

ARQUIMEDES GASPAROTTO JUNIOR

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES E RENAIIS DE *Tropaeolum majus* L.
(TROPAEOLACEAE) EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como pré-requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

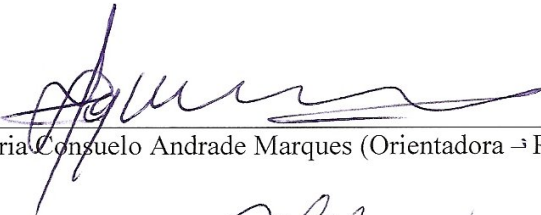
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Consuelo A. Marques
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cândida A. Leite Kassuya

**CURITIBA
2010**

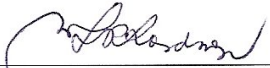


PARECER

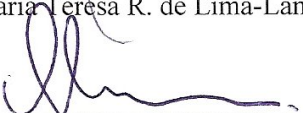
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado "AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS DE *Tropaeolum majus* L. EM RATOS", de autoria do pós-graduando **ARQUIMEDES GASPAROTTO JUNIOR**, sob orientação da Prof^a Dr^a Maria Consuelo Andrade Marques (UFPR) e composta pelos professores: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa R. de Lima-Landman (UNIFESP), Prof. Dr. Orlando Seiko Takemura (UNIPAR), Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (UFSC) e Prof. Dr. Daniel Fernandes (UEPG – PR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 2 de setembro de 2010.



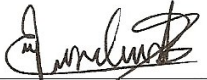
Prof^a Dr^a Maria Consuelo Andrade Marques (Orientadora → Presidente – UFPR)



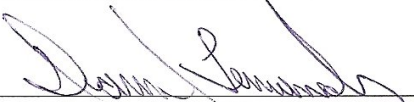
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa R. de Lima-Landman (UNIFESP)



Prof. Dr. Orlando Seiko Takemura (UNIPAR)



Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (UFSC)



Prof. Dr. Daniel Fernandes (UEPG – PR)

A minha esposa (Francielly) pelo carinho, incentivo, amor e dedicação a nossa família.

Aos meus pais (Arquimedes e Edite) pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Thiago, Francielli e Kelly pelo companheirismo, amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e coragem para nunca desistir, por sempre ter iluminado minhas atitudes para que eu tomasse a melhor decisão, e por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me ajudaram de muitas formas no desenvolvimento desse trabalho.

À professora Dra. Maria Consuelo Andrade Marques, minha estimada orientadora, pela oportunidade, apoio, exemplo de vida e de perseverança.

À professora Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya, minha co-orientadora e amiga, que sempre colaborou de forma valorosa com meu trabalho.

Ao professor Dr. José Eduardo da Silva Santos pelas valorosas sugestões, incentivo e colaboração.

Ao meu amigo Emerson (Cambé) pela convivência, risadas, apoio, companheirismo e substancial incentivo.

A minha amiga Irinéia pelo companheirismo e apoio sempre que necessário.

As minhas amigas Sandra e Priscila, muito obrigada pela colaboração, incentivos e desabafos.

À Yanna, minha colega de doutorado, pela colaboração imprescindível.

Aos professores Silvia Lachinni (USP), Diógenes Aparício Garcia Cortez e Adelar Bracht (UEM) por ter me ajudado imensamente na conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas do departamento de farmacologia da UFPR, por dividirem comigo bons e maus momentos.

Aos meus companheiros da UNIPAR, que durante estes quatro anos me permitiram identificar quais são meus verdadeiros amigos e, estes sempre estiveram comigo.

Aos animais meu respeito e gratidão.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho.

*“.... Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.*

*Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas...”*

(Pablo Neruda)

SUMÁRIO

	Lista de Tabelas	i
	Lista de Abreviaturas	ii
	Lista de Figuras	iii
	Resumo	iv
	Abstract	v
I	INTRODUÇÃO	21
1.1	Hipertensão arterial sistêmica	26
1.2	Produtos naturais e hipertensão	34
1.3	<i>Tropaeolum majus</i> L.	38
1.3.1	Descrição botânica	38
1.3.2	Distribuição e sinonímia	39
1.3.3	Etnobotânica e composição química	39
1.3.4	Propriedades farmacológicas e toxicidade	41
II	HIPÓTESE	43
III	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
IV	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Material botânico	46
4.2	Preparo dos extratos	47
4.2.1	Obtenção dos extratos aquosos (infuso)	47
4.2.2	Obtenção do extrato bruto etanólico (HETM)	47
4.3	Preparo e obtenção da fração purificada livre de sacarose (TMLR)	48
4.4	Análise fitoquímica	48
4.4.1	Espectrofotometria de absorção atômica	48
4.4.2	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)	49
4.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	50
4.5	Drogas e sais	51
4.6	Animais	51
4.7	Teste de atividades gerais (hipocrático) e toxicidade aguda	52
4.8	Protocolos experimentais	52
4.8.1	Avaliação da atividade diurética	52
4.8.1.1	Avaliação da atividade diurética aguda (dose única)	52

4.8.1.2	Avaliação da atividade diurética prolongada (doses repetidas)	53
4.8.1.3	Métodos bioquímicos	54
4.8.2	Avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade diurética	55
4.8.2.1	Participação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) na diurese induzida por HETM, TMLR e ISQ	55
4.8.2.2	Estudo do envolvimento da bradicinina na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	56
4.8.2.3	Estudo do envolvimento das prostaglandinas na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	56
4.8.2.4	Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	57
4.8.2.5	Determinação da atividade da Na ⁺ /K ⁺ /ATPase renal	57
4.8.2.6	Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária	58
4.8.3	Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados	59
4.8.3.1	Avaliação dos efeitos do HETM e da TMLR na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos	60
4.8.3.2	Avaliação da atividade hipotensora do HETM e da TMLR em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	60
4.8.3.3	Avaliação dos efeitos da isoquercitrina (ISQ) na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos	60
4.8.3.4	Efeitos da pré-administração de ISQ sobre as alterações na PAM induzida pela angiotensina I e bradicinina	61
4.8.3.5	Efeitos da ISQ sobre a resposta hipertensora da angiotensina II	61
4.8.3.6	Avaliação dos efeitos da ISQ sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME	61
4.8.3.7	Avaliação da participação da via NO/GMPc na hipotensão causada pela ISQ	62
4.8.3.8	Avaliação do efeito hipotensor e da atividade da ECA plasmática induzida pela ISQ em modelo de administração prolongada de L-NAME	62
4.8.4	Determinação de nitrato/nitrito sérico (NOx)	62
4.8.5	Marcação dos ânions superóxido e análise por microscopia confocal	63
4.9	Forma de análise dos resultados e testes estatísticos	63
V	RESULTADOS	65
5.1	Análise fitoquímica	65
5.1.1	Espectrofotometria de absorção atômica	65
5.1.2	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)	66
5.1.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	67
5.2	Teste de atividades gerais (hipocrático) e toxicidade aguda	68
5.3	Avaliação da atividade diurética	69
5.3.1	Avaliação da atividade diurética aguda (dose única)	69

5.3.1.1	Efeito diurético do infuso obtido de <i>T. majus</i>	69
5.3.1.2	Efeito diurético do HETM obtido de <i>T. majus</i>	71
5.3.1.3	Estudo comparativo com diuréticos de referência	73
5.3.1.4	Efeito diurético da TMLR obtida de <i>T. majus</i>	76
5.3.1.5	Efeito diurético da ISQ presente em <i>T. majus</i>	78
5.3.2	Avaliação da atividade diurética prolongada (doses repetidas)	80
5.3.2.1	Efeito diurético do HETM obtido de <i>T. majus</i>	80
5.3.2.2	Efeito diurético da TMLR obtida de <i>T. majus</i>	82
5.3.2.3	Efeito diurético da ISQ presente em <i>T. majus</i>	84
5.3.2.4	Determinação sérica de aldosterona e vasopressina	86
5.3.3	Avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade diurética	87
5.3.3.1	Avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)	87
5.3.3.1.1	Tratamento agudo (dose única)	87
5.3.3.1.2	Tratamento prolongado (doses repetidas)	88
5.3.3.2	Estudo do envolvimento da bradicinina na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	89
5.3.3.3	Estudo do envolvimento das prostaglandinas na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	90
5.3.3.4	Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ	91
5.3.3.5	Efeito do HETM, TMLR e ISQ sobre a atividade da Na ⁺ /K ⁺ /ATPase renal de ratos normotensos	93
5.3.3.6	Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária	93
5.4	Avaliação da atividade hipotensora	94
5.4.1	Efeitos do HETM na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	94
5.4.2	Efeitos da TMLR na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	95
5.4.3	Efeito hipotensor do HETM e TMLR em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	96
5.4.4	Efeitos da ISQ na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	97
5.4.4.1	Efeitos da ISQ sobre a resposta hipertensora induzida pela angiotensina I e hipotensora induzida pela bradicinina em ratos normotensos anestesiados	98
5.4.4.2	Efeitos da ISQ sobre a resposta da angiotensina II na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	100
5.4.4.3	Efeitos da administração da ISQ sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos expostos a infusão contínua de L-NAME	101
5.4.4.4	Efeitos da administração da ISQ sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos expostos ao pré-tratamento com ODQ	102
5.4.4.5	Efeitos do tratamento prolongado com L-NAME frente à resposta hipotensora e inibidora da ECA da ISQ	103

5.4.5	Efeitos do tratamento prolongado com a ISQ frente à determinação de nitrato/nitrito sérico (NO _x)	104
5.4.6	Efeitos do tratamento prolongado com a ISQ frente à marcação dos ânions superóxido e análise por microscopia confocal	105
VI	DISCUSSÃO	106
VII	PERSPECTIVAS FUTURAS	117
VIII	CONCLUSÕES	119
IX	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estratificação do risco individual do paciente hipertenso	28
Tabela 2	Análise de metais presentes nas folhas secas de <i>T. majus</i>	65
Tabela 3	Quantidade de isoquercitrina (ISQ) determinada por CLAE no HETM e na TMLR	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ACTZ	Acetazolamida
Akt	Serina/treonina proteína quinase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APC	Apocinina
AT1	Receptor para angiotensina II tipo AT1
AT2	Receptor para angiotensina II tipo AT2
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
B2	Receptor para bradicinina tipo B2
BK	Bradicinina
Ca	Cálcio
CAP	Captopril
CCD	Cromatografia de camada delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
Cl	Cloreto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
COX1	Araquidonato ciclo oxigenase tipo 1
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DAG	Diacilglicerol
DHE	Dihidroetidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
ESPIRO	Espironolactona
ET-1	Endotelina
eV	Eletrovolt
Fe	Ferro
FSR	Fluxo sanguíneo renal
FURO	Furosemida
g/kg	Gramas por quilo
g/l	Gramas por litro
g/ml	Gramas por mililitro
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
H	Hidrogênio

H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃	Bicarbonato
HCTZ	Hidroclorotiazida
HETM	Extrato etanólico obtido de <i>Tropaeolum majus</i>
Hip-His-Leu	Hipuril-histidil-leucina
HOE-140	D-Arg0[Hyp3,Thi5, D-Tic7, Oic8] bradykinin (BK)
i.du.	Intraduodenal
i.m.	Intramuscular
i.p	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP ₃	Trifosfato de inositol
ISQ	Isoquercitrina
JAMA	Journal of the american medical association
K	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
kV	Kilovolt
λ	Comprimento de onda
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginine methyl ester
LOQ	Limite de quantificação
M	Metro
M	Molar
m/z	Mass-to-charge ratio
Mg	Magnésio
mg/dl	Miligramas por decilitros
mg/kg	Miligramas por quilogramas
mg/kg/min	Miligramas por quilogramas por minuto
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitros
ml/kg	Mililitros por quilo de peso
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol/l	Milimoles por litro
mS/cm	MiliSiemens por centímetro
Na	Sódio
Na ⁺ /K ⁺ /ATPase	Sódio potássio ATPase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NaN ₃	Azida de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
Ni	Níquel
Nm	Nanômetro
nmol/kg	Nanomoles por quilograma
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one

