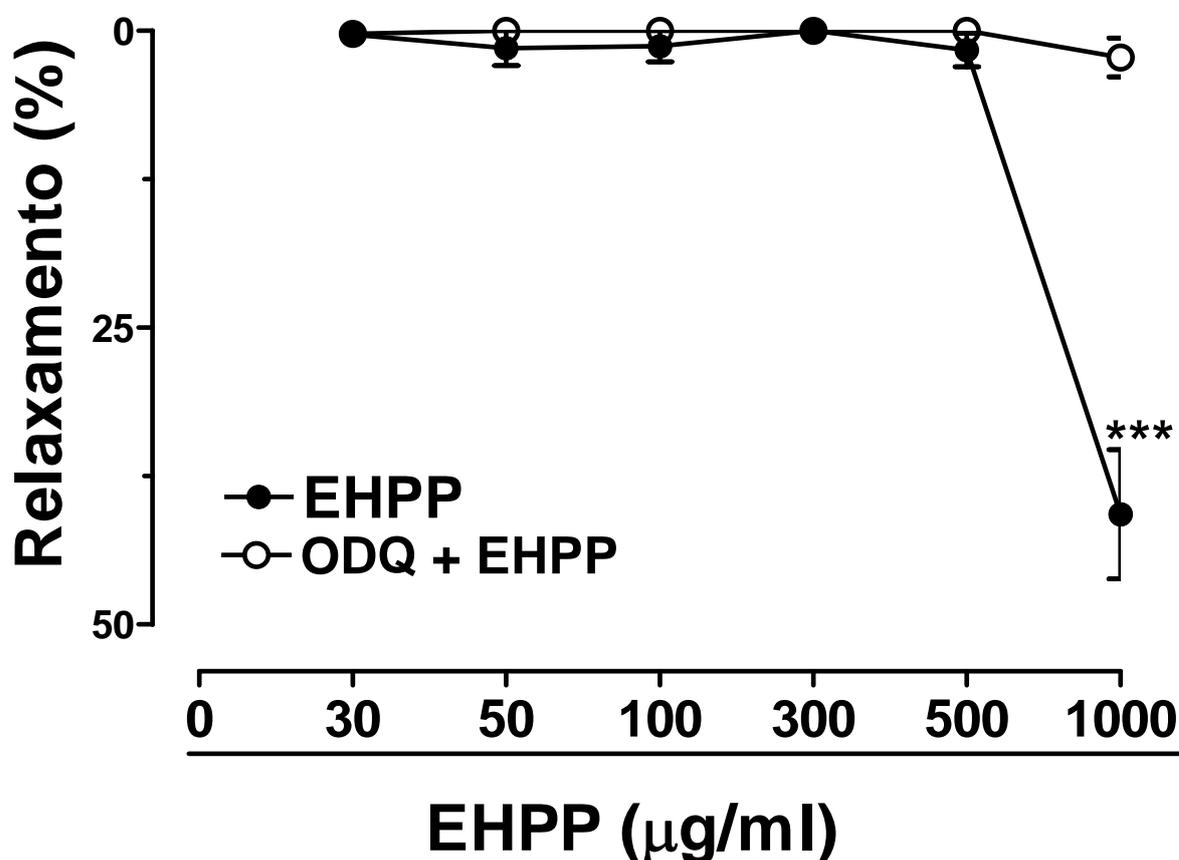


Figura 5: Efeito do inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato. Os efeitos relaxantes do EHPP (1000 $\mu\text{g/ml}$) em preparações contraídas pela fenilefrina (1 μM) foram comparados com os efeitos do EHPP obtidos após incubação do ODQ (10 μM). Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos *** $p < 0,001$, em relação ao EHPP na ausência do ODQ. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.5 Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre o relaxamento vascular produzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP)

O efeito relaxante produzido pelo EHPP (500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$; $5,8 \pm 3,5\%$ e $51,6 \pm 8,0\%$ respectivamente) foi alterado na presença do tetraetilamônio (TEA, 10 mM). O relaxamento promovido pelo EHPP foi significativamente reduzido para $0,2 \pm 0,1\%$ e $20,4 \pm 7,3\%$ respectivamente, conforme ilustrado na Figura 6.

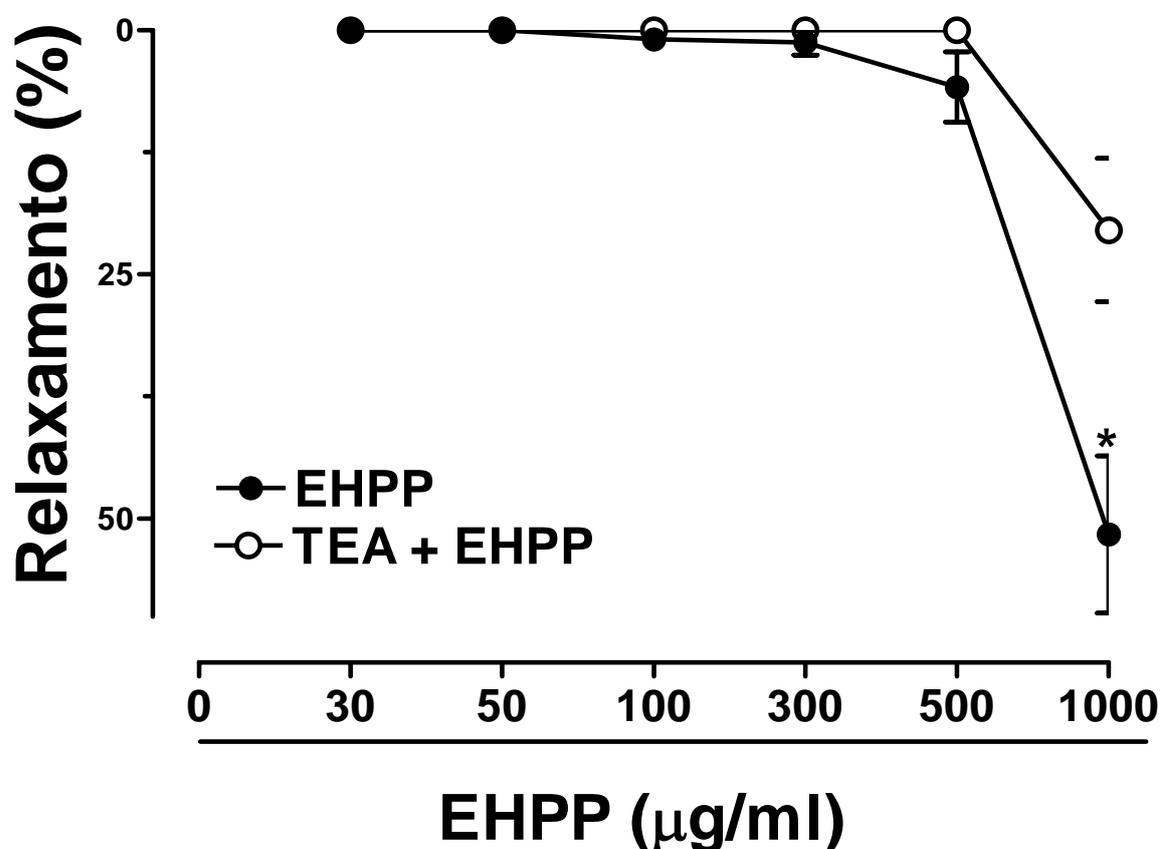


Figura 6: Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre o relaxamento vascular induzido pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em anéis de aorta de rato. O relaxamento vascular produzido pelo EHPP (500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) em anéis de aorta previamente incubados com o tetraetilamônio (TEA; 10 mM) foram comparados às respostas relaxantes do EHPP (500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) obtidas antes da administração do bloqueador de canais de K^+ . Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao EHPP antes da incubação do TEA. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.6 Efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

Os animais controles apresentaram pressão arterial média (PAM) basal de $105,5 \pm 1,7$ mmHg. O tratamento via oral do extrato bruto hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) nas doses de 30, 100, e 300 mg/Kg foi capaz de promover uma redução da pressão arterial média (PAM) em $17,4 \pm 1,98$; $23,5 \pm 2,7$ e $27,1 \pm 2,8$ mmHg em relação à PAM basal (Figura 7).