OH ⁻	Hidroxil
OMS	Organização mundial de saúde
OONO ⁻	Peroxinitrito
PAM	Pressão arterial média
Pb	Chumbo
pg/ml	Picogramas por mililitros
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PI3-kinase	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP ₂	Fosfatidil-Inositol-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PM	Picomolar
pmol/kg	Picomoles por quilograma
pmol/L	Picomoles por litro
PNA	Peptídeo natriurético atrial
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RMN	Resonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
SBC	Sociedade brasileira de cardiologia
SBH	Sociedade brasileira de hipertensão
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SIRT1	Sirtuína1
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TFG	Taxa de filtração glomerular
TMLR	Fração purificada livre de sacarose
Tris-HCl	Tris-hidrocloreto
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
V	Volts
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
VSM	Músculo liso vascular
WHO	World health organization
WKY	Wistar Kyoto
Zn	Zinco
4-AP	4-Aminopiridina
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg/ml	Microgramas por mililitros
µl	Microlitros
µl/g	Microlitros por grama
µm	Micrômetros
µM	Micromolar
µmol/kg	Micromoles por quilograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Tropaeolum majus</i> L.	38
Figura 2	Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense – UNIPAR.	46
Figura 3	Canteiros para cultivo de plantas medicinais (Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR).	47
Figura 4	Espectros de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) do extrato etanólico e fração purificada livre de sacarose obtidos de <i>T. majus</i> .	66
Figura 5	Cromatogramas para a isoquercitrina, extrato etanólico e fração purificada livre de sacarose obtidos de <i>T. majus</i> .	68
Figura 6	Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração de sódio e volume urinário	70
Figura 7	Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de potássio, cloreto e bicarbonato	70
Figura 8	Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de <i>T. majus</i> sobre condutividade, pH e densidade	71
Figura 9	Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a concentração de sódio e volume urinário	72
Figura 10	Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de potássio, cloreto e bicarbonato	72
Figura 11	Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre condutividade, pH e densidade	73
Figura 12	Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a concentração de sódio e volume urinário	74
Figura 13	Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de potássio, cloreto e bicarbonato	74
Figura 14	Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a condutividade, pH e densidade	75
Figura 15	Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração de sódio e volume urinário	76
Figura 16	Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de potássio, cloreto e bicarbonato	77
Figura 17	Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre a condutividade, pH e densidade	77
Figura 18	Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a concentração de sódio e volume urinário	78
Figura 19	Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de potássio, cloreto e bicarbonato	79
Figura 20	Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a condutividade, pH e densidade	79
Figura 21	Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre o volume urinário	81
Figura 22	Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de <i>T.</i>	81

	<i>majus</i> sobre a concentração urinária de sódio	
Figura 23	Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de <i>T. majus</i> sobre a concentração plasmática de sódio, potássio, uréia e creatinina	82
Figura 24	Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre o volume urinário	83
Figura 25	Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de sódio	83
Figura 26	Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de <i>T. majus</i> sobre a concentração plasmática de sódio, potássio, uréia e creatinina	84
Figura 27	Efeitos do tratamento prolongado com isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre o volume urinário	85
Figura 28	Efeitos do tratamento prolongado com a isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a concentração urinária de sódio	85
Figura 29	Efeitos do tratamento prolongado com a isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a concentração plasmática de sódio, potássio, uréia e creatinina	86
Figura 30	Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a concentração plasmática aldosterona e vasopressina	87
Figura 31	Efeitos dos tratamentos agudos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática	88
Figura 32	Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática	89
Figura 33	Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> , na ausência e presença de HOE-140 sobre o volume urinário e concentração de sódio	90
Figura 34	Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> , na ausência e presença de Indometacina sobre o volume urinário e concentração de sódio	91
Figura 35	Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> , na ausência e presença de L-NAME sobre o volume urinário e concentração de sódio	92
Figura 36	Efeitos do HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a atividade da Na ⁺ /K ⁺ /ATPase renal	93
Figura 37	Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em <i>T. majus</i> sobre a atividade da enzima anidrase carbônica eritrocitária	94
Figura 38	Efeitos dependentes da dose e do tempo de administração do HETM na pressão arterial de ratos anestesiados	95
Figura 39	Efeitos da TMLR na pressão arterial de ratos anestesiados	96
Figura 40	Efeitos da administração intraduodenal (i. du.) do HETM e da TMLR na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos anestesiados	97
Figura 41	Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	98
Figura 42	Efeitos da pré-administração de isoquercitrina (ISQ) sobre a	99

	resposta da angiotensina I e bradicinina na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	
Figura 43	Efeitos da pré-administração de isoquercitrina (ISQ) sobre a resposta da angiotensina II na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados	100
Figura 44	Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos expostos a infusão contínua de L-NAME	101
Figura 45	Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos expostos ao pré-tratamento com ODQ	102
Figura 46	Efeitos do tratamento prolongado com o L-NAME sobre a resposta hipotensora e inibidora da ECA da isoquercitrina (ISQ)	103
Figura 47	Efeitos dos tratamentos prolongados com a isoquercitrina (ISQ) sobre a concentração plasmática de nitrito	104
Figura 48	Efeitos dos tratamentos prolongados com a isoquercitrina (ISQ) sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) em artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos	105
Figura 49	Síntese dos efeitos renais e cardiovasculares evidenciados para os extratos obtidos de <i>T. majus</i> e para a isoquercitrina	115
Figura 50	Possíveis mecanismos farmacológicos para os efeitos renais e cardiovasculares evidenciados nos extratos obtidos de <i>T. majus</i> e para a isoquercitrina	118

RESUMO

A *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) conhecida popularmente como chaguinha é utilizada frequentemente para o tratamento de infecções e distúrbios urinários. Como existem descrições em livros e artigos etnobotânicos sobre sua utilização popular como diurética e hipotensora, e inexistente validação farmacológica que subsidie esta atividade, objetivamos neste trabalho avaliar a ação do infuso, do extrato etanólico (HETM), da fração purificada (TMLR) e do flavonóide isoquercitrina (ISQ) identificado nas folhas desta espécie, sobre o sistema cardiovascular e renal de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). Inicialmente, verificamos os possíveis efeitos diuréticos da infusão (2,5 - 10%, v.o.), HETM (30 - 300 mg/kg, v.o.), TMLR (25 - 100 mg/kg, v.o.) e da ISQ (5 - 10 mg/kg, v.o.) em ratos normotensos. Os grupos controle foram tratados com água deionizada (5 ml/kg, v.o.) ou com espironolactona (50 mg/kg, v.o.). Após 1-15 h (tratamento agudo) ou diariamente por sete dias (tratamento prolongado), o volume urinário foi determinado. Adicionalmente, nas amostras de urina resultantes, o sódio, o potássio, o cloreto, o bicarbonato, a condutibilidade, o pH e a densidade foram mensurados. A concentração plasmática de eletrólitos, uréia, creatinina, aldosterona e vasopressina foram determinados no sétimo dia. Baseado nos resultados obtidos resolvemos avaliar a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática por fluorimetria indireta (*ex-vivo*) em animais tratados com o HETM, TMLR ou com a ISQ. Para investigar o papel da bradicinina, das prostaglandinas e do óxido nítrico na atividade diurética evidenciada, diferentes grupos de animais foram tratados com o HOE-140 (1,5 mg/kg; i.p.), indometacina (5 mg/kg; v.o.) ou com o L-NAME (60 mg/kg; v.o.) antes da administração do HETM, TMLR ou de ISQ. A atividade da anidrase carbônica eritrocitária e da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal também foram determinadas. Em uma segunda etapa deste trabalho, também direcionados pelos resultados obtidos, avaliamos os efeitos do HETM (10-300 mg/kg; v.o.), TMLR (12,5-100 mg/kg; v.o.) e da ISQ (0,5 - 10 mg/kg; v.o. ou i.v.) na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos e SHR. Para isto, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg; i.m.) e tiveram cateteres de polietileno introduzidos na veia femoral esquerda e artéria carotídea direita para a administração das drogas e registro da PAM, respectivamente. A fim de avaliarmos (*in vivo*) o papel da inibição da ECA nos efeitos hipotensores observados, diferentes grupos de ratos foram tratados com angiotensina I (10 pmol/kg), bradicinina (30 nmol/kg) ou angiotensina II (10 pmol/kg) antes e depois da administração intravenosa de ISQ (4 mg/kg). Da mesma forma, o papel da via óxido nítrico/guanilato ciclase foi avaliado através da administração de uma infusão de L-NAME (7 mg/kg/min) ou de ODQ (2 mg/kg), antes da administração intravenosa de ISQ (4 mg/kg). Adicionalmente, o efeito do tratamento prolongado com L-NAME (60 mg/kg) sobre as respostas hipotensoras e inibidora da ECA da ISQ (10 mg/kg; v.o.) foram determinadas. Os níveis plasmáticos de nitrito e as espécies reativas de oxigênio nas artérias mesentéricas dos animais SHR tratados com ISQ (5 e 10 mg/kg; v.o.) também foram mensurados. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPR (autorização número 240). Os resultados obtidos mostraram que após 15 h da administração de uma dose única de HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg) ou ISQ (10 mg/kg) o volume urinário foi aumentado em $64 \pm 10\%$, $45 \pm 7\%$ e $56 \pm 9\%$, respectivamente; permanecendo alterado pelas 24 horas subsequentes. Nos tratamentos prolongados (sete dias) o volume e as concentrações urinárias de sódio

em animais tratados com o HETM, TMLR e com a ISQ permaneceram significativamente aumentados principalmente do 4º até o 7º dia. O efeito diurético induzido pelo HETM, TMLR ou pela ISQ foi substancialmente reduzido pelo HOE-140, assim como pela indometacina ou L-NAME (~ 40%). Por outro lado, o tratamento oral com o HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg) e com a ISQ (10 mg/kg) reduziu a atividade da ECA plasmática em $28 \pm 6\%$, $30 \pm 5\%$ e $39 \pm 6\%$, respectivamente, assim como a concentração sérica de aldosterona. Além disso, a atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal foi significativamente reduzida por todos os tratamentos realizados (~30%); enquanto outros parâmetros urinários e plasmáticos não foram afetados. Os valores da PAM basal em animais normotensos, registrados antes da administração de qualquer substância foi de 108.9 ± 2.5 mm Hg, enquanto em animais SHR foi de $134,4 \pm 1,8$ mm Hg. A administração oral do HETM (100 mg/kg) e da TMLR (50 mg/kg) reduziu a PAM em ratos normotensos anestesiados em $12,83 \pm 2,3$ mm Hg e $14,94 \pm 3,0$ mm Hg; enquanto em animais SHR os valores foram estimados em $13,67 \pm 2,8$ mm Hg e $16,71 \pm 1,2$ mm Hg, respectivamente. A administração oral e intravenosa de ISQ (4 e 10 mg/kg, respectivamente) reduziu os valores da PAM de animais normotensos em $15,5 \pm 2,3$ mm Hg e $23,2 \pm 3,8$ mm Hg, respectivamente. Os efeitos hipertensivos e hipotensores induzidos pelo angiotensina I (10 pmol/kg) e pela bradicinina (30 nmol/kg), respectivamente, foram substancialmente alterados em animais tratados com a ISQ (4 mg/kg; i.v.). Além disso, o efeito hipotensor induzido pela ISQ (4 mg/kg; i.v.) foi reduzido fortemente pela infusão prévia de L-NAME, assim como pela administração do ODQ (2 mg/kg). Neste ínterim, o tratamento prolongado (v.o.) com o L-NAME (60 mg/kg) também reduziu a atividade inibidora sobre a ECA plasmática e o efeito hipotensor induzido pela ISQ (10 mg/kg; v.o.). Corroborando os dados supracitados, o tratamento prolongado com a ISQ (10 mg/kg; v.o.) elevou significativamente os níveis plasmáticos de nitrito e reduziu a produção de ROS em artérias mesentéricas de animais SHR. Desta forma, os resultados explicitados neste trabalho mostram que os efeitos diuréticos e hipotensores induzidos pelo extrato etanólico obtido de *T. majus* (HETM), assim como de sua fração purificada livre de sacarose (TMLR) podem estar associados com os altos níveis do flavonóide isoquercitrina identificados nesta planta. Evidências sugerem que estes efeitos podem ser decorrentes da diminuição da produção de angiotensina II pela ECA, com consequente redução dos níveis séricos de aldosterona, e da baixa atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal; assim como pela liberação de prostanóides e óxido nítrico endotelial. Além disso, a hipotensão induzida pela ISQ aparenta ser um evento dependente da estimulação da via óxido nítrico/guanilato ciclase e da inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