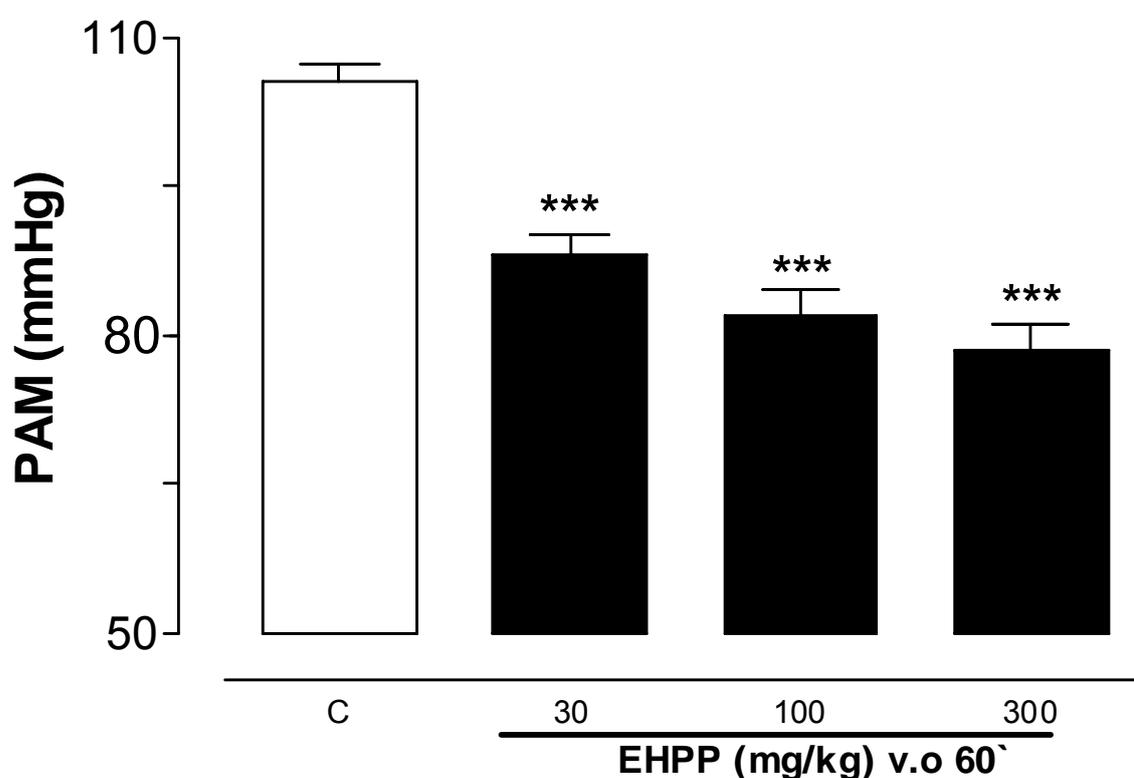


Figura 7: Efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados. A redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao protocolo da pressão arterial em ratos anestesiados, 60 minutos após a administração do EHPP, mostra a alteração da PAM induzida pela administração do extrato nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.7 Tempo de resposta do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

O registro da pressão arterial em ratos anestesiados foi realizado 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após a administração do EHPP pela via oral (v.o). A dose de 100 mg/kg do EHPP causou uma redução dos níveis pressóricos de $11,21 \pm 2,8$; $23,54 \pm 2,7$; $14,77 \pm 1,4$; $13,89 \pm 2,2$; $1,81 \pm 1,1$ mmHg respectivamente ao tempo, em relação a PAM basal que foi de $109,5 \pm 2,5$ mmHg conforme ilustrado na Figura 8.

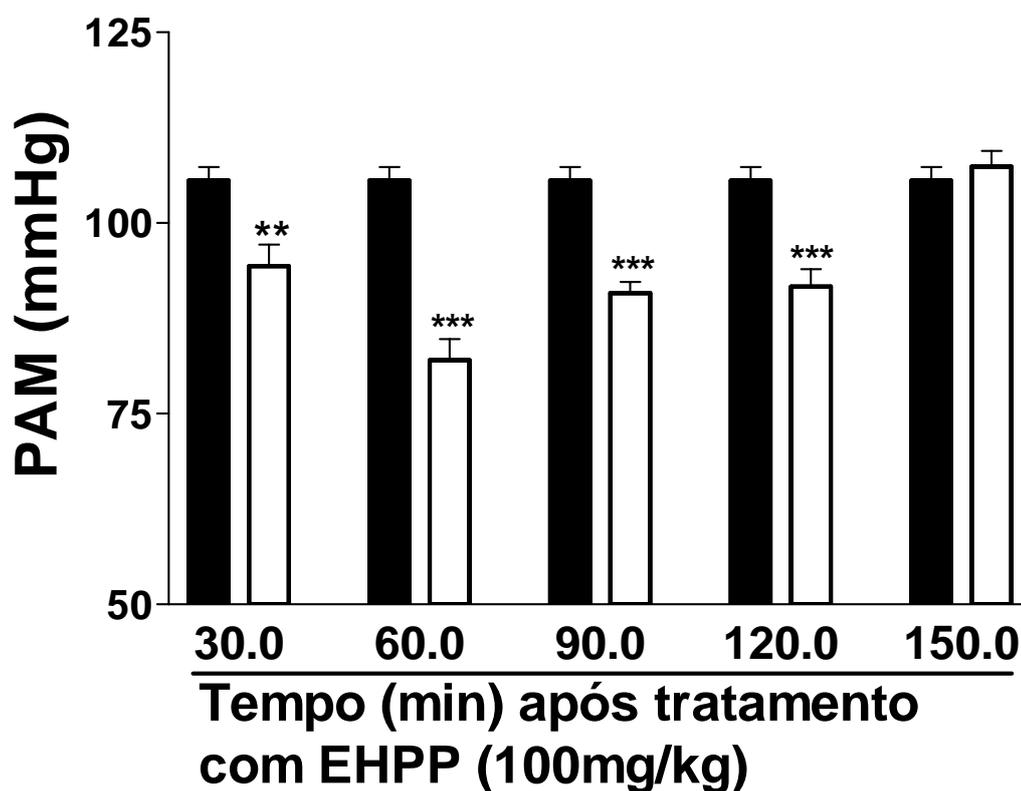
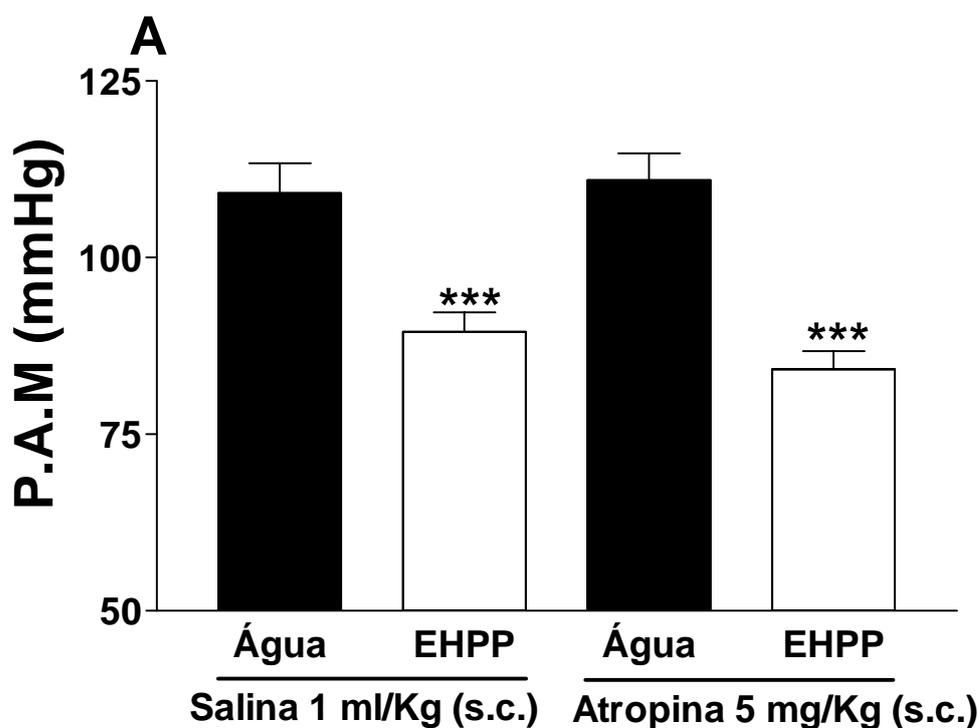


Figura 8: Efeito hipotensor em diferentes tempos de administração do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados. A redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em 6 animais submetidos ao protocolo da pressão arterial em ratos anestesiados, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após a administração do EHPP 100 mg/kg, mostra a redução da PAM nos diferentes tempos de administração do extrato. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.8 Efeito dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos normotensos

O tratamento com atropina 5 mg/kg pela via subcutânea (s.c) não interferiu na resposta ao EHPP (100 mg/Kg) administrado pela via oral (v.o). A queda da PAM induzida pelo EHPP antes e depois do tratamento deste antagonista muscarínico corresponde a $19,63 \pm 1,38$ mmHg e $26,75 \pm 1,26$ mmHg, respectivamente. A acetilcolina na dose de 30 nmol/kg, utilizado como controle positivo, reduziu os níveis pressóricos em $35,40 \pm 3,7$ mmHg antes do tratamento com a atropina. Entretanto, na presença da atropina, houve um forte bloqueio do efeito hipotensor deste agonista muscarínico. A redução da PAM correspondeu a $3,06 \pm 1,2$ mmHg quando comparada à PAM basal ($109,16 \pm 4,1$ mmHg), como mostrado na Figura 9, Painel A e B.



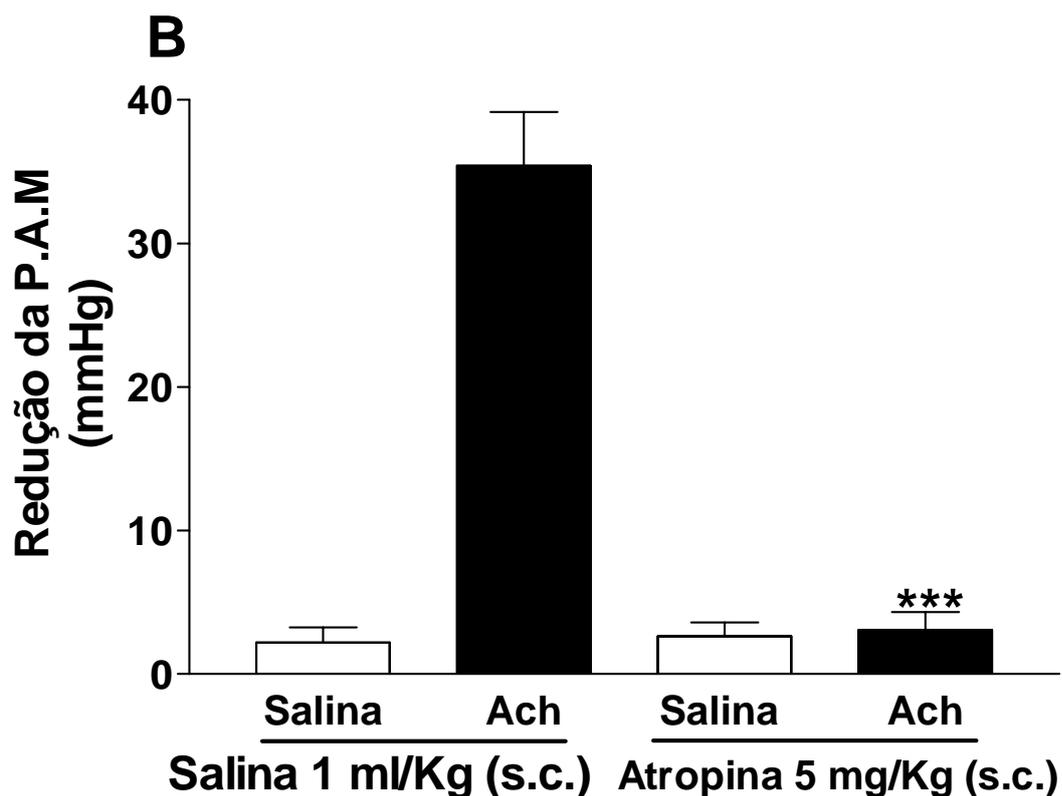


Figura 9: Efeito hipotensor do EHPP na presença e na ausência de antagonista muscarínico. Painel **A** - Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais, em resposta ao EHPP (100 mg/kg, v.o), antes e depois da administração da atropina (5 mg/kg, s.c). Painel **B** - Como controle positivo foi administrado ACh (30 nmol/kg, i.v), mostrando a redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais, em resposta a administração antes e depois da atropina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.9 Participação do óxido nítrico no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

A PAM dos animais pertencentes ao grupo controle foi de $103,50 \pm 2,32$ mmHg. Os animais tratados continuamente com L-NAME (7 mg/kg/min) tem a sua PAM alterada para $174,99 \pm 3,4$ mmHg. Ou seja, o L-NAME tem a capacidade de promover um estado de hipertensão aguda nos animais.

No grupo controle, a dose de 100 mg/kg do EHPP provocou uma redução da PAM correspondente a $21,48 \pm 0,4$ mmHg. Nos animais infundidos com o L-NAME (7mg/kg/min), um inibidor da NO sintase, ocorreu uma forte inibição (aproximadamente 98%) da resposta hipotensora do EHPP, a qual correspondeu a $0,2 \pm 0,1$ mmHg, como ilustrado na Figura 10.

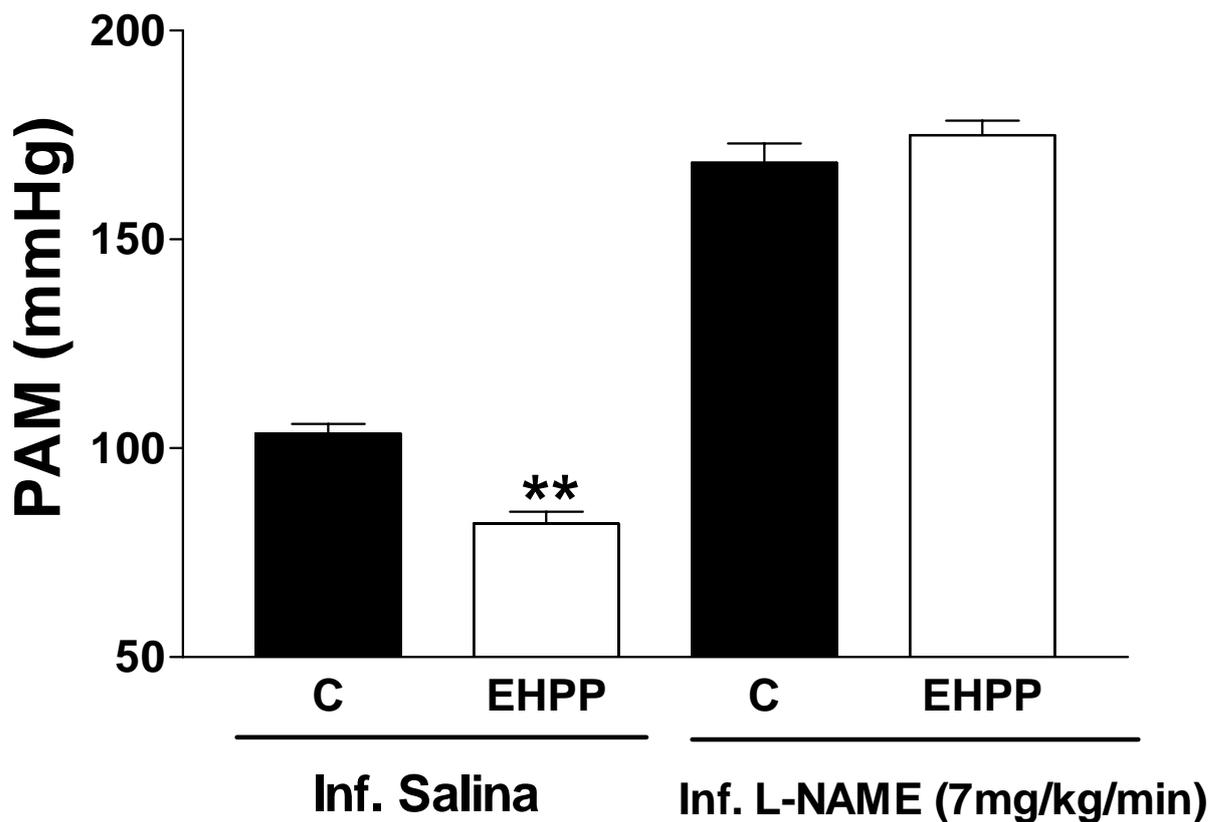


Figura 10: Bloqueio do efeito hipotensor do EHPP na presença do inibidor da óxido nítrico sintase. Os animais foram tratados com EHPP (100 mg/kg, v.o) e após foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da a infusão contínua de L-NAME (7 mg/kg/min). A resposta ao EHPP foi comparada na ausência e presença de L-NAME. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C).

4.10 Participação do Azul de Metileno no efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

O EHPP na dose de 100 mg/kg promoveu uma redução da PAM de $21,49 \pm 0,43$ mmHg nos animais controle (na ausência de azul de metileno – inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel). Nos animais infundidos com azul de metileno (150 nmol/kg/min) houve uma inibição da redução dos níveis pressóricos de $2,1 \pm 1,16$ mmHg promovido pelo EHPP, como ilustrado na Figura 11.