Tropaeolum majus L. (Tropaeolaceae), popularly known as “chaguinha”, is used to treat infections and urinary disorders. There are descriptions of the ethnobotanical use as a diuretic and hypotensive, but these data are not reported in the literature. The aim of this study was to evaluate the mechanisms underlying the diuretic and hypotensive action of an ethanolic extract (HETM), purified fraction (TMLR) and isoquercitrin (ISQ) identified in *T. majus*. First, we evaluated the diuretic effects of *T. majus* infusion (2.5–10%; p.o.), HETM (30–300 mg/kg; p.o.), TMLR (25–100 mg/kg; p.o.) and ISQ (5–10 mg/kg; p.o.) on normotensive rats. Control groups received deionized water (5 ml/kg; p.o.) or spironolactone (50 mg/kg; p.o.). After 1–15 h (acute treatment) or daily for seven days (continuous treatment) the urinary volume was measured. Additionally, at the end of our experiment, sodium, potassium, chloride, bicarbonate, conductivity, pH and density were estimated from a pooled urine sample of each pair of rats. Plasmatic concentration of electrolytes, urea, creatinine, aldosterone and vasopressin were measured on day 7. The angiotensin converting enzyme (ACE) activity levels were measured by indirect fluorimetry in serum samples obtained from HETM, TMLR, and ISQ treated rats. To evaluate the role of bradykinin, prostaglandin and nitric oxide (NO) pathways, different groups of animals were treated with HOE-140 (1.5 mg/kg; i.p.), indomethacin (5 mg/kg; p.o.) or L-NAME (60 mg/kg; p.o.) before the administration of HETM, TMLR or ISQ. The erythrocytary carbonic anhydrase and the renal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ activity had been determined. In the same way, we evaluated the effects of HETM (10–300 mg/kg; p.o.), TMLR (12.5–100 mg/kg; p.o.) and ISQ (0.5 - 10 mg/kg; p.o. and i.v.) on the mean arterial pressure (MAP) of both normotensive and SHR rats. For this, the animals were anesthetized with ketamine/xilazone (100/20 mg/kg; i.m.) and had polyethylene catheters inserted inside the left femoral vein and the right carotid artery for drug administration and MAP recording, respectively. To evaluate the role of the *in vivo* ACE inhibitor activity, different groups of animals were subjected to angiotensin I (10 pmol/kg), bradykinin (30 nmol/kg) or angiotensin II (10 pmol/kg) infusion before and after the intravenous injection of ISQ (4 mg/kg). On the other hand, to evaluate the role of the nitric oxide/guanylate cyclase pathway in our findings, different groups of animals were subjected to L-NAME infusion (a nitric oxide synthase inhibitor, 7 mg/kg/min) or ODQ (a guanylate cyclase inhibitor, 2 mg/kg) before the intravenous injection of ISQ (4 mg/kg). Additionally, the effect of prolonged treatment with L-NAME (60 mg/kg) in ACE inhibitory activity and hypotensive effect of ISQ (10 mg/kg; p.o.) were evaluated. Plasmatic levels of nitrite and reactive oxygen species in mesenteric artery of SHR rats also they had been determined. All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of UFPR (authorization number 240). At 15 h after a single dose of HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg) or ISQ (10 mg/kg) the urinary volume rose by $64 \pm 10\%$, $45 \pm 7\%$ and $56 \pm 9\%$, respectively. This diuretic effect remained for 24 h. Daily administration of HETM, TMLR and ISQ also increased urinary volume and excretion of sodium, an effect seen from day 4 until day 7 of treatment. The diuretic effect induced by HETM, TMLR and ISQ was strongly reduced by HOE-140, as well as by indomethacin or L-NAME ($\sim 40\%$). The oral treatment with HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg) and ISQ (10 mg/kg) reduced the plasmatic ACE activity by $28 \pm 6\%$, $30 \pm 5\%$ and $39 \pm 6\%$, respectively; as well as the plasmatic concentration of aldosterone. In addition, the renal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ activity was significantly reduced by all treatments ($\sim 30\%$), while other urinary and plasmatic concentrations evaluated have not been affected. The oral administration of HETM (100 mg/kg) and TMLR (50 mg/kg) reduced MAP by 12.83 ± 2.3 mm Hg

and 14.94 ± 3.0 mm Hg in normotensive rats, and 13.67 ± 2.8 mm Hg and 16.71 ± 1.2 mm Hg in SHR rats. The basal MAP was 108.9 ± 2.5 mm Hg and 134.4 ± 1.8 mm Hg in normotensive and SHR animals, respectively. Oral and intravenous administration of ISQ (4 and 10 mg/kg, respectively) reduced the MAP by 15.5 ± 2.3 mm Hg and 23.2 ± 3.8 mm Hg. The hypertensive and hypotensive effect induced by angiotensin I (10 pmol/kg) and bradykinin (30 nmol/kg), respectively, were reduced by ISQ (4 mg/kg) treated rats. In addition, the hypotensive effect induced by ISQ (4 mg/kg; i.v.) was strongly reduced by L-NAME, as well as by ODQ (2 mg/kg). In the same way, the prolonged oral treatment with L-NAME (60 mg/kg) reduced the ACE inhibitory activity or hypotensive effect induced by ISQ (10 mg/kg; p.o.). The prolonged treatment with ISQ (10 mg/kg; p.o.) increased levels of serum nitrite and reduce the ROS production in SHR mesenteric artery. The described results above, shown that diuretic and hypotensive effect induced by the ethanol extract of *T. majus* (HETM), as well as its fraction TMLR may be associated with high levels of the flavonoid isoquercitrin found in this plant. This effect may be a consequence of reduced angiotensin II generation by ACE, diminished aldosterone levels and low activity of the renal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$; as well as by bradykinin-dependent stimulation of NO and prostaglandin pathways. In addition, isoquercitrin-induced hypotension in rats is an event dependent of both stimulation of the nitric oxide/guanylate cyclase pathway and inhibition of angiotensin II generation by ACE.

I INTRODUÇÃO

A pressão arterial pode ser definida como a força que o sangue exerce, ao ser bombeado pelo ventrículo esquerdo, contra as paredes das artérias. Em seres humanos, a pressão sanguínea varia constantemente, porém, raramente desvia dos valores referenciais (120 mm Hg para a pressão sistólica e 80 mm Hg para a diastólica) mais do que 10 a 15% durante o dia. Isto é possível porque o organismo possui mecanismos de controle que conseguem promover uma resposta adequada frente às ocasiões que a alteram. Esses mecanismos de regulação da pressão arterial podem ser agrupados de acordo com o tempo necessário à reação. Em curto prazo (reação em segundos), esse controle é desempenhado pelos barorreflexos, quimiorreflexos e sistema nervoso central. Em médio prazo (minutos) ou em longo prazo (horas ou dias), a regulação ou modulação ocorrem principalmente por ação dos sistemas hormonais (sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema caliceína-cinina, vasopressina, fator natriurético atrial e mediadores endoteliais) (GUYTON, 1991; JOYNER *et al.*, 2010).

O sistema barorreflexo é a primeira linha de defesa contra as manifestações agudas da hipertensão ou hipotensão. É constituído por receptores (barorreceptores), localizados principalmente na aorta e na parede interna das artérias carótidas. Estes receptores são estimulados quando ocorrem modificações tensionais na parede dos vasos, ocasionadas pela pressão arterial reduzida ou elevada. Sob esses estímulos, os barorreceptores enviam sinais para o cérebro (centro vasomotor), que os retorna para o sistema circulatório provocando modificações no tônus dos vasos, na força de contração e na frequência cardíaca, promovendo assim o retorno da pressão arterial, através de variações no tônus simpático (SOUZA NETO *et al.*, 2003; ZANUTTO *et al.*, 2010).

Alguns sistemas de controle da pressão sanguínea apresentam funções altamente especializadas, como o mecanismo de isquemia do sistema nervoso central, ativado quando o fluxo sanguíneo no cérebro se torna insuficiente, e os quimiorreceptores, estimulados pelo aumento da concentração de CO₂ e diminuição da concentração de O₂ no sangue. Quando ativados, estes mecanismos modificam a pressão sanguínea para valores capazes de restabelecer o fluxo sanguíneo normal na região isquêmica, ou ainda, elevar as concentrações de O₂ no sangue e disponibilizá-lo para os tecidos (GUYTON, 1991; GEEGANAGE e BATH, 2010).

Em médio e longo prazo, o controle da pressão arterial pode ser realizado através de modificações na função dos rins, onde o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha papel central. Este sistema regula o tônus vascular, o volume de fluidos corporais, o balanço eletrolítico, a secreção hormonal e a atividade neuronal (GONZALEZ *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007; CASTROP *et al.*, 2010). Normalmente, é ativado quando a baixa pressão sanguínea faz com que o fluxo de sangue para os rins se reduza abaixo do normal, alterando a concentração de sódio nos néfrons. Isso faz com que as células justaglomerulares dos rins secretem renina e a liberem na corrente sanguínea (CASTROP *et al.*, 2010).

A renina é uma enzima glicoprotéica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Os efeitos biológicos da angiotensina II, o principal peptídeo efetor na vasculatura, são mediados por duas isoformas de receptores, o AT1 e o AT2 (ELTON *et al.*, 1992; KAMBAYASHI *et al.*, 1993; GONZALEZ *et al.*, 2005).

O receptor AT1 pode mediar vasoconstrição, facilitação simpática, efeitos tróficos e liberação de aldosterona, que aumenta a expressão de proteínas dos canais de sódio no epitélio dos túbulos e ductos coletores, além de aumentar a atividade das bombas $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, propiciando um importante aumento na reabsorção de água e eletrólitos pelos túbulos renais; conseqüentemente, restabelecendo os níveis pressóricos (GUYTON, 1991; CRACKOWER *et al.*, 2002; FERRARIO, 2010). Por outro lado, a angiotensina II também é considerada o maior mediador do remodelamento vascular (HIGUCHI *et al.*, 2007; FAILLI *et al.*, 2009); apresenta efeitos pró-inflamatórios (FRANK e EGUCHI, 2003), fibróticos e metabólicos, que incluem a resistência a insulina (IZAWA *et al.*, 2005), a deposição de proteína na matriz extracelular (NAFTILAN *et al.*, 1989; TOUYZ *et al.*, 1999; ZHAI *et al.*, 2005; HIGUCHI *et al.*, 2007), a estimulação da diferenciação e migração celular (POWELL *et al.*, 1989) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TOUYZ, 2005).

O receptor AT2 é extensamente expresso durante o desenvolvimento fetal, enquanto nos adultos a expressão foi detectada em diferentes tecidos incluindo mesentéricas, coronárias e artérias renais (ARDAILLOU, 1999). Alguns autores consideram que o receptor AT2 tem efeito antagônico ao receptor AT1, como por exemplo: o AT2 atenua a ação pressora da angiotensina II e medeia vasodilatação

(MATROUGUI *et al.*, 1999; SIRAGY *et al.*, 1999; FERRARIO, 2010; LEMARIE e SCHIFFRIN, 2010).

A ativação de outros sistemas hormonais também pode contribuir para a regulação da pressão arterial em médio prazo. Por exemplo, um importante hormônio que contribui para o restabelecimento da pressão arterial é a vasopressina ou hormônio antidiurético. Este hormônio é produzido pela glândula hipófise posterior em resposta ao aumento da concentração do sódio e de outras substâncias osmoticamente ativas no sangue. Ele atua sobre os tubos coletores dos rins, aumentando a reabsorção de água, ao mesmo tempo em que permite a excreção normal de sódio e de outros solutos. (GUYTON, 1991; REILLY e SCHORK, 2010).

Outros sistemas hormonais também são relevantes para o controle ou modulação da pressão arterial, como o peptídeo natriurético atrial (PNA), o sistema caliceína-cinina, e os mediadores endoteliais.

O PNA reduz a pressão arterial através da vasodilatação e da regulação do volume intravascular. Este hormônio foi originalmente identificado em extrato de miocárdio atrial como uma substância promotora de natriurese (DE BOLD *et al.*, 1981). O PNA é produzido principalmente no átrio de adultos normais, mas é também expresso em ventrículos durante o desenvolvimento fetal (MERCADIER *et al.*, 1989). É liberado principalmente em condições que promovem distensão atrial e podem acarretar efeitos vasodilatadores (por aumentos na concentração do GMPc), aumento da taxa de filtração glomerular, natriurese e diurese. Além disso, tem sido demonstrado que o PNA pode contribuir para a redução da pressão arterial através da inibição da atividade da renina plasmática, da aldosterona sérica e da liberação da endotelina (CODY *et al.*, 1986; UEMASU *et al.*, 1993; KUWAHARA e NAKAO, 2010).

Outro importante mecanismo hormonal que contribui para a redução da pressão arterial através de vasodilatação é o sistema caliceína-cinina. As cininas (bradicinina e Lys-bradicinina ou calidina) são potentes peptídeos vasodilatadores e inflamatórios liberados a partir de precursores plasmáticos, os cininogênios, por ação das enzimas caliceínas (CHAO *et al.*, 2010). Essas enzimas são ativadas por muitos estímulos, incluindo isquemia, dano tecidual e lipopolissacarídeos de bactérias. Os efeitos vasodilatadores são mediados principalmente pelo óxido nítrico ou pela prostaciclina, e envolvem a ativação de receptores de bradicinina, subtipos

B₂ (fisiologicamente) ou B₁ (em algumas condições fisiopatológicas) (TIRAPELLI *et al.*, 2009).

Dentre todos os mecanismos que podem influenciar diretamente a função cardiovascular, o endotélio apresenta um papel central na manutenção do tônus vascular e na pressão arterial sistêmica, regulando a liberação de várias substâncias vasoativas (ENDEMANN e SCHIFFRIN, 2004). Na verdade, a liberação de mediadores vasodilatadores a partir do endotélio pode ser estimulada por substâncias endógenas, como a bradicinina (BK) e a acetilcolina (ACh), ou ainda por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento (“shear stress”). Os principais agentes relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂). Já os fatores vasoconstritores são representados essencialmente por alguns prostanóides como a prostaglandina H₂ (PGH₂) e o tromboxano A₂, pela endotelina (ET-1) e pelos ânions superóxidos (VANHOUTTE, 2003).

Dentre os fatores vasorelaxantes, o NO, além de suas propriedades vasodilatadoras, possui efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos e opõe-se à adesão de células e trombose (SAVOIA e SCHIFFRIN, 2006). A NO sintase endotelial (eNOS) catalisa a formação de NO e de L-citrulina a partir da L-arginina e pode ser ativada em resposta a diferentes estímulos, pela via dependente de cálcio (ex. acetilcolina e bradicinina) ou pela via PI3-kinase/Akt (ex. forças de cisalhamento induzida pelo fluxo sanguíneo e a insulina). O NO formado nas células endoteliais difunde-se para as células musculares lisas adjacentes onde estimula a enzima guanilato ciclase citosólica para produzir o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), responsável pelo relaxamento das células musculares lisas e do vaso (STRIJDOM *et al.*, 2009).