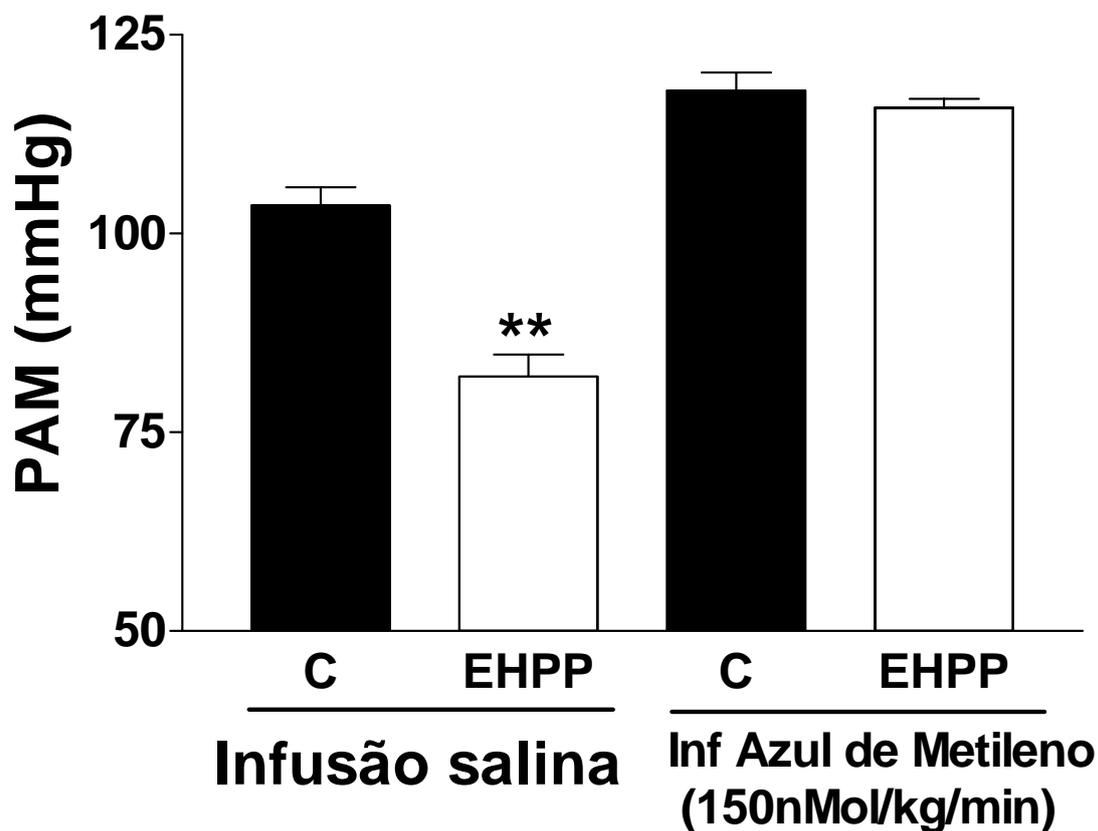


Figura 11: Efeito hipotensor do EHPP na presença do inibidor da enzima guanilato ciclase. Os animais foram tratados com EHPP (100 mg/kg, v.o) e após foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da a infusão contínua de azul de metileno (150 nmol/kg/min). A resposta ao EHPP foi comparada na ausência e presença do azul de metileno. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C).

4.11 Participação dos canais de Potássio na hipotensão causada pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

O tratamento com TEA (360 $\mu\text{mol/kg}$, i.v.), um bloqueador não seletivo de canais de potássio pela via intravenosa (i.v) não interferiu na resposta *in vivo* do EHPP (100 mg/Kg) administrado pela via oral (v.o). A queda da PAM induzida pelo EHPP antes e depois do tratamento deste bloqueador corresponde a $19,68 \pm 1,38$ mmHg e $22,37 \pm 1,22$ mmHg, respectivamente, como mostrado na Figura 12.

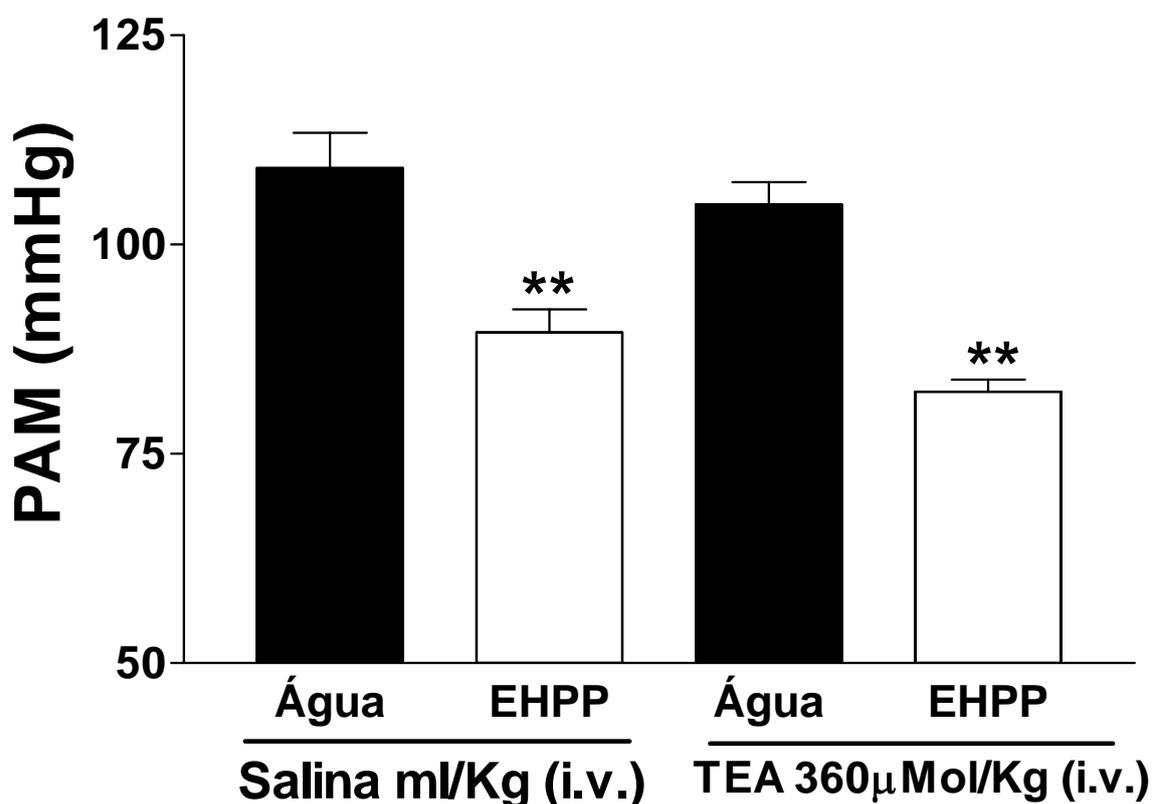


Figura 12: Efeito do bloqueador de canais de potássio sobre a ação hipotensora promovida pelo extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados. O efeito hipotensor produzido pelo EHPP (100 mg/kg) em ratos anestesiados na ausência e na presença do TEA (360 $\mu\text{Mol/kg}$), bloqueador não seletivo de canais de K^+ . Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C).

4.12 Efeito hipotensor da Rutina, composto isolado do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* L. (EHPP) em ratos anestesiados

Os animais utilizados nestes experimentos, apresentaram pressão arterial média (PAM) basal de $110 \pm 4,6$ mmHg. A administração da rutina por via intravenosa nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg reduziu a pressão arterial média (PAM) em $14,47 \pm 1,4$; $21,48 \pm 1,7$ e $29,38 \pm 2,8$ mmHg respectivamente em relação à PAM basal, conforme ilustrado na Figura 13.

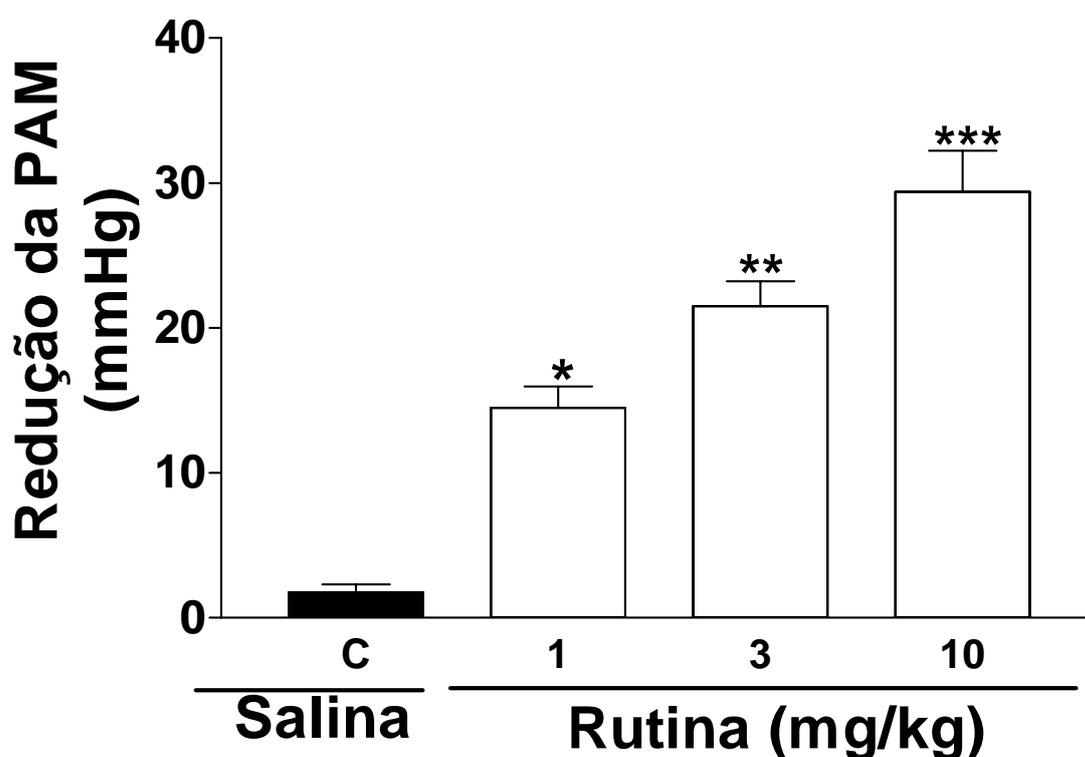


Figura 13: Efeito hipotensor da Rutina sobre os níveis pressóricos de ratos anestesiados. A rutina nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg, promoveu uma redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida de seis animais. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* apresenta atividade vasorrelaxante em aorta isolada de ratos e que uma única administração via oral do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* reduz significativamente a pressão arterial média de animais normotensos anestesiados. Além disto, a redução da pressão arterial parece envolver a presença da rutina no extrato hidroalcoólico de *P. paniculata*. Este estudo demonstrou também que as vias possíveis envolvidas nas ações vasorrelaxantes e hipotensoras do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* indicam a via do óxido nítrico e guanilato ciclase. Os resultados do presente estudo são relevantes uma vez que a *P. paniculata* é uma espécie que compreende plantas amplamente utilizadas pela população no Brasil, embora relativamente poucos estudos científicos validem a maioria das indicações do uso popular desta planta.

A *Polygala paniculata* L., conhecida popularmente como “barba-de-são-joão”, barba-de-bode, bromil, vassourinha branca e mimosa, tem seu chá utilizado na medicina popular para o tratamento da asma, bronquite crônica, demais afecções do aparelho respiratório, artrite, artrose, problemas renais, dor de estômago, diarreia, bem como tonificante (NEWALL *et al.*, 1996; LORENZI e MATOS, 2002).

Estudos anteriores realizados por Pizzolatti e colaboradores (2003) demonstraram que as frações diclorometano e etanólica do extrato bruto da *P. paniculata* apresentaram atividade tripanossomicida contra a forma epimastigota do parasita *Trypanossoma cruzi*. Outro trabalho, conduzido por

Farina e colaboradores (2005) constatou importante atividade neuroprotetora e antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata*, em relação a neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio. Estes trabalhos mostram claramente o potencial farmacológico da *P. paniculata*.

Sua ação para distúrbios gástricos já foi validada cientificamente através de estudos com o extrato bruto hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. que demonstrou sua atividade gastroprotetora pela via oral, a qual foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol 70% enquanto que a administração pela via intraperitoneal também apresentou importante efeito citoprotetor (LAPA et al, 2007).

Em relação à utilização da *Polygala paniculata* L. para o tratamento de desordens cardiovasculares, verificou-se no nosso trabalho que o extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) possui um efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos. A avaliação do mecanismo de ação da *P. paniculata* neste modelo *in vitro* permite a quantificação das interações com receptores específicos, inibitórios ou excitatórios, frente a agonistas-padrão, cujos mecanismos de ação são conhecidos. Este protocolo com a aorta isolada é importante, pois permite avaliar a influência do endotélio nos efeitos observados. A contração da musculatura lisa está sob influência direta de uma diversidade de fatores endógenos como neurotransmissores (noradrenalina), peptídeos de síntese plasmática ou endotelial (angiotensina, endotelina), substâncias endoteliais não-peptídicas (óxido nítrico, prostaglandinas). Assim, nossas observações em aorta isolada indicam que o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* apresentou importante efeito vasorrelaxante.

Vários fatores podem interferir direta ou indiretamente no controle da pressão arterial (GUYENET, 2006) e também em doenças cardiovasculares, dentre eles as células endoteliais têm um papel fundamental no controle do tônus vascular, pois sintetizam e liberam diversos mediadores capazes de promover a vasodilatação, como a prostaciclina (MONCADA & VANE, 1979), o óxido nítrico (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; HUTCHINSON et al, 1987) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FELETOU & VANHOUTTE, 1988). Um importante mediador endotelial que contribui ativamente para o controle da homeostase vascular é o óxido nítrico (NO), inicialmente denominado fator relaxante derivado do endotélio ((FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). O NO é uma molécula que apresenta enorme diversidade de funções fisiológicas. Dentre elas estão inclusos, além da ação vasodilatadora, a neurotransmissão e a imuno-modulação (MONCADA et al, 1991). O óxido nítrico é sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que utiliza como substrato o aminoácido L-arginina, e como cofatores o NADPH, Ca^{+2} , O_2 , TH_4 , FAD, FNM (STEVENS – TRUSS et al, 1997). O mecanismo relaxante do NO inicia-se com a difusão desta molécula a partir das células endoteliais, onde é produzido, para a musculatura lisa vascular, local em que parece promover modificações na interação dos filamentos de actina e miosina, e ainda modular a função de canais iônicos da membrana das células musculares lisas (ARCHER et al., 1994). A utilização de análogos inativos da L-arginina pode esclarecer a participação deste mediador no mecanismo vasorrelaxante, uma vez que estes inibem a síntese do NO. Na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ utilizada o EHPP promoveu um efeito relaxante em artérias com endotélio vascular preservado. A remoção da camada endotelial aboliu o relaxamento vascular (ver figura 2).

Indicando que o efeito relaxante do EHPP envolve a participação de substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. Nesse contexto, o envolvimento do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante induzido pelo EHPP foi avaliado por meio de inibidor da enzima óxido nítrico sintase, o L-NAME. Na presença desta substância, houve total inibição do efeito vasorrelaxante do EHPP, indicando o envolvimento do óxido nítrico no seu mecanismo relaxante em aorta isolada de rato.

O mecanismo vasorrelaxante do NO envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, presente nas células musculares lisas. Esta enzima, uma vez estimulada, promove a conversão do nucleotídeo GTP em GMPc (IGNARRO et al., 1987). O GMPc, por sua vez, ativa uma proteína quinase dependente de GMPc, a proteína quinase G (PKG), que pode fosforilar outra quinase, a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), inativando-a e produzindo o relaxamento da musculatura lisa vascular (LEE et al., 1997), constituindo uma possível via adicional para o relaxamento vascular pela PKG. O bloqueio à síntese do GMPc por meio de inibidores da enzima guanilato ciclase (como o azul de metileno ou o ODQ) impossibilita a ativação da PKG e o conseqüente relaxamento vascular. A participação do GMPc no mecanismo de ação vasorrelaxante do EHPP foi investigada com a utilização do ODQ. A presença do ODQ promoveu inibição total do efeito vasorrelaxante do EHPP, indicando o envolvimento desse segundo mensageiro em seu mecanismo de ação (ver Figura 5 e 6).

Neste estudo, a participação dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante produzido pelo EHPP foi avaliada por meio da utilização da atropina, antagonista de receptores muscarínicos. Na presença deste

antagonista não houve modificação significativa no efeito vasorrelaxante do EHPP (ver Figura 3), indicando que o mesmo não age nesses receptores para promover o seu efeito vascular. Outras estruturas celulares, como canais iônicos da membrana plasmática, podem estar envolvidas, em mecanismos adicionais importantes para o relaxamento vascular. É descrito que o óxido nítrico pode modular a ação de canais de potássio tanto através da PKG (ARCHER et al., 1994) como por ação direta sobre estes canais (MISTRY & GARLAND, 1998). O aumento da condutância dos íons K^+ hiperpolariza as células e reduz o influxo de íons Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} operados por voltagem, presentes na membrana celular (ARCHER et al., 1994). A redução do influxo de Ca^{+2} , por consequência da hiperpolarização, reduz também a atividade da MLCK (quinase da cadeia leve de miosina), a qual depende do complexo cálcio-calmodulina. Sem a fosforilação da cadeia leve de miosina pela MLCK, não há interação com os filamentos de actina, resultando no relaxamento da musculatura lisa vascular.

Por essa razão, investigou-se o envolvimento de canais de K^+ no efeito do EHPP. Foi utilizado o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo de canais de K^+ . A adição do EHPP aos anéis de aorta previamente expostos a este inibidor provocou uma inibição parcial do relaxamento vascular promovido pelo EHPP. A utilização do TEA sugere o envolvimento de canais de K^+ no mecanismo de ação do EHPP, pois inibiu em parte o seu efeito relaxante (ver Figura 6). Para uma investigação mais coerente com os resultados expostos na literatura e os obtidos neste estudo, torna-se necessário verificar a participação de outros inibidores destes canais iônicos: a glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de K^+ sensíveis ao ATP, a 4-aminopiridina, um bloqueador

seletivo de canais de K^+ ativados por voltagem, a apamina, inibidor seletivo de canais de K^+ de condutância baixa ativados pelo Ca^{+2} , SKca), a caribdotoxina (inibidor não seletivo de canais de K^+ de condutância larga, BKca, de condutância intermediária, IKca, e dependentes de voltagem, Kv) e a iberiotoxina (inibidor seletivo de canais de K^+ de condutância alta, BKca). Estes experimentos serão futuramente desenvolvidos em nosso laboratório.