Assim como o NO, a PGI₂ representa um importante mecanismo de ação local para a regulação do tônus vascular. Seus efeitos na vasodilatação, bem como na inibição da agregação plaquetária estão bem caracterizados (VANE *et al.*, 1990; INIGUEZ *et al.*, 2008). A produção de PGI₂ pode ser estimulada por vários fatores e mediadores endógenos, incluindo o estresse de cisalhamento, angiotensina II, bradicinina e histamina. Sua síntese é iniciada pela ação da enzima fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidios de membrana, promovendo a liberação do ácido araquidônico que os compõe (WRIGHT e MALIK, 1996; RUAN *et al.*, 1997). O ácido araquidônico liberado é oxidado pela enzima cicloxigenase dando origem ao PGG₂, o qual é

reduzido a PGH_2 , ainda pela cicloxigenase (FERREIRA *et al.*, 1971). Por fim, a enzima prostaciclina sintase converte o PGH_2 a PGI_2 (SMITH *et al.*, 1996; VANE *et al.*, 1998).

Depois de sintetizada e liberada, a PGI_2 exerce o seu efeito localmente, e é rapidamente convertida a um metabólito inativo através de um processo não enzimático. Em seu mecanismo de ação vasorrelaxante, a PGI_2 produzida pelas células endoteliais promove a ativação de receptores na membrana das células da musculatura lisa, acoplados à proteína G. A estimulação desses receptores aumenta a concentração citosólica do AMP_c , segundo mensageiro que ativa a proteína quinase A (PKA). A ativação desta quinase impede a interação actina-miosina, ocasionando o relaxamento vascular (BENNETT, 1995; YUHKI *et al.*, 2010).

Os mais bem caracterizados mediadores produzidos pelas células endoteliais são o NO e a PGI_2 , responsáveis pelo relaxamento vascular. Entretanto, mesmo na presença de inibidores da óxido nítrico sintase, como os análogos da L-arginina (L-NAME e L-NMMA) ou de inibidores da síntese de prostaciclina (indometacina), muitos vasos sangüíneos, principalmente os de pequeno diâmetro, ainda respondem a estímulos químicos ou mecânicos com um relaxamento vascular dependente do endotélio. Essa vasodilatação parece ser mediada por uma hiperpolarização celular, originalmente atribuída à liberação de um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), capaz de ativar canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular (GARLAND e MCPHERSON, 1992; NAGAO e VANHOUTTE, 1992).

O efeito vasorelaxante do EDHF difere em função da espécie animal e do tipo de vaso. Alguns possíveis representantes para os EDHF indicam os íons K^+ , os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) ou ainda o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o sulfeto de hidrogênio (H_2S) (FELETOU e VANHOUTTE, 2006; WANG, 2009). O seu papel mais importante ocorre nos vasos de resistência (pequeno calibre) quando comparado aos vasos de capacitância (grande calibre) (SHIMOKAWA *et al.*, 1996; JIN *et al.*, 2010). O EDHF induz uma hiperpolarização das células endoteliais devido a ativação dos canais de potássio dependentes de cálcio, especialmente os de média (IK_{Ca}) e de baixa condutância (SK_{Ca}). Neste mecanismo, provavelmente ocorre o envolvimento do acoplamento elétrico através das junções gap mioendoteliais, que permitem a transferência da hiperpolarização originada no endotélio vascular para a camada de células musculares lisas e consequente relaxamento vascular (EDWARDS *et al.*, 1998; JIN *et al.*, 2010).

Apesar de todos estes mecanismos de ajustes da pressão arterial se correlacionarem de forma integrada, em determinadas situações, sua sincronia pode falhar; as causas destes desajustes são poligênicas e, quando os níveis pressóricos se mantêm constantemente elevados, nos encontramos frente a um quadro típico de hipertensão arterial sistêmica (HAS).

1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônico-degenerativa que afeta o sistema cardiovascular, e seu controle tem constituído um desafio para todos os profissionais da saúde (AXON *et al.*, 2010). É caracterizada como uma das mais importantes causas de mortes em todo o mundo que pode ser prevenida através de mudanças no estilo de vida ou com medidas farmacológicas (SBC/SBH, 2006; NOLA *et al.*, 2010).

Tanto a morbidade quanto a mortalidade por doenças cardiovasculares são comumente elevadas em pessoas com hipertensão, principalmente em indivíduos diabéticos, pois estes apresentam uma maior fragilidade capilar quando submetidos a elevados níveis pressóricos (ZHANG *et al.*, 2006). É sabidamente uma doença de alta prevalência na população, ocasionando quando não tratada adequadamente, complicações clínicas graves como o acidente vascular cerebral (AVC), doença das coronárias, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (WILLIAMS *et al.*, 2004). Além disso, também é considerado um grave problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (MOLINA *et al.*, 2003; AXON *et al.*, 2010).

As complicações da HAS derivam das modificações anatômicas e fisiológicas decorrentes do regime de pressão elevada a que estão submetidas às câmaras cardíacas e as artérias, e também, da aceleração do processo aterosclerótico (WHO, 2005). A HAS atua sinergicamente com outros fatores de risco aterogênicos como o sedentarismo, o estresse, o tabagismo, o envelhecimento, a história familiar, a raça, o gênero, o peso, a elevada ingestão de sal, a baixa ingestão de potássio e o consumo excessivo de álcool (SBC/SBH, 2006; COSTANZO *et al.*, 2010). No grupo com pressão limítrofe também contribuem para o aumento do risco cardiovascular as dislipidemias, a intolerância à glicose e o diabetes, o tabagismo, a menopausa e o estresse emocional (ZHANG *et al.*, 2006).

A HAS apresenta elevados custos médicos e socioeconômicos, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular das extremidades (LEWINGTON *et al.*, 2002; QUINN *et al.*, 2010). Estudos mostram que no Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, sendo a principal causa de morte o AVC. Assim, a elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para as doenças cardiovasculares (LOTUFO, 2005).

A medida da pressão arterial é o elemento essencial para o estabelecimento do diagnóstico da hipertensão arterial e a avaliação da eficácia do tratamento. Da mesma forma, a medida da pressão arterial deve ser realizada em toda avaliação de saúde, por médicos de diferentes especialidades e demais profissionais da área de saúde. O método mais utilizado para a medida da pressão arterial na prática clínica é o indireto, com técnica auscultatória e esfigmomanômetro de coluna de mercúrio ou aneróide, ambos devidamente calibrados (SBC/SBH, 2006; QUINN *et al.*, 2010).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão nas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH, 2006), e com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), pressão normal é a pressão arterial sistólica (PAS) inferior a 130 mm Hg e a pressão arterial diastólica (PAD) menor que 85 mm Hg. O paciente é considerado hipertenso em estágio 1 quando a PAS varia entre 140 -159 mm Hg e a PAD entre 90-99 mm Hg, e hipertenso em estágio 2 se a PAS varia entre 160 -179 mm Hg e a PAD entre 100 -109 mm Hg. Caso a PAS alcance valores maiores ou iguais a 180 mm Hg e a PAD valores maiores ou iguais a 110 mm Hg a hipertensão é considerada em estágio 3.

O risco de eventos cardiovasculares em pacientes hipertensos é diretamente proporcional aos níveis pressóricos a que estão submetidos e a presença de fatores de risco adicionais, lesões de órgãos-alvo e doença cardiovascular associada. Assim, a estratificação de risco individual do paciente hipertenso (Tabela 1) é fator determinante na escolha e no sucesso da terapia anti-hipertensiva (SBC/SBH, 2006; QUINN *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos, desconhece-se a causa da hipertensão. Acredita-se que 95 a 99% dos casos são de hipertensão primária ou essencial, para a qual não existe causa orgânica evidente. Para os demais casos, a hipertensão é secundária à administração de drogas (contraceptivos orais, hormônios da supra-renal, dentre

outras), gravidez, doença cardiovascular como coarctação da aorta, doença renal e doença das glândulas supra-renais (OATES, 2003; LURBE e TORRO, 2010; ROTHWELL, 2010).

Tabela 1 – Estratificação do risco individual do paciente hipertenso: risco cardiovascular adicional de acordo com os níveis da pressão arterial e a presença de fatores de risco, lesões de órgãos-alvo e doença cardiovascular (SBC/SBH, 2006).

FATORES DE RISCO	PRESSÃO ARTERIAL				
	Normal	Limítrofe	Hipertensão Estágio 1	Hipertensão Estágio 2	Hipertensão Estágio 2
Sem fator de risco	Sem risco adicional		Risco baixo	Risco médio	Risco alto
1 a 2 fatores de risco	Risco baixo		Risco médio	Risco médio	Risco muito alto
3 ou mais fatores de risco ou lesão de órgãos-alvo ou diabetes mellitus	Risco médio	Risco alto	Risco alto		Risco muito alto
Doença cardiovascular	Risco alto	Risco muito alto			

No Brasil, de 15 a 30% da população adulta podem ser caracterizadas como hipertensas (SALGADO e CARVALHAES, 2003), já a prevalência de hipertensão arterial em crianças e adolescentes pode variar de 2 a 13% (REZENDE *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003). Investigações populacionais realizados em algumas cidades do Brasil mostram prevalência de hipertensão arterial muito variada, com valores estimados entre 10 a 43,9% (MATOS e LADEIA, 2003; GUS *et al.*, 2004; MION JR, 2004), dependendo da região, subgrupo populacional ou critério diagnóstico utilizado. Recentemente, estudo realizado em todo o país, intitulado Corações do Brasil (SBC/SBH, 2006) mostrou prevalência geral de hipertensão em torno de 28,5%, sendo que as regiões norte e centro-oeste apresentaram menor prevalência (19,4%), enquanto a região nordeste lidera a pesquisa com valores em torno de 31,8%. Entretanto, dados acerca da ocorrência de crises hipertensivas isoladas apontam uma prevalência variando entre 1 a 27% da população (LIMA, 2004).

A HAS é uma doença extremamente comum na população geriátrica, afetando cerca de 50% da população com mais de 50 anos, onde quase sempre a hipertensão é só sistólica (LESSA, 2001). Dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC/SBH, 2006) indicam que os negros têm maior prevalência de hipertensão do que os brancos (34,8% versus 29,4%), seguido dos pardos e mulatos (26,3%), indígenas (11,1%) e amarelos (10%). Da mesma forma, os homens apresentam-se mais hipertensos do que as mulheres (35,2% versus 22,6%), porém

existe uma maior incidência de hipertensão em mulheres após a menopausa, este fato relaciona-se com a combinação de ganho de peso e alterações hormonais. Em estudo realizado com 622 hipertensos, admitidos com diagnóstico de hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência renal e acidente vascular cerebral em um ambulatório de referência em Salvador – BA verificou-se uma maior prevalência de insuficiência renal e hipertrofia ventricular esquerda em homens do que em mulheres, e de acidente vascular cerebral em homens brancos do que em mulheres brancas. Dentro deste contexto, salienta-se ainda que a sobrevivência dos pacientes, as barreiras para o acesso aos serviços de saúde e aspectos do comportamento que determinam a procura espontânea de cuidados preventivos e/ou curativos são fatores que podem influenciar na prevalência de complicações de órgãos alvo da HAS em pacientes avaliados ambulatoriamente (NOBLAT *et al.*, 2004).

Estudos revelam que existe um forte componente econômico, social e cultural no Brasil referente à hipertensão arterial. Assim, quanto maior a consonância cultural de um indivíduo, e seu conhecimento sobre a patologia e a importância da adesão ao tratamento, melhor seria o controle de seus níveis pressóricos (DRUMMOND e BARROS, 1999; DRESSLER e SANTOS, 2000; VASAN *et al.*, 2001).

Os fatores de risco mutáveis que contribuem diretamente para o aumento da pressão arterial envolvem o consumo excessivo de sódio, o excesso de massa corpórea, o consumo elevado de bebidas alcoólicas, o tabagismo e o sedentarismo (NISKANEN *et al.*, 2004; STRANGES *et al.*, 2004; FAGARD, 2005; LUCKSON, 2010). Entretanto, a presença de fatores de risco cardiovasculares ocorre mais comumente de forma combinada, assim, estes fatores parecem variar com a idade, predominando a inatividade física, o sobrepeso, a hiperglicemia e a dislipidemia (SBC/SBH, 2006).

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul (GUS *et al.*, 2004) verificou-se que somente 50,8% dos portadores de hipertensão tinham conhecimento de sua patologia, destes 40,5% estavam em tratamento e apenas 10,4% tinham pressão arterial controlada (<140/90 mm Hg). Por outro lado, dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia mostram que aproximadamente 93% dos pacientes em tratamento não obtêm controle satisfatório de seus níveis pressóricos. Dentro deste contexto, a idade avançada, a obesidade, o baixo nível educacional e o uso inadequado de anti-hipertensivos mostraram-se associados a menores taxas de controle (FIRMO *et al.*, 2003).

Existem vários tipos de tratamento para a HAS, incluído medidas farmacológicas e não farmacológicas. Dentre as medidas não farmacológicas recomendam-se modificações no estilo de vida para todos os pacientes com hipertensão, pré-hipertensão ou antecedentes familiares de HAS (WEXLER e AUKERMAN, 2006). A adoção de um estilo de vida saudável é fundamental no tratamento de hipertensos, principalmente quando associados à obesidade, dislipidemias e ao diabetes (KATZMARZYK *et al.*, 2004; WILDMAN *et al.*, 2005; SACKS e CAMPOS, 2010).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) os fatores ambientais modificáveis que contribuem para a redução da pressão arterial são: o controle do peso, o padrão alimentar, a redução do consumo de sal, a moderação no consumo de álcool e o exercício físico regular. O ideal seria manter o peso corporal na faixa normal (índice de massa corporal entre 18,5 a 24,9 kg/m²), consumir dietas ricas em frutas e vegetais além de alimentos com baixa densidade calórica e baixo teor de gorduras saturadas, reduzir a ingestão de sódio para não mais de 2.4 gramas ao dia, limitar o consumo de etanol a 30 g/dia para os homens e 15 g/dia para as mulheres, abandonar o tabagismo, controlar o estresse psicoemocional e habituar-se a prática regular de atividade física aeróbica (NOLA *et al.*, 2010).

Quando, após seis meses de tratamento não farmacológico, não se obtém redução satisfatória dos níveis pressóricos para hipertensos com hipertensão grau I, ou logo após o diagnóstico para hipertensos graus II e III, pode ser instituído o tratamento farmacológico (SBC/SBH, 2006; HACKAM *et al.*, 2010).

Segundo as V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH, 2006) são características importantes para os medicamentos anti-hipertensivos: ser eficaz por via oral; ser bem tolerado; permitir a administração em menor número possível de tomadas; ser iniciado com as menores doses efetivas preconizadas para cada situação clínica, podendo ser aumentadas gradativamente se necessário; não ser obtido por meio de manipulação, pela inexistência de informações adequadas de controle de qualidade, bioequivalência e/ou interação química dos compostos; ser considerado as associações em pacientes com hipertensão em estágios II e III que, na maioria das vezes, são refratários a monoterapia; e ser utilizado por um período mínimo de 4 semanas, para aumento da dose, substituição da monoterapia ou mudança das associações em uso.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC/SBH, 2006) para o controle da pressão arterial pode ser utilizado em monoterapia inicial, especialmente aos pacientes com hipertensão arterial em estágio I que não respondem às medidas não-farmacológicas, as seguintes classes de anti-hipertensivos: betabloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina II e diuréticos. Para pacientes em estágios II e III, pode-se considerar o uso de associações fixas de medicamentos anti-hipertensivos como terapia inicial, e/ou os vasodilatadores diretos (HACKAM *et al.*, 2010; LAGANOVIC, 2010).

Dentre as drogas utilizadas para o tratamento da hipertensão, os beta bloqueadores exercem seus efeitos através de vários mecanismos farmacológicos conhecidos, entre eles, a redução da contratilidade do miocárdio e consequentemente do débito cardíaco, ao antagonizar diretamente os receptores beta adrenérgicos localizados no miocárdio. Outra consequência importante do bloqueio dos receptores beta adrenérgicos é a redução na secreção de renina, com consequente diminuição da angiotensina II corporal. Por outro lado, evidências recentes mostram um possível efeito modulatório sobre o sistema nervoso central, alteração na sensibilidade dos barorreceptores, efeitos sobre os neurônios adrenérgicos periféricos e um aumento na síntese de PGI₂ (CHEN *et al.*, 2010; DE CATERINA e LEONE, 2010; DESTRO *et al.*, 2010).

No contexto da terapia farmacológica da hipertensão, atualmente, destaca-se as drogas bloqueadoras de canais de cálcio, que reduzem a pressão arterial sistêmica ao relaxar o músculo liso arteriolar induzindo vasodilatação. Este efeito decorre do bloqueio dose-dependente de canais de cálcio do tipo L, o que resulta numa redução do influxo de cálcio, com efeito relaxante direto na musculatura lisa dos vasos (principalmente nas arteríolas pré-capilares), reduzindo desta maneira, a resistência vascular periférica total. Por outro lado, foram evidenciados efeitos antitrombóticos, antiateroscleróticos, antioxidantes e moduladores da liberação de NO em alguns representantes desta classe (ERICKSON *et al.*, 2010; YAMAGISHI, 2010).

A habilidade dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) em reduzir as concentrações de angiotensina II e aumentar a biodisponibilidade da bradicinina constituiu-se como um importante avanço na terapia da hipertensão. Sua eficácia decorre de uma gama de atividades, onde se destacam a redução do efeito

vasoconstritor da angiotensina II, o aumento da resposta vasodilatadora da bradicinina, a diminuição da atividade simpática periférica e a atenuação dos níveis de aldosterona circulante, com conseqüente natriurese. Da mesma forma, efeitos pleiotrópicos envolvidos na redução da hipertrofia vascular e cardíaca, além da modulação do estresse oxidativo e da biodisponibilidade do NO tem sido relatada (COMINACINI *et al.*, 2003; DE LA ROSA *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2010).

A partir da década de 90, outra classe de drogas que bloqueia as atividades do sistema renina-angiotensina entrou em evidência. Denominados antagonistas de receptores da angiotensina II, estas drogas, bloqueiam a etapa final da atividade da angiotensina II antagonizando os receptores do tipo AT1 em diversos tecidos corporais. Apesar da resposta farmacológica ser muito similar a obtida com os inibidores da ECA, estes antagonistas apresentam algumas vantagens na terapia da hipertensão, pois tecidos como o ventrículo esquerdo e a vasculatura possuem mecanismos alternativos para a síntese de angiotensina II, independente da atividade da ECA. Da mesma forma, a não interferência no metabolismo das cininas (bradicinina) contribui para a redução de um efeito colateral muito comum aos inibidores da ECA, a tosse seca (CATANZARO e FRISHMAN, 2010).

Uma das principais estratégias no tratamento farmacológico da hipertensão refere-se às drogas diuréticas, que exercem suas atividades principalmente pela redução do volume extracelular e do débito cardíaco. Este efeito pode ser decorrente, entre outros, da inibição da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ no ramo ascendente espesso da alça de henle (diuréticos de alça), do bloqueio do co-transportador Na^+/Cl^- no túbulo convoluto distal (tiazídicos), do antagonismo dos receptores da aldosterona (espironolactona), do bloqueio dos canais de sódio no epitélio renal (amilorida) e/ou por alterações no fluxo sanguíneo renal. Por outro lado, durante o tratamento prolongado, o efeito hipotensor é mantido devido uma redução na resistência periférica total, que frequentemente, é acompanhada da normalização do débito cardíaco e do volume extracelular. Neste sentido, alguns autores tem postulado que os diuréticos, principalmente os tiazídicos, podem apresentar efeito direto sobre o músculo liso vascular, que é independente do seu efeito salurético. Não obstante, acredita-se que estas drogas possam modular canais de potássio, e considerando que o efeito natriurético prolongado pode reduzir secundariamente a concentração intracelular de cálcio, estes efeitos poderiam resultar em vasodilatação e conseqüentemente hipotensão (WARGO e BANTA, 2009; DERER *et al.*, 2010; HERAN *et al.*, 2010; NEFF e NAWARSKAS, 2010).

Existe consenso que o objetivo do tratamento farmacológico e/ou não-farmacológico da HAS é reduzir os níveis pressóricos a valores inferiores a 140 mm Hg para a pressão sistólica, e a valores inferiores a 90 mm Hg para a pressão diastólica. Da mesma forma, a redução da pressão arterial para valores inferiores a 130/80 mm Hg, podem ser úteis em pacientes portadores de diabetes, insuficiência cardíaca, comprometimento renal e na prevenção do AVC (KANNEL, 1996; GOLDSTEIN e HANKEY, 2006; SBC/SBH, 2006; LAGANOVIC, 2010; WEBB *et al.*, 2010). A terapia anti-hipertensiva eficaz evita quase que totalmente, AVCs hemorrágicos, insuficiência cardíaca e a insuficiência renal decorrentes da hipertensão (COMINACINI *et al.*, 2003).

Um dos maiores problemas da farmacoterapia anti-hipertensiva é a não adesão ao tratamento, assim contribuindo para o inadequado controle dos níveis pressóricos do paciente (BUSNELLO *et al.*, 2001; HACKAM *et al.*, 2010). Vários são os fatores que contribuem para a não adesão do paciente ao tratamento farmacológico, entre eles, destacam-se: a falta de conhecimento sobre a doença, ou de motivação para tratar uma doença assintomática e crônica; baixo nível sócio-econômico; aspectos culturais e crenças erradas sobre a patologia; baixa auto-estima; relacionamento inadequado com a equipe de saúde; dificuldades em marcar a consulta e em ser atendido; custo elevado dos medicamentos; ocorrências de efeitos adversos desagradáveis; e a interferência na qualidade de vida após o início do tratamento (AGUIAR, 1981; LESSA e FONSECA, 1997; ANDRADE *et al.*, 2002; PIERIN *et al.*, 2004; KLARENBACH *et al.*, 2010).

Da mesma forma, uma das maiores dificuldades encontradas nas terapias farmacológicas refere-se ao fato de que alguns pacientes mostram-se refratários aos tratamentos convencionais, enquanto outros têm seus níveis pressóricos reduzidos substancialmente, podendo elevar o risco aos portadores de doença coronariana associada (HANSSON *et al.*, 1998; MESSERLI *et al.*, 2006). Neste contexto, o investimento em novos estudos que visem investigar alternativas de prevenção e tratamento (que possam ser utilizadas isoladamente ou aliadas às terapias convencionais) seriam extremamente úteis (EGAN *et al.*, 2010). Assim, uma opção tradicionalmente bem aceita provém dos produtos naturais, especialmente aqueles habitualmente utilizados devido o grande apelo popular. Estes produtos podem representar, potencialmente, uma fonte alternativa no fornecimento de novas estruturas químicas, assim como um recurso ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (SCHENKEL *et al.*, 1999).

1.2 Produtos naturais e hipertensão

Até o início do século passado, apesar dos avanços da medicina e da química, aproximadamente 90% dos medicamentos utilizados compreendiam as plantas medicinais (CORRÊA *et al.*, 2001). Porém, devido às dificuldades com o controle de qualidade desses extratos vegetais, ou ainda por interesse econômico de grandes multinacionais, seus derivados isolados ou quimicamente sintetizados predominaram no mercado. No entanto, no final deste mesmo século, o interesse da medicina e da indústria farmacêutica no segmento fitoterápico aumentou consideravelmente, movido muitas vezes pela ampliação do mercado consumidor (FERREIRA, 1998).

Na segunda metade do século XX houve um substancial incentivo à aplicação da medicina tradicional e popular nas questões de saúde das comunidades (SACRAMENTO, 2001). Órgãos como a organização mundial de saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF) reiterou a importância da inclusão da medicina tradicional na atenção primária à saúde. Desde então, a OMS tem incentivado a pesquisa de novos medicamentos tendo como base as plantas medicinais, assim como sua utilização no tratamento de diversas patologias (WHO, 1978).

Nas décadas de 1980 e 1990, mais de 200 drogas sintéticas foram retiradas do mercado por evidências de graves intoxicações em seres humanos, e os fitoterápicos padronizados ou as plantas medicinais na forma de infusões e tinturas, mostraram-se uma opção terapêutica interessante, retomando seu espaço e sua importância na medicina atual. Uma contingência de trabalhos científicos com plantas medicinais tem crescido substancialmente nas publicações de revistas científicas renomadas, mostrando o interesse e a importância deste tema para a comunidade científica mundial (TYLER, 1999; SMET e PETER, 2002).

No Brasil, a partir da década de 80, o Ministério da Saúde incluiu nas prioridades de saúde do país a pesquisa de plantas com potencial medicinal, com o intuito de desenvolver novos medicamentos (BRASIL, 1981). Da mesma forma, normatizou a implantação da fitoterapia nos serviços de saúde, caracterizado-a como prática oficial da medicina, e programou a normatização do registro de produtos fitoterápicos no sistema de vigilância sanitária (BRASIL, 1988).

Atualmente, acredita-se que objetivo primordial do uso de produtos naturais, não é substituir medicamentos comercializados e já registrados, mas sim aumentar a opção terapêutica no mercado farmacêutico, utilizando produtos com indicações terapêuticas complementares às medicações já existentes. Da mesma forma, esta atividade pode valorizar as tradições populares e fornecer substratos autóctones para o desenvolvimento de uma indústria farmacêutica local (FRANCISCHI, 2005). Por outro lado, o fitoterápico pode representar um medicamento de fácil aceitação pelas comunidades, pois pertence ao arsenal terapêutico tradicional construído culturalmente (FARSNWORTH, 1985).

Nos últimos sessenta anos, graças aos progressos alcançados nos métodos analíticos e farmacológicos, os conhecimentos sobre as plantas medicinais foram consideravelmente aumentados. Entretanto, apesar do grande número de trabalhos publicados acerca de novos constituintes químicos e prováveis benefícios farmacológicos dos produtos naturais, isto pode representar apenas uma pequena parcela do que temos ainda por descobrir; já que é muito expressivo o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como na obtenção de novos princípios ativos que possam ser convertidos em compostos farmacologicamente ativos (FRANCISCHI, 2005; DA CUNHA *et al.*, 2007).