Os modelos animais para estudo de anti-hipertensivos utilizam ratos que apresentam reatividade vascular muito semelhante às humanas. A interferência com a atividade destas substâncias, ao nível de receptores ou dos mecanismos intracelulares de transdução, modifica o equilíbrio intrínseco que mantém constante podendo alterar a resistência periférica e produzindo alterações na pressão arterial (REES et al, 1990). Além de interferir na atividade vasorrelaxante em órgão isolado, outros modelos como a medida da pressão arterial em ratos, atividade diurética, atividades da enzima-conversora da angiotensina podem evidenciar a importância do efeito da *P. paniculata* sobre o sistema cardiovascular.

O método de registro da pressão arterial média (PAM) em ratos com cateteres posicionados intra-arterialmente, fornece medidas precisas da força exercida pelo sangue nas paredes arteriais. Com o registro direto é possível analisar o transcurso temporal do efeito pressórico do EHPP, a intensidade do efeito no pico da ação e o tempo para o desaparecimento do efeito (ver Figura 7 e 8). O EHPP promoveu uma hipotensão significativa nas doses de (30, 100 e 300 mg/kg) quando administrados pela via oral. Na dose de 100 mg/kg do EHPP seu efeito hipotensor permaneceu por aproximadamente 2 horas.

A avaliação dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor do EHPP em ratos normotensos, por meio da utilização da atropina, antagonista de receptores muscarínicos, corroboram com os experimentos *in vitro*, mostrando que na presença deste antagonista não houve modificação significativa no efeito hipotensor do EHPP (ver Figura 9), indicando que o mesmo não age nesses receptores para promover o seu efeito vascular. Da mesma forma foi confirmado através dos experimentos *in vivo* e verificado a participação da via óxido nítrico – guanilato ciclase, através da administração contínua com L-NAME (7 mg/kg/min) e do azul de metileno (150 nmol/kg/min), promovendo uma inibição da redução dos níveis pressóricos induzidos pelo EHPP (ver Figura 10 e 11).

A investigação sobre o envolvimento dos canais de K^+ foi através da observação dos resultados *in vivo*, o tratamento com TEA (360 μ mol/kg), um bloqueador não seletivo de canais de potássio pela via intravenosa (i.v) não interferiu na resposta *in vivo* ao EHPP (100 mg/Kg) quando este foi administrado pela via oral (v.o), não promovendo nenhuma alteração na resposta hipotensora do EHPP (ver Figura 12).

O flavonóide, rutina, composto majoritário, do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. (EHPP) foi isolada e avaliada no modelo *in vivo*. Os flavonóides são extensamente encontrados na natureza, em sementes e grãos de várias frutas e vegetais, e também ocorrem diferentes plantas medicinais (TREASE, EVANS; 1996).

Essa importante classe de substâncias naturais apresenta um largo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas incluindo efeitos antioxidantes (RICE-EVANS et al; 1995), cardioprotetora (HOLLMAN et al;

1996., MARTÍNEZ-FLÓREZ et al; 2002), vasodilatadores (DUARTE et al., 1993), anti-inflamatórios, anticarcinogênicas (PATHAK et al., 1991), estimulante do sistema imunológico, anti-alérgicos, antivirais (MIDDLETON; KANDASWAMI; 1992). Um estudo sobre sua função como protetor das doenças do coração é através da prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade para a formação aterogênica, através da diminuição da adesão e agregação plaquetária e aumentando as propriedades vasodilatadoras (YAO et al.; 2004., MARTÍNEZ-FLÓREZ et al; 2002). Os flavonóides têm sido relacionados com uma redução na morte por doenças que atingem as artérias coronárias (HERTOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1996). De acordo com vários autores esses compostos têm potencial vasodilatador (HERRERA *et al.*, 1996) tanto na presença (LEMOS *et al.*, 1999) quanto na ausência de endotélio vascular (HERRERA *et al.*, 1996).

Compostos puros já foram isolados da *P. paniculata*, dentre eles as xantonas 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona e 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona. As xantonas naturais ou quimicamente sintetizadas possuem efeitos antihipertensivos e atividade vasorrelaxante (WANG *et al.*; 2002; FANG et al; 2006). Estudos recentes mostraram que a xantona 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona, isolada da planta *Halenia elliptica* possui efeito vasorrelaxante concentração dependente em anéis pré-contraídos de aorta. A remoção mecânica do endotélio reduziu seus efeitos relaxantes, sugerindo que seu mecanismo é dependente do endotélio. A incubação de L-NAME (inibidor da NO sintase) e do ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase) inibiram o efeito vasorrelaxante promovido pela 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona, sugerindo que seu mecanismo de ação seja observado através da via NO-GMPc (WANG

et al, 2007). Posteriormente, em estudo complementar realizado pelo mesmo grupo e através de experimentos *in vitro* utilizando a 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona, um metabólito ativo, demonstraram também possuir efeito vasorrelaxante (WANG et al, 2008).

A administração da rutina *in vivo*, composto isolado do EHPP, em ratos anestesiados pela via intravenosa, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg reduziu a pressão arterial média, promovendo um efeito hipotensor (ver Figura 13).

Nas últimas décadas, as atividades farmacológicas da rutina que é um bioflavonóide, pertencente ao sub-grupo dos flavanóides tem sido pesquisada e os seus resultados estão interessando as indústrias farmacêuticas.

Entre as importâncias terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, estão o da perda da acuidade visual e alterações do campo visual. Estes efeitos podem ser dela sozinha ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto sendo melhorada quando administrado junto com a rutina (PATHAK et al., 1991).

Em estudos realizados em íleos de cobaias (YILDIZOGLU e cols, 1991) foram observadas as ações da rutina como apresentando um efeito inibidor não competitivo da angiotensina II. Neste mesmo estudo foi observado em cólon de cobaia, a atividade de relaxamento do músculo liso, podendo ser atribuído à estas, as razões da melhora na permeabilidade capilar produzida pela rutina.

A rutina possui baixa solubilidade em água, mas quando degradada, possui um metabólito ativo, a quercetina, que é a molécula pelo qual a rutina deriva (BRUNETON, 1999).

Em geral os flavonóides que apresentam ligações glicosídicas são solúveis em meio aquoso e etanólico, como a quercetina, por apresentar um número maior de grupos de hidroxilas livres. Um pequeno número de compostos são parcialmente solúvel em água como é o caso da rutina (ALLUIS et al., 2000). Estudos *in vitro* desenvolvidos com a quercetina demonstraram que ela possui atividade anti-fibrótica (LEE et al., 2003), anticoagulante (BUCKI et al., 2003), anti-aterogênica (de WHALLEY et al., 1990, PEREZ-VICCAINO et al., 2006) e antihipertensiva (DUARTE et al., 2001, PEREZ-VICCAINO et al., 2006).

Fusi (2002) e colaboradores demonstraram que a quercetina possui atividade relaxante no músculo liso vascular *in vitro* e *in vivo*.

Segundo estudos de Afanas'ev (1989) e colaboradores, ao pesquisarem a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, concluíram que estes flavonóides tem uma ação terapêutica em patologias que envolvem radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina. Podem inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios, por reagirem com o íon superóxido e radicais peroxilas lipídicos, e por formarem um complexo com ferro, que é um catalisador da formação de radicais de oxigênio ativo (PATHAK, 1991; YOKOZAWA et al, 1997).

Em síntese, os resultados do presente trabalho, demonstram que o EHPP possui atividade vasorrelaxante *in vitro* e efeito hipotensor em ratos anestesiados, sugerindo a possível ação da rutina no efeito hipotensor.

Apesar deste importante resultado, estudos adicionais devem ser realizados com finalidade de caracterizar de forma mais detalhada os mecanismos de ações envolvidos neste efeito.

Estudos adicionais deverão também ser realizados para a confirmação do preciso mecanismo de ação envolvido na atividade hipotensora do EHPP e da rutina. Estudos químicos estão em progresso para caracterizar outros compostos, que talvez contribuam com o potencial hipotensor do EHPP.

Neste contexto, o resultado obtido neste estudo nos fornece base farmacológica para utilização da *Polygala paniculata* L , indicando seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades vasorrelaxante.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que:

- A *Polygala paniculata* L possui um ou mais componentes químicos capazes de promover relaxamento vascular;
- O extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L (EHPP) induz relaxamento vascular;
- O relaxamento vascular promovido pelo EHPP é dependente do endotélio vascular;
- Esse efeito vasorrelaxante não envolve a ação sobre receptores muscarínicos;
- O relaxamento vascular induzido pelo EHPP é totalmente dependente da produção do óxido nítrico pela NOS endotelial, bem como da estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel;
- O extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L (EHPP) promove hipotensão quando administrado pela via oral;
- A rutina é o provável componente químico responsável pelo efeito hipotensor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHER, S. L, HUANG, J. M, HAMPL, V, NELSON, D. P, SHULTZ, P. J, WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(16): 7583-7 1994.