O uso popular de plantas medicinais é amplamente difundido no mundo todo, sendo que aproximadamente 80% da população brasileira e mundial podem estar utilizando plantas medicinais para o tratamento de suas enfermidades (CHECHINEL FILHO e YUNES, 1998; REIS e MARIOT, 2001). Um estudo recente demonstrou que cerca de 37% da população adulta dos Estados Unidos da América utiliza medicamentos fitoterápicos. Entretanto, neste país, os fitoterápicos são considerados suplementos dietéticos, enquanto que no Brasil são classificados como medicamentos pela portaria nº 22/ 1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pela resolução – RDC nº 17/2000 (DESTRO *et al.*, 2006).

Devido ao desenvolvimento de grandes laboratórios farmacêuticos e dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo. Porém, nas últimas décadas, observou-se a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de fitoterápicos e sua produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização. (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Nos últimos anos, a comercialização das plantas medicinais vem crescendo 20% em relação aos medicamentos utilizados na medicina convencional; e isso pode estar ocorrendo, pelo menos em parte, devido ao alto custo dos medicamentos sintéticos (HOWELL *et al.*, 2006). Atualmente, o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos representa 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado é de cinco bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento do ramo farmacêutico norte – americano (ASCHWANDEN, 2001; HOWELL *et al.*, 2006).

Com o crescimento mundial do consumo de fitoterápicos, vários países têm se preocupado em monitorar com que frequência este tipo de terapêutica vem sendo utilizada, tanto que no Canadá, 9,3% dos pacientes que chegam as clínicas médicas mencionam já ter utilizado algum tipo de medicamento fitoterápico (XU e LEVINE, 2008). Um estudo descritivo realizado no estado do Rio de Janeiro, envolvendo a análise de formulários preenchidos pela população usuária do sistema de saúde local e profissionais da área de saúde, permitiu verificar que 63% dos entrevistados utilizam as plantas medicinais como forma de tratamento, mesmo com a disponibilidade de medicamentos sintéticos. Da mesma forma, foi constatada uma utilização expressiva de plantas medicinais (como automedicação) antes da consulta médica, concomitante com o medicamento sintético e, em muitos casos, substituindo-o, sem o conhecimento do médico (FLORENCIO e JUNIOR, 2008). Estes dados demonstram o conhecimento empírico da população em relação ao uso de plantas medicinais, e a necessidade de novos estudos serem conduzidos a fim de esclarecer os efeitos dos constituintes ativos destes produtos naturais.

Quando focamos nossos interesses em produtos naturais destinados ao tratamento de doenças cardiovasculares, observamos que na medicina tradicional várias plantas são empregadas com o objetivo de normalizar a pressão arterial, principalmente devido a suas possíveis propriedades diuréticas (WRIGHT *et al.*, 2007). Por outro lado, atualmente, é muito restrito o número de produtos naturais com atividade comprovada sobre o sistema cardiovascular e utilização na terapêutica ocidental (DA CUNHA *et al.*, 2007). Um dos poucos exemplos são o pó e o extrato das raízes da *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz usados principalmente em países asiáticos por sua ação hipotensora, devido a presença do alcalóide reserpina, um simpaticolítico, outrora comercializado, e muito usado como anti-hipertensivo. Atualmente encontra-se em desuso devido e elevada prevalência de efeitos colaterais, incluindo tendência suicida (CHIEJ, 1988; OATES, 2003).

Várias outras plantas medicinais têm sido propostas, clinicamente, na terapêutica da hipertensão arterial; como o *Viscum album*, que pode conduzir a uma diminuição transitória da pressão arterial devido à presença de compostos protéicos, não sendo, contudo, adequado como anti-hipertensivo. As folhas da oliveira [*Olea europaea* var. *europaea* (Miller) Lehr], de uso tradicional, apresenta importante ação hipotensora atribuída ao seu constituinte secoiridóide, o oleoeuropeósido (ZARZUELO *et al.*, 1991; DUARTE *et al.*, 1993; CHERIF *et al.*, 1996; SOMOVA *et al.*, 2003), embora estudos clínicos realizados não sejam suficientes para validar essa atividade. O alho (*Allium sativum* L.) que, só até 1996, já constavam mais de uma centena de trabalhos comprovando sua atividade hipotensora (REUTER, 1995; 1996), tem sua eficácia comprovada clinicamente no tratamento da hipertensão arterial leve, em uma dose que pode variar de 600 a 1200 mg/dia (SCHULZ *et al.*, 2001).

Pesquisas recentes comprovam que diversos extratos brutos de plantas e/ou frações, subfrações e substâncias puras isoladas mostram-se promissoras como possíveis agentes diuréticos e/ou hipotensores em ratos, coelhos e cobaias (PHILLIPS *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2007; GILANI *et al.*, 2008; MAGOS *et al.*, 2008; ADARAMOYE *et al.*, 2009; SADKI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010). Em estudo realizado na Índia com 73 espécies vegetais utilizadas para o tratamento da hipertensão, verificou-se que 22 destas plantas apresentavam alguma atividade inibidora sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA), desta forma, podendo contribuir efetivamente para a redução dos níveis pressóricos da população (SOMANADHAN *et al.*, 1999).

Nas últimas décadas, observa-se um interesse crescente pelo uso de plantas medicinais e dos respectivos extratos na terapêutica médica, constituindo uma ajuda significativa nos cuidados primários de saúde e como complemento terapêutico para a maioria das especialidades médicas, incluindo a cardiologia. Neste sentido, são necessários, também, estudos e ensaios farmacológicos e toxicológicos, além de experimentação clínica, que demonstrem eficácia e segurança para este tipo de medicamento (SMET e PETER, 2002; DA CUNHA *et al.*, 2007).

Assim, os dados disponíveis nos sugerem a necessidade de investigação efetiva com o intuito de validar farmacologicamente a utilização de produtos naturais como potenciais fontes de novas drogas diuréticas e anti-hipertensivas. Por outro lado, a utilização da cultura popular como indicador etnobotânico de possíveis drogas farmacologicamente ativas mostra-se de grande valor na seleção da espécie

a ser estudada e validada em ensaios farmacológicos (TYLER, 1999; FERRO, 2006).

1.3 *Tropaeolum majus* L.

Tropaeolum majus L. (TROPAEOLACEAE) (Figura 1) é uma planta medicinal, ornamental, hortícola e melífera, originada por hibridismo, multiplicada por semente e atualmente cultivada e disseminada em todo o mundo (SPARRE, 1972; ZANETTI *et al.*, 2003).



Figura 1 – *Tropaeolum majus* L. (Foto do Horto de Plantas medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR).

1.3.1 Descrição botânica

Classifica-se como herbácea aromática, de ramos rasteiros ou escandentes, carnosos e retorcidos. As folhas são peltadas, longo-pencioladas, com cinco nervuras principais saindo do ponto de inserção do pecíolo. Possuem forma orbicular-peltada e grande número de pontoações translúcidas na face superior. Na face inferior ocorre esparsa pilosidade esbranquiçada. Em média atinge 4,5 × 4,0

cm, e pode chegar a 17,5 × 15,5 cm. A margem é inteira, com reentrâncias pouco pronunciadas junto às nervuras de grande porte (LORENZI e MATOS, 2002; ZANETTI *et al.*, 2004). O pecíolo é afilado e atinge em média 9 × 0,5 cm na base e 0,2 cm no ápice, possuindo superfície estriada e inserção central. O caule é arredondado e apresenta-se caracteristicamente em zig-zag decorrente das cicatrizes foliares, formando ângulos de 120-135°. Atinge em média 1 cm de diâmetro, e chega a 5 m de comprimento; apresenta cor verde-clara com base pintalgada em vermelho-salmão na região central que se dispersa em tons róseos claros (ZANETTI *et al.*, 2004). As flores são solitárias, grandes, de cor vermelha, alaranjada, branca ou amarela, muito ornamentais (LORENZI e DE SOUSA, 2001).

1.3.2 Distribuição e sinonímia

É considerada uma importante planta medicinal nativa das regiões montanhosas do México e Peru, e atualmente, amplamente distribuída pelo mundo. É conhecida popularmente como capuxinho, capuxinha, capuxinha-grande, mastruço-do-peru, flor-de-sangue, agrião-do-méxico, chagas, chaguinha, nastúrcio, flor-de-chagas, capucine, cinco-chagas, agrião-da-Índia, mastruço e/ou pela sinonímia de *Cardaminum majus* Moench (LORENZI e DE SOUSA, 2001; LORENZI e MATOS, 2002).

1.3.3 Etnobotânica e composição química

No Brasil, a espécie é amplamente cultivada nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país com fins ornamentais e, suas folhas, botões florais e flores, empregadas na medicina caseira, bem como para fins alimentares. Neste sentido, uma cartilha recentemente publicada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) orienta e recomenda o cultivo desta espécie para fins alimentares e medicinais (VAZ e JORGE, 2006). Possui aroma agradável e sabor picante como o do agrião e com alto valor nutritivo, sendo particularmente rica em enxofre e consumida como salada (BOWN, 1995; PANIZZA, 1998; BOORHEM, 1999). É considerada antiescorbútica, anti-séptica, fortificante dos cabelos e no tratamento de afecções pulmonares (BOORHEM, 1999). A infusão de suas folhas misturada com leite tem sido recomendada para afecções pulmonares e como expectorante; esta é preparada pela mistura de duas colheres (sopa) de folhas

frescas e amassadas em pilão, com uma xícara (chá) de leite quente, ingerindo-se uma xícara (chá) do coado duas vezes ao dia (PANIZZA, 1998). Recomenda-se também seu chá por infusão, preparado adicionando-se água fervente em uma xícara (chá) contendo uma colher (sopa) de folhas frescas ou secas picadas, como diurético e como desinfetante das vias urinárias (PANIZZA, 1998; LORENZI e MATOS, 2002). Em uso externo, o extrato alcoólico de suas folhas frescas é indicado para fortalecer o couro cabeludo, estimulando o crescimento dos cabelos e prevenindo a sua queda. Este deve ser preparado com duas colheres (sopa) de suas folhas frescas, amassadas e adicionadas de uma xícara (chá) de álcool de cereais a 80% e deixadas em maceração durante cinco dias (LORENZI e DE SOUSA, 2001). Nos últimos anos, também vem sendo utilizada como anti-hipertensiva, antidepressiva, no combate da ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica), estafas, psoríase, eczema, escrofulose e na limpeza de pele e olhos. Seus frutos secos reduzidos a pó também são utilizados como purgante (FERREIRA, 2000).

Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de ácidos graxos (ácido erúrico, ácido oléico e linoléico), isotiocianato de benzila e flavonóides glicosilados (isoquercitrina e caempferol) nas sementes e folhas de *T. majus* (DE MEDEIROS *et al.*, 2000; MIETKIEWSKA *et al.*, 2004; SANGALLI *et al.*, 2004; ZANETTI *et al.*, 2004). Os flavonóides são caracterizados como pigmentos de plantas, solúveis em água, que apresentam como característica principal um anel aromático com uma ou mais hidroxilas associadas (GELEIJNSE e HOLLMAN, 2008). Eles pertencem a um grande grupo de plantas e podem ser divididos em mais de 10 diferentes subclasses, incluindo os flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavononas (ARTS e HOLLMAN, 2005; GELEIJNSE e HOLLMAN, 2008).

Mais de 6.000 diferentes flavonóides são descritos pela literatura e estão presentes em abundância em diversas plantas comestíveis, onde contribuem diretamente com os inúmeros efeitos benéficos dos vegetais, grãos e frutas (SCALBERT *et al.*, 2005). Cerca de 80% dos flavonóides incluem as flavonas, os flavonóis e as flavanonas. São exemplos de flavonas a apigenina e a luteolina; dos flavonóis, o caempferol, a quercetina e seu análogo glicosilado isoquercitrina; e das flavononas, a naringenina (FERRO, 2006)

Os flavonóides foram considerados como vitaminas até meados dos anos 50, e posteriormente, criticados por possuírem possíveis atividades carcinogênicas. No entanto, no final dos anos 80 alguns representantes passaram a ser considerados anticarcinogênicos (HERTOG *et al.*, 1993). A partir dos anos 90, diversos grupos de

pesquisa reportaram importantes efeitos cardioprotetores de diversos flavonóides, entre eles, a quercetina, o caempferol e a miricitrina. O consumo aproximado de 30 mg/dia de alguns flavonóis, ou o consumo regular de alimentos ricos em flavonóides, reduziram significativamente a morbimortalidade por doenças coronarianas, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (HERTOG *et al.*, 1993; KELI *et al.*, 1996; GELEIJNSE *et al.*, 2002; HOOPER *et al.*, 2008).

Vários benefícios cardiovasculares dos flavonóides e de plantas ricas nestes compostos são descritos na literatura científica, tais como ação ateroprotetora e estabilizadora de placas ateroscleróticas (ENKHMAA *et al.*, 2005; MOTOYAMA *et al.*, 2009), antioxidante (VITOR *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; PEREZ e DUARTE, 2010), vasodilatadora (PEREZ e DUARTE, 2010), anti-hipertensiva (EMURA *et al.*, 2007), inibidora da ECA (SOMANADHAN *et al.*, 1999; LACAILLE *et al.*, 2001), antiplaquetária (EL HAOUARI *et al.*, 2007) e antagonista dos receptores da angiotensina II (XUE *et al.*, 2008).

Investigações prévias também relatam a presença abundante de glicosinolatos (benzilglicosinolatos) como a glucotropaeolina e a sinalbina nas folhas de *T. majus*; como também, de alguns triterpenos tetracíclicos (KJAER *et al.*, 1978; LYKKESFELDT e MOLLER, 1993; GRIFFITHS *et al.*, 2001). Os glicosinolatos são glicosídeos aniônicos encontrados em 16 famílias de espécies de plantas dicotiledôneas, incluindo as espécies comestíveis. Em sua forma nativa, os glicosinolatos possuem baixa atividade biológica, mas eles sempre coexistem, em diferentes compartimentos da planta com a enzima mironase, que após o dano tecidual hidrolisa-os a compostos bioativos, chamados isotiocianatos. Estes podem ser tóxicos contra fungos, bactérias, insetos e nematóides contidos na planta (WIELANEK e URBANEK, 2006).

1.3.4 Propriedades farmacológicas e toxicidade

Vários estudos em farmacologia experimental foram conduzidos com *T. majus*. Atividades frente o vírus do herpes simplex I e II, bem como efeitos antibacterianos e antifúngicos foram atribuídos a esta espécie (VICHANOVA *et al.*, 1972; SANTA CRUZ, 1991; PINTÃO e PAIS, 1994). O extrato aquoso obtido das folhas de *T. majus* apresentou fraca atividade inibidora (*in vitro*) sobre a ECA (HAN *et al.*, 1991). Por outro lado, os extratos preparados com metanol ou cloreto de metila mostraram importante atividade antitrombótica (DE MEDEIROS *et al.*, 2000).

O isotiocianato de benzila, obtido das folhas de *T. majus*, apresentou efeito antiviral, antitumoral e antibiótico em infecções do trato urinário (BINET, 1964; KJAER *et al.*, 1978). As frações hexânica e clorofórmica obtidas do extrato etanólico (70%) de *T. majus* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella setubal*. Corroborando com estes dados, o ácido erúcido, que se popularizou durante a década de 80 como óleo de Lorenzo, mostrou-se eficaz como agente antibacteriano (ZANETTI *et al.*, 2003). Não obstante, os glicosinolatos apresentaram propriedades anticancerígenas frente a uma linhagem de células tumorais humanas (PINTÃO *et al.*, 1995). Da mesma forma, o triterpeno curcubitacina obtido desta espécie, apresentou significativa atividade antineoplásica (PICCIARELLI *et al.*, 1984; PICCIARELLI e ALPI, 1987).

Poucos trabalhos toxicológicos foram desenvolvidos com esta espécie. Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria relataram ausência de toxicidade aguda em camundongos após a administração oral de até 5 g/kg da infusão e do extrato etanólico (70%) obtido de *T. majus* (ZANETTI *et al.*, 2003).

Frente a estes resultados, e considerando que inexitem trabalhos publicados que justifiquem e/ou subsidiem a utilização popular desta espécie como agente diurético e/ou hipotensor (PANIZZA, 1998; FERREIRA, 2000; LORENZI e MATOS, 2002) e acreditando que existe a necessidade de ampliar o arsenal terapêutico complementar nestas condições, objetivamos investigar os possíveis efeitos cardiovasculares e renais do infuso e do extrato etanólico obtido das folhas de *T. majus* em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR).

II HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho foi que os extratos obtidos de *T. majus* podem apresentar atividade diurética e hipotensora em modelos experimentais, e que este efeito é decorrente da presença abundante de compostos polifenólicos nesta espécie. Se nossa hipótese for verdadeira, poderemos justificar seu uso popular em afecções renais e cardiovasculares.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos renais e cardiovasculares do infuso, extrato etanólico (HETM), fração purificada (TMLR) e do flavonóide isoquercitrina presente em *Tropaeolum majus* L. (TROPAEOLACEAE), utilizando ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade diurética aguda (dose única) e prolongada (doses repetidas) do infuso, HETM, TMLR e do flavonóide isoquercitrina (ISQ) identificado em *T. majus* utilizando modelo de diurese em ratos;
- Investigar se os tratamentos realizados com o HETM, TMLR e ISQ podem interferir nas concentrações séricas de aldosterona e vasopressina após a administração prolongada;
- Aferir o possível efeito da HETM, TMLR e ISQ sobre a atividade da ECA plasmática durante os tratamentos agudo e prolongado;
- Investigar a possível participação dos metais presentes nas folhas de *T. majus*, na atividade diurética observada, utilizando técnica de absorção atômica;
- Verificar as prováveis alterações na hemodinâmica renal através da investigação do envolvimento da bradicinina, prostaglandinas e óxido nítrico;
- Avaliar uma possível atividade sobre a anidrase carbônica eritrocitária e bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal;
- Investigar a provável ação hipotensora do HETM, TMLR e ISQ utilizando ratos normotensos e SHR anestesiados;
- Avaliar o papel da inibição da ECA (*in vivo*) no efeito hipotensor observado;
- Determinar o envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na ação hipotensora da ISQ;
- Verificar os efeitos da inibição prolongada da síntese do óxido nítrico frente à resposta hipotensora e inibidora da ECA da ISQ;

- Determinar os níveis de nitrito sérico como indicador da biodisponibilidade do óxido nítrico corporal, utilizando ratos SHR, após o tratamento prolongado com a ISQ;
- Identificar através de técnicas histológicas os efeitos do tratamento prolongado com a ISQ sobre as espécies reativas de oxigênio (ERO) em artéria mesentérica de ratos SHR.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material botânico foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da UNIPAR (Universidade Paranaense), campus Umuarama (Brasil) a 430 m de altitude em relação ao nível do mar (S23°47'55-W53°18'48) (Figura 2). A área para cultivo e as plantas matrizes de *T. majus* L. (Figura 3) foram selecionadas e coordenadas pela professora doutora Ezilda Jacomassi. As folhas foram coletadas em junho de 2007 no período da manhã.

O material vegetal foi seco em estufas com circulação forçada de ar à 37°C por cinco dias. Após a secagem, o material foi submetido à trituração. A pulverização foi realizada em trituradores industriais, e em seguida, o material foi acondicionado em sacos duplos, de polietileno na parte interna e de papel Kraft na parte externa, até o preparo dos extratos brutos.

Um exemplar da espécie em estudo, identificado pela professora doutora Mariza Barion Romagnolo, está catalogada sob número 2230 no herbário do Horto de Plantas Medicinais da UNIPAR campus Paranavaí.



Figura 2 – Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense – UNIPAR.



Figura 3 – Canteiros para cultivo de plantas medicinais (Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR).

4.2 Preparo dos extratos

4.2.1 Obtenção dos extratos aquosos (infuso)

Os extratos aquosos foram obtidos por infusão, segundo preconizado pelo uso popular (LORENZI e MATOS, 2002), em três concentrações diferentes (2,5; 5 e 10%), e preparados imediatamente antes da utilização. Para isto, quantidades exatas de 2,5; 5 e 10 gramas do material vegetal seco e pulverizado, foram acondicionados em 100 ml de água destilada em ebulição e mantidos em temperatura ambiente, em recipiente tampado, por 15 minutos. O infuso resultante foi filtrado e administrado em um volume constante de 5 ml/kg, correspondendo a dosagens de 125, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. O rendimento final obtido com o infuso foi de 14,35; 16,19 e 18,22% para as concentrações de 2,5; 5 e 10%, respectivamente.

4.2.2 Obtenção do extrato bruto etanólico (HETM)

O extrato etanólico (90%), obtido a partir de álcool de cereais, foi preparado na proporção de 100 g da droga vegetal pulverizada a cada 1000 ml de solvente. A

extração foi realizada por maceração à temperatura ambiente (PRISTA *et al.*, 1975), inicialmente por 48 horas e posteriormente até esgotamento (7 dias). O extrato obtido foi filtrado e concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura entre 50-55 °C. Após a eliminação do solvente orgânico, o extrato concentrado foi liofilizado e separado em alíquotas de 10 gramas, em frascos de cor âmbar, identificados com número de lote e data, sendo conservado em freezer com temperatura média de -20 °C. O rendimento obtido com esta preparação foi de 15.39% do peso seco da droga vegetal.

4.3 Preparo e obtenção da fração purificada livre de sacarose (TMLR)

A metodologia utilizada no preparo da TMLR foi padronizada pela professora Dr^a Maria Élide Alves Stefanello do departamento de química da UFPR. A resina (Amberlite XAD-2) utilizada neste processo, foi cedida pelo professor Dr^o Marcos José Salvador da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Para este procedimento, 1,0 g do extrato liofilizado foi dissolvido em 10 ml de água destilada e filtrado através de papel plegueado. O papel foi lavado com 30 ml de água, resultando em um volume final de 40 ml. Uma porção de 10 ml da solução anterior foi eluída através de uma coluna contendo 10 gramas de uma resina previamente condicionada (Amberlite XAD-2). Em seguida a coluna foi eluída, sucessivamente, com 25 ml de água destilada, 25 ml de etanol 95% e novamente com 25 ml de água destilada. O eluato contendo etanol foi reservado e os demais descartados. O processo foi repetido mais três vezes para consumir toda a solução do extrato liofilizado. As soluções etanólicas foram reunidas e o solvente removido em rotaevaporador, originando a fração purificada TMLR (153 mg; 15,3% de rendimento). Essa fração foi analisada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN - ¹H e ¹³C), mostrando que estava livre de sacarose (dados não mostrados).

4.4 Análise fitoquímica

4.4.1 Espectrofotometria de absorção atômica

As análises dos metais presentes nas folhas de *T. majus* foram determinadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) utilizando um sistema de

absorção atômica em chama ar/acetileno (GBC 932 Plus). Todas as análises foram coordenadas pelo professor Dr. Douglas Cardoso Dragunski da Universidade Paranaense (UNIPAR).

Para a extração dos metais (cromo, níquel, chumbo, ferro, zinco, cobre, sódio, potássio, cálcio e magnésio) presentes nas folhas de *T. majus*, utilizou-se 0,5 g da amostra, adicionando-se 6 ml de ácido nítrico e 3 ml de peróxido de hidrogênio (30%). A mistura foi colocada em uma chapa de aquecimento a 100 °C por 90 minutos, filtrada e acondicionada em um balão de 50 ml, completando seu volume com água Milli-Q. As digestões foram realizadas em triplicata. A confiabilidade do processo de digestão foi verificada pela recuperação de todos os elementos, que acológica da hipertensão, atualmente, destaca-se as drogas bloqueadoras de canais de cálcio, que reduzem a pressão arterial sistêmica ao relaxar o músculo liso arteriolar induzindo vasodilatação.resentando um coeficiente de regressão linear superior a 0,997.

4.4.2 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)

As análises de Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* (ESI-MS) foram coordenadas pelo professor Dr. Marcos José Salvador da Universidade de Campinas (UNICAMP). O ESI-MS foi realizado utilizando um sistema de massa com triplo quadrupolo (Quattro LC - Micromass, United Kingdom), com uma interface de Z-eletrospray operando em modo íon negativo (30 V) e positivo (30 V).

O HETM e a TMLR foram diluídas em uma solução contendo 50% (v/v) de metanol e 50% (v/v) de água deionizada, além de 0,5% de hidróxido de amônio. As condições gerais para o ESI-MS foram: temperatura da fonte de 100 °C, tensão capilar de 3,0 kV e tensão do cone de 30 V. Para as medidas no modo íon negativo ESI (-)-MS, 10 µl de NH₄OH concentrado foi adicionado à amostra perfazendo um volume total de 1000 µl, com concentração final de 0,1%. Para as medidas no modo íon positivo ESI (+)-MS, 10 µl de ácido fórmico concentrado foi adicionado a amostra, obtendo-se uma concentração final de 0,1%.

O ESI-MS foi iniciado com uma infusão de fluxo de 10 µl minuto ml⁻¹ com auxílio de uma bomba (instrumento de Harvard). A análise estrutural dos íons presentes nos espectros do HETM e TMLR foi executada por ESI-MS/MS. O íon com o m/z de interesse foi selecionado e submetido a 15-45 colisões (eV) com

argônio no quadrupolo de colisão. A pressão de gás para colisão foi aperfeiçoada visando produzir a extensiva fragmentação do íon sob investigação. Os compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de fragmentação (ESI-MS/MS) com dados da literatura (ROESLER *et al.*, 2007; YE *et al.*, 2007).

4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram coordenadas pelo professor Dr. Marcos José Salvador da Universidade de Campinas (UNICAMP). As análises foram realizadas em um sistema Shimadzu LC-2010C. O detector de UV foi ajustado para λ 330 nm. Em cada protocolo, 10 μ l de amostra foi injetada em uma coluna RP-18 (5 μ m, 225 x 4,6 mm) (Lichrospher®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) protegida por um guarda coluna RP-18 Merck (5 μ m; 4,0 x 3,0 mm). As áreas máximas foram calculadas por um integrador Shimadzu CLASS-VP™ 7.2.1.