AFANAS´EV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.38, n.11, p.1763-1769, 1989.

ALLUIS, B.; PÉROL, N.; EL HAJJÍ, H.; DANGELES, O. Water-soluble flavonol (=3-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: chemical synthesis, colouring and antioxidant properties. **Helv. Chim. Acta**, Weinheim, v.83, p.428-443, 2000.

BAGHERI, H.; BROUE, P.; LACROIX, I.; LARREY, D.; OLIVES, J. P. ; VAYSSE, P. ; GHISOLFI, J. ; MONTASTRUC, J. L. Fulminant hepatic failure after herbal medicine ingestion in children. **Therapie**, v.53, n.1, p.82-83, 1998.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.8, p.281-286, 2004.

BRUNNER, F.; BRÁS-SILVA, C.; CERDEIRA, A. S.; LEITE-MOREIRA, A. F. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v.111, p.508 – 531, 2006.

BRUNETON, J. Flavonoids. In. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal Plants**. 2 ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, p. 225-405, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33 n.2, p.179-189, 2001.

CALIXTO, J. B. YUNES, R. A. Medicamentos fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Editora Argos. pp.297-315, 2001.

CAMPOS, O. P. R., SANTOS, A. R. S., VAZ, Z. R., PINHEIRO, T. R., PIZZOLATTI, M. G., CHECHINEL, F. V., MONACHE, F. D., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Sci**. v. 61, pp. 1619- 1630, 1997.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. **Circulation** v.101, pp.329–335, 2000.

CERVELLATI, R., INNOCENTI, G., DALL'ACQUA, S., COSTA, S., SARTINI, F. Polyphenols from *Polygala* spp. And their antioxidant activity. **Chem. Biodivers**, 3: 415-425, 2004.

CIRIGLIANO, M.; SUN, A. Advising patients about herbal therapies. **The journal of the American Medical Association**., v 280, No 18- 1565, 1998.

CORDELL, G. Phytochemistry, 2000, 55, p.463. In: CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Santa Catarina: ed. Argos, 2001, pp. 77-99.

CHUNG, I. W.; MOORE, N. A.; OH, W. K.; O'NEIL, M. F.; AHN, J. S.; PARK, J. B.; KANG, Y.S. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, n.1-2, pp.191-195, 2002.

CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E.; SANTOS, A. J. O; COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P. H.; YAGILQ, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v.417, n.20, pp.822-828, 2002.

CRISTIANO, R.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE F.M.; REZENDE C.M.; BRANCO, A. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Z. Naturforsch [C]**, v.58, n.7-8, pp.490-494, 2003.

DALL'ACQUA, S.; INNOCENTI, G.; VIOLA, G.; PIOVAN, A.; CANIATO, R.; CAPPELLETTI, E. M. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chem. Pharm.B ull.**, v.50, n.11, pp.1499-1501, 2002.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2-drug interactions. **Adverse Drug React Toxicol Rev**, v.12, n.3, pp.147-162, 1993.

DESBENE S. ; HANQUET B. ; SHOYMA Y. ; WAGNER H. ; LACAILLE-DUBOIS M.A. Biologically active triterperne saponins from callus tissue of *Polygala amarelle*. **J.Nat. Prod.**, v.62, n.6, pp.923-926, 1999.

DI STASI, L. C. Arte, Ciência e Magia In: **Plantas Mediciniais : Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: ed. UNESP, 1996, 15-21.

DUARTE, J, PEREZ VIZCAINO, F, UTRILLA, P, JIMENEZ, J, TAMARGO, J, ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. **Gen Pharmacol** 24(4): 857-62 1993.

DUARTE, F.S., DUZZIONI, M., MENDES, B.G., PIZZOLATTI, M.G., De LIMA, T.C. Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 86: pp.150-161, 2007.

DUARTE, F.S., MARDER, M., HOELLER, A.A., DUZZIONI, M., MENDES, B.G., PIZZOLATTI, M.G., De LIMA, T.C. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology (Berl)** 197(3): 351-360, 2008.

DREW, A. K. MYERS, S. P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **Med J Aust**, v.166 n.10, pp.538-541, 1997.

EDELSON, J.T.; WEINSTEIN, M. C.; TOSTESON, A. N.; WILLIAMS, L. LEE, T. H.; GOLDMAN, L. Long-term cost-effectiveness of various initial monotherapies for mild to moderate hypertension. **JAMA – The Journal of the American Medical Association**, v.263, pp.407-413, 1990.

EGASHIRA, N. LI, J. C. MIZUKI, A. YAMAUCHI, K. MATSUDA, T. OSAJIMA, M. MATSUSHITA, M. MISHIMA, K. IWASAKI, K. HARA, S. ONO, N. NISHIMURA, R. NOHARA, T. FUJIWARA, M. Antagonistic effects of methanolic extract of *Polygala telephioides* on morphine responses in mice. **J Ethnopharmacol** 104(1-2): 193-8 2006.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, Darcy (Ed.) **Suma Etnológica Brasileira**. Petrópolis, RJ: Vozes, v.1, 1997. Etnobiologia.

EL SAYAH, M., CHECHINEL FILHO, V., PINHEIRO, T. R., YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitised trachea from guinea pig. **Inflamm Res.**, v.48, n.4, pp.218-223, 1999.

ESTRADA, A.; KATSELIS, G. S.; LAARVELD; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities saponins from *Polygala senega*. **Comp. Immunol.Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, n.1, pp.27-43, 2000.

FANG, L. H.; MU, Y. M.; LIN. L. L.; XIAO. P. G.; DU, G. H. Vasorelaxant effect of euxanthone in the rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**. v.45, pp. 96-101, 2006.

FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; DAFRÉ, A.L.; SANTOS, A. R. S. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57,pp.1-6, 2005.

FARNSWORTH, N. R., BINGEL, A. S. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Springer: New York; pp. 61-73, 1997.

FRANCO, J. L, BRAGA, H. C, STRINGARI, J, MISSAU, F. C, POSSER, T, MENDES, B. G, LEAL, R. B, SANTOS, A. R, DAFRE, A. L, PIZZOLATTI, M. G, FARINA, M. Mercurial-Induced Hydrogen Peroxide Generation in Mouse Brain Mitochondria: Protective Effects of Quercetin. **Chem Res Toxicol** 20: (12) 1919-1926, 2007.

FRANKE, R. **Theoretical drug design methods**. Pharmacochemistry, Elsevier, 7, 1984. 412 p.

FELETOU, M.; P. M. VANHOUTTE. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol** 93(3): 515-24 1988.

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

GENTRY, A.H. **A field guide to the families and genera of woody plants of northwest south America (Colombia, Ecuador e Peru)**. Chicago: The University of Chicago Press. pp.689-693, 1996.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P.J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.19, pp.417-428, 1997.

GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C.; HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, v.308, n.5960, pp.645-647, 1984.

GUYENET, P. G. The symphathetic control of blood pressure. **Nature**, v.7, pp.335-346, 2006.

GUYTON, A. C. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v.252, n.5014, p.1813-1816, 1991.

HAMBURGER, M, GUPTA, M, HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Méd.** 51: (3) 215-7 1985.

HERRERA, M. G.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; MARHUENDA, E.; DUARTE, J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. **Gen Pharmacol**, v.27, n.2, pp.273-277, 1996.

HERTOG, M. G. HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr Cancer**, v.20, n.1, pp.21-29, 1993.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.**, Amsterdam, v.57, n.1, pp. 43-46, 1996.

HORN, R.C., VARGAS, V.M.F. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the salmonella/microsome assay. **Mutagenesis** 18: 113–118, 2003.

HUTCHINSON, P. J, PALMER, R. M, MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol** 141(3): 445-51 1987.

JACOB, H. J. Physiological genetics: Application to hypertension research. **Clin. Exp. Pharm. Phys.** v.26, p.530–535, 1999.

JIANG, Y. P. F. Tu (2002). Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry** 60(8): 813-6.

JOHANNESSON, M. The cost-effectiveness of hypertension treatment in Sweden. **Pharmacoeconomics**, v.7, pp.242-250, 1995.

KAKAR, P.; LIP, G. Towards understanding the aetiology and pathophysiology of human hypertension: where are we now? **Journal of Human Hypertension**, p.1–4, 2006.

KATUSIC, Z, S. Back to the salt mines – endothelial dysfunction in hypertension and compensatory role of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). **Journal of Physiology**, 543) Pt1, 1, 2002.

KAWASHIMA, K, MIYAKO, D, ISHINO, Y, MAKINO, T, SAITO, K, KANO, Y. Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biol Pharm Bull** 27(8): 1317-9 2004.

KIM, H.; KONG, H.; CHOI, B.; YANG Y.; KIM, Y.; LIM, M.J.; NECKERS, L.; JUNG, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. **Pharm. Res.**, v.22, n.9, pp.1499-1509, 2005.

KOU J.; MA R.; ZHU D.; YAN Y. Blood-activating and anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. **Zhong Yao Cai.**, v.26, n.4, pp. 268-71, 2003.

KNEKT, O. JARVINEN, R.; REUNANEM, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in skeletal muscle microcirculation. **Circ Res**, v.57, n.2, pp. 529-534, 1991.

KU, Y. H. Role of limbic peptidergic circuits in regulation of arterial pressure, relevant to development of essential hypertension. **Neuropeptides**, pp.1-10, 2006.

LAPA, F. R., FREITAS, C. S., BAGGIO, C. H., MISSAU, F. C., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A. R. S. MARQUES, C. A. M. (2007) Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **J.Pharm. Pharmacol.** 59: 1-7.

LEE, M. R, LI, L, KITAZAWA, T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. **J Biol Chem** 272(8): 5063-8 1997.

LEE, C. R.; WATKINS, M. L.; PATTERSON, J. H.; . GATTIS, W.; O'CONNOR, C. M.; GHEORGHIADE, M.; ADAMS, K. F. JR. Vasopressin: A new target for the treatment of heart failure. **American Heart Journal**, v.146, n.1, p.9-18, 2003.

LEE, H.J.; BAN, J.Y.; KOH, S.B.; SEONG, N.S.; SONG, K.S.; BAE, K.W.; SEONG,Y.H. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. **Am. J. Chin. Med.** v.32, n.4, pp.599-610, 2004.

LEMOS, V. S.; FREITAS, M. R.; MULLER, B.; LINO, Y. D.; QUEIROGA, C. E.; CORTES, S. F. Dioclein, anew nitric oxide-and endothelium-dependent vasodilatador flavonoid. **Eur j Pharmacol**, v.386, n.1, pp.41-46, 1999.

LIN, L. L, HUANG, F, CHEN, S. B, YANG, D. J, CHEN, S. L, YANG, J. S, XIAO, P. G. Xanthones from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. **Planta Med** 71(4): 372-5 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais do Brasil**. São Paulo, p.386,2002.

LUDTKE, R, MIOTTO, S.T. S. *Polygala riograndensis* (Polygalaceae), a new species from Southern Brazil. **Novon** 17 (1): 40-42, 2007.

MACGREGOR, G.A., WEBB-PEPLOE, K.M. A hypertension in the Elderly, **Am J Geriatr. Cardiol.** 9 (3): 130-137, 2000.

MALUENDAS, E. W. B.; PEITZ, C. Yerbalatina Phytoativos, a menor distância entre você e a natureza. In: JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. Santa Catarina: Sociedade Paranaense de Plantas Mediciniais, 2004, pp. 208-211.

MAK, N. K.; LUNG, H. L.; WONG, R. N.; LEUNG, H. W.; TSANG, H. Y.; LEUNG, K.N. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. **Planta Med.**, v.67, n.5, pp.400-405, 2001.

MAR F, J.; RODRÍGUEZ-ARTALEJO, F. Which is more important for the efficiency of hypertension treatment: hypertension stage, type of drug or therapeutic compliance? **Journal of Hypertension**, v.19, n.1, pp.149-155,2001.

MARTINS, E.R.; et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, pp.13-30, 2000.

MARTINEZ-CROVETTO, Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino. **America Indigena**, v.472, pp.79–93, 1987.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M. J. Revisión: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, Madrid, v.17, n.6, pp.271-278, 2002.

MEOTTI, F.C., ARDENGHI, J.V., PRETTO, J.B., SOUZA, M.M., MOURA, J.D., CUNHA, A. J., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **J.Pharm. Pharmacol.** 58: 137-142, 2006.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory function. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.43, pp.1167-1179, 1992.

MISTRY, D. K.; GARLAND, C. J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol** 124(6): 1131-40 1998.

MONCADA, S, PALMER, R. M, HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43(2): 109-42 1991.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v.263, n.5579, pp.663-665, 1979.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, pp.1022-1037, 2003.

NEWALL, A.C., ANDERSON, A.L., PHILLIPSON, D.J. Herbal Medicines: A Guide For Health-Care Professionals. **The Pharmaceutical Press**, London, pp. 241, 1996.

OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal Ethnopharmacology**, v.34, n.1, pp.29-41, 1991.

OPIE, L. H. **The Heart-Physiology, from cell to circulation**. Philadelphia – New York, Raven, 1998.

PASTORE, J. F. B., CAVALCANTI, T. B. A new species of *Polygala* (Polygalaceae) from Brazil. **Novon** 18 (1): 90-93, 2008.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.57, n.5, pp.371-389, 1991.

PINHEIRO, T.R., CHECHINEL, F.V., SANTOS, A. R.S., CALIXTO, J.B., DELLE MONACHE, F. PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry** 48: 725-728, 1998.

PIZZOLATTI, M. G, LUCIANO, C, MONACHE, F. D. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry** 55(7): 819-22 2000.

PIZZOLATTI, M. G. KOGA, A. H. GRISARD, E. C. Steindel, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine** 10 (5): 422-6, 2003.

REES, D.D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** v. 101, pp. 746-752, 1990.

REIS, M. S. dos; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.45-74, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.22, n.4, pp. 375-383, 1995.

SCHIFFRIN, E. L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 38 suppl 2:S3-6, 2001.

SCHULTES, R.E., RAFFAUF, R.F. **The Healing Forest. Dioscorides Press.** 1990.

SIMÕES, C. M. O. S. E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Rio Grande do Sul. (2001).

STEVENS-TRUSS, R., K. BECKINGHAM, MARLETTA, M. A. Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. **Biochemistry** 36(40): 12337-45 1997.

SUZUKI, A., KAGAWA, D., FUJII, A., OCHIAI, R., TOKIMITSU, I., SAITO, I. Short and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, 15: 351-357, 2002.

TESTAI, L., CHERICONI, S., CLADERONE, V., NENCIONI, G., NIERI, P., MORELLI, I., MARTINOTTI, E. Cardiovascular effects of urtica dioica L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. **J Ethnopharmacol**, 81: 105-109, 2002.

TREASE, G.E; EVANS, W.C. Phenols and phenolic glycosides. In: _____. **Pharmacognosy**. 14. ed. London: W. B. Saunders, pp. 218-254, 1996.

TRENTINI, A. M.; YAMADA, C. B. Indústria de Fitoterápicos – Case Herbarium. In: In: JÚNIOR, C. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas**. Santa Catarina: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais, pp. 202-207, 2004.

TODA, N., AYAJIKI, K., OKAMURA, T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. **Pharmacol Rev**, 59: 54-87, 2007.

VAINIO, H., BIANCHINI, F., Prevention of disease with pharmaceuticals. **Pharmacol. Toxicol**, 88(3): 111-118, 2001.

VARGAS, V. M.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of plant extracts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 86 Suppl 2: pp.67-70, 1991.

VORA, C.; MANSOOR, G.A., WHITE, W.B. Sodium intake in elderly hypertensives and outpatient compliance with low sodium diet. **American Journal of Hypertension**. Vol 18 Suppl 1: pp 215, 2005.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, Dordrecht, v.59, pp.113-122, 2004.

YILDZOGLE-ARI, N.; ALTAN, V. M.; ALTINKURT, O.; OZTURK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytother. Res.**, Borgnor Regis, v.5, n.1, pp.19-23, 1991.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z. W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytother. Res.**, Borgnor Regis, v.11, n.1, pp.446-449, 1997.

YUNES, R. A, KUROSHIMA, K. N, de CAMPOS, F, de SOUZA, M. M, DELLE MONACHE, F, CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Z Naturforsch [C]**. 56: (9-10) 703-6 2001.

YUSUF, S.; REDDY, S.; OUNPUU, S.; ANAND, S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. **Circulation**, v.104, pp. 2746–2753, 2001

WANG, L. W.; KANG, J. J.; CHEN, I. J.; TENG, C. M.; LIN, C. N. Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v. 10, p. 567-572, 2002.

WANG, Y.; SHI. J.G.; WANG. M. Z.; CHE. C. T.; YEUNG. J. H. K. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1-hydroxy-2,3, 5-trimethoxy-xanthone, isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. **Life Sciences**, v. 81, p. 1016- 1023, 2007.

WANG, Y.; SHI. J.G.; WANG. M. Z.; CHE. C. T.; YEUNG. J. H. K. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxy-xanthone, an active metabolite of 1-hydroxy-2,3, 5-trimethoxy-xanthone isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. **Life Sciences**, v. 82, pp. 91-98, 2008.