Para o preparo da solução padrão, a isoquercitrina foi dissolvida em metanol/água (1:1, v/v). As soluções obtidas foram preparadas em oito concentrações, variando de 1-20 g/ml. As análises quantitativas de CLAE foram conduzidas utilizando uma coluna RP-18 (Lichrospher®, 5 μ m, 225 x 4,6 mm). A fase móvel consistiu em uma inclinação linear combinando o solvente A (acetonitrilo) e o solvente B (água/ácido acético, 99:1, v/v, pH 2,88) como se segue: 15% A (15 minutos), 15-20% A (7 minutos), 20% A (5 minutos), 20-40% A (5 minutos), 40% A (5 minutos), 40-15% A (5 minutos). As análises foram realizadas em triplicata, em uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min, com detector de UV de λ 330 nm, e volume de injeção de 10 μ L. Os gráficos de calibração foram plotados mostrando um relacionamento linear entre as concentrações e as áreas máximas do composto de referência. A equação de regressão foi $y = 3754,6x + 17,78$ ($R=0,9956$) para a isoquercitrina, onde y é a área máxima e x é a concentração usada. Amostras pesadas do HETM e da TMLR foram dissolvidas em metanol/água (1:1, v/v) e analisadas nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para a isoquercitrina. A atribuição do pico cromatográfico foi baseada nos tempos de retenção e confirmada pela análise comparativa com o padrão isolado. Sob nossas condições de trabalho, o tempo de retenção para a isoquercitrina foi 33,75 min. A concentração da área máxima para a isoquercitrina foi calculada pela interpolação analítica da linha de calibração. O limite da quantificação (LOQ) para o composto analisado foi de 1,23 μ g/ml. Os desvios

padrão relativos (% RSD) ficaram em uma escala de 0,30 a 2,80%, calculados em triplicata, visto que por tempos de retenção os RDS foram menores que 1%.

4.5 Drogas e sais

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: cloreto de sódio e acetilcolina (ambos da Merck; Alemanha); isoquercitrina, N^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), ODQ, Hip-His-Leu, apocinina, ortodifalaldeído, furosemida, hidroclorotiazida, espirolactona, acetazolamida, bradiginina, angiotensina I, angiotensina II, HOE-140, indometacina, captopril e losartan (todos da Sigma Chemical; EUA); xilazina e cetamina (Bayer); Vectashield® (Vector Laboratories; EUA); XAD-2 Amberlite (UNICAMP). Todos os demais solventes e reagentes utilizados foram adquiridos com grau analítico.

4.6 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, machos e fêmeas, variedade Wistar, albinos, com idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Também foram utilizados *Rattus norvegicus*, variedade Wistar Kyoto (WKY) e Espontaneamente Hipertensos (SHR), machos, com idade entre 3 e 4 meses, provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). 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 (mantidos sob condições controladas) para que pudessem passar por um período de ambientação. O número de animais por grupo foi de 6 (seis) indivíduos. Este número foi estimado com base em estudos prévios, dos quais se extraiu a variabilidade esperada (variância) e se estimou estatisticamente o N por grupo de 6 animais, pois este número permite que se detecte uma diferença maior ou igual a 20% nos parâmetros a serem investigados ($\alpha=0,05$; $N= 0,20$). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFPR sob número 240.

4.7 Teste de atividades gerais (hipocrático) e toxicidade aguda

Ratos (machos e fêmeas) foram pesados, identificados e tratados com a infusão e com o extrato bruto etanólico (HETM) obtido de *T. majus*, resuspenso em veículo aquoso, pela via oral (sonda orogástrica rígida), com dose de 5 g/kg, num volume de 10 ml/kg. Da mesma forma, grupos de ratos (n=6) receberam os extratos, por via intraperitoneal, em doses de 1 e 3 g/kg em um volume máximo de 5 ml/kg. Cada animal, após o tratamento, foi colocado sobre uma superfície plana e observado continuamente durante a primeira hora e a cada hora durante as primeiras 6 horas, e posteriormente, duas vezes ao dia durante 14 dias, para a verificação da ocorrência de possíveis sinais indicativos de algum efeito farmacológico e/ou de intoxicação (tremores, convulsões, hipoatividade, ataxia, letargia, e outros) (MALONE, 1977; GAZDA *et al.*, 2006). Os animais do grupo controle receberam doses isovolumétricas de veículo (água destilada) por via oral (v.o.) e salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal (i.p.).

4.8 Protocolos experimentais

4.8.1 Avaliação da atividade diurética

4.8.1.1 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única)

A atividade diurética foi determinada segundo métodos previamente descritos (KAU *et al.*, 1984), com pequenas modificações. Os animais foram mantidos em jejum na noite anterior aos tratamentos, com livre acesso a água. Para estes protocolos os animais foram divididos em cinco grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I - Quatro grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética aguda (dose única) com o extrato aquoso (infuso) obtido de *T. majus*, nas concentrações de 2,5; 5 e 10% (correspondendo, respectivamente, a doses de 125, 250 e 500 mg/kg).

Grupo experimental II – Quatro grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética aguda (dose única) com o extrato etanólico (HETM) obtido de *T. majus*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg.

Grupo experimental III – Cinco grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética aguda (dose única) com a fração purificada (TMLR) obtida de *T. majus*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg.

Grupo experimental IV – Quatro grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética aguda (dose única) com a isoquercitrina (ISQ), nas doses de 5 e 10 mg/kg.

Grupo experimental V – Seis grupos de seis ratos (normotensos) para o estudo comparativo da atividade diurética aguda (dose única) do HETM (300mg/kg) com os diuréticos de referência espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg), furosemida (FURO; 10 mg/kg) e hidroclorotiazida (HCTZ; 10 mg/kg).

Cada animal foi isolado em uma gaiola metabólica individual 24 horas antes dos inícios dos experimentos para adaptação. Antes dos tratamentos, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 ml/100g) para impor uniformidade corporal de sal e água (BENJUMEA *et al.*, 2005). O primeiro grupo recebeu veículo (água deionizada) em um volume de 5 ml/kg e serviu como grupo controle. Subsequentemente, grupos de ratos (de acordo com os protocolos descritos acima) receberam oralmente o HETM, TMLR, ISQ, ESPIRO, ACTZ, FURO ou HCTZ (em um volume final de 5 ml/kg). A urina foi coletada em um cilindro graduado e seu volume registrado em intervalos de 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas após os tratamentos. Ao volume final de urina excretada (15 horas) foram mensuradas as concentrações de sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, a densidade, o pH e a condutividade.

4.8.1.2 Avaliação da atividade diurética prolongada (doses repetidas)

Para estes experimentos os animais foram divididos em três grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I – Cinco grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética prolongada (doses repetidas) do HETM nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg.

Grupo experimental II – Cinco grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética prolongada (doses repetidas) da TMLR nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg.

Grupo experimental III – Quatro grupos de seis ratos (normotensos) para a investigação da atividade diurética prolongada (doses repetidas) da ISQ nas doses de 5 e 10 mg/kg. Em todos os protocolos em que foi utilizada doses repetidas a ISQ foi administrada duas vezes ao dia.

Os animais foram mantidos em jejum na noite anterior aos tratamentos, com livre acesso a água. Cada animal foi isolado em uma gaiola metabólica individual 24 horas antes dos inícios dos experimentos (para adaptação). Para impor uniformidade corporal de sal e água, antes dos tratamentos, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 ml/100g) (BENJUMEA *et al.*, 2005). Diariamente, doses orais de HETM, TMLR e ISQ (conforme descrito anteriormente) e espironolactona (50 mg/kg) foram administradas para diferentes grupos de ratos por 7 dias; os animais controle receberam água deionizada (5 ml/kg todos os dias. Para cada rato, a urina produzida em 24 horas foi coletada e o volume urinário mensurado. As concentrações urinárias de sódio foram determinadas em cada amostra coletada. Os níveis séricos de sódio, potássio, uréia, creatinina, aldosterona e vasopressina foram determinados no final dos experimentos (sétimo dia).

4.8.1.3 Métodos bioquímicos

Para as análises séricas, amostras de sangue foram coletadas em tubos cônicos, contendo ou não EDTA, após decapitação. O plasma e o soro foram obtidos por centrifugação (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C), e armazenados a -20 °C até as respectivas análises. Os níveis de sódio e potássio urinários e plasmáticos foram quantificados por espectrofotometria de chama. As concentrações de cloreto e bicarbonato urinário foram quantificadas por argentimetria (titulação). As concentrações de uréia e creatinina no plasma foram determinadas através de método enzimático por analisador automatizado BM/Hitachi 912 (Cobas Mira, Roche,

Indianópolis, USA). A aldosterona sérica foi mensurada por teste imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; Immuno-Biological Laboratories, Inc). Os níveis de vasopressina foram estimados com a utilização de radioimunoensaio de fase sólida baseado em anticorpos específicos da vasopressina imobilizados na parede de um tubo de polipropileno (DIASOURCE Vasopressin-RIA kit). Todas as análises foram realizadas e/ou intermediadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense – UNIPAR, sob responsabilidade do professor Francisco Hiroshi Matumoto.

4.8.2 Avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade diurética

4.8.2.1 Participação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) na diurese induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

A atividade inibitória sobre a ECA plasmática foi determinada de acordo com técnica previamente descrita (SANTOS *et al.*, 1985), e dividida em dois protocolos.

Protocolo I: Para a avaliação da atividade inibidora da ECA em tratamento agudo, diferentes grupos de ratos normotensos (n = 6) receberam por via oral água destilada (5 ml/kg), HETM (30, 100 e 300 mg/kg), TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), ISQ (5 e 10 mg/kg) ou captopril (60 mg/kg). Após 1,5 horas, amostras de sangue (2 ml) foram obtidas por decapitação. O soro foi separado por centrifugação (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e armazenado a -20 °C até as respectivas análises.

Protocolo II: Para a avaliação da atividade inibidora da ECA em tratamento prolongado, diferentes grupos de ratos normotensos (n = 6) receberam, diariamente, por sete dias, pela via oral, água destilada (5 ml/kg), HETM (30, 100 e 300 mg/kg), TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), ISQ (5 e 10 mg/kg) ou captopril (60 mg/kg). A ISQ e o captopril foram administrados duas vezes ao dia. No final deste período, amostras de sangue (2 ml) foram obtidas por decapitação. O soro foi separado por centrifugação (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e armazenado a -20 °C até as respectivas análises.

Para a determinação da atividade da ECA plasmática, 10 µl do soro obtido dos animais tratados foi incubado com 490 µl de uma solução de ensaio contendo 5 mM de Hip-His-Leu, por 15 minutos a 37 °C, seguido da adição de 1,2 ml de NaOH (0,34 N) e 100 µl de orto-ftaldialdeído (2% em metanol), sendo incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, foi adicionado 200 µl de HCL (3 N) e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. A amostra foi submetida à

leitura fluorimétrica (365 nm de excitação e 495 nm de emissão) num tempo inferior a 30 minutos.

4.8.2.2 Estudo do envolvimento da bradicinina na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Tendo como base o protocolo anterior, em que detectamos significativo efeito inibidor sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática, e considerando que este efeito poderia intensificar a atividade da bradicinina corporal, optamos por estudar o papel da bradicinina na atividade diurética observada. Com esta finalidade, tratamos o primeiro grupo, por via oral, com água deionizada (5 ml/kg) servindo como grupo controle. Em seguida, quatro grupos de ratos normotensos receberam pela via oral, respectivamente, HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg). Posteriormente, outros cinco grupos de ratos, foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com HOE-140 (um antagonista dos receptores da bradicinina) (1,5 mg/kg; 15 minutos antes do início dos experimentos) seguido do tratamento oral com água deionizada (5 ml/kg), HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg), a fim de avaliarmos o papel da bradicinina na atividade diurética observada. A urina foi coletada e seu volume mensurado 8 horas após os tratamentos. As concentrações de sódio foram determinadas nas amostras de urina após o final dos experimentos.

4.8.2.3 Estudo do envolvimento das prostaglandinas na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Neste protocolo, foi investigado o papel das prostaglandinas na manutenção da diurese e do fluxo sanguíneo renal. Com esta finalidade, grupos distintos de ratos normotensos receberam pela via oral água deionizada (5 ml/kg), HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg). Posteriormente, outros cinco grupos de ratos foram tratados pela via oral com uma dose de 5 mg/kg de indometacina (um inibidor da síntese de prostanóides) (1 hora antes do início dos experimentos) seguido do tratamento com água deionizada (5 ml/kg), HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg). A urina foi coletada e seu volume mensurado 8 horas após os tratamentos. As

concentrações de sódio foram determinadas nas amostras de urina após o final dos experimentos.

4.8.2.4 Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade diurética induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Para avaliarmos o papel do óxido nítrico na manutenção do efeito diurético e da hemodinâmica renal, tratamos o primeiro grupo de animais, pela via oral, com veículo (água deionizada) em um volume de 5 ml/kg (controle). Em seguida, quatro grupos de ratos receberam, pela via oral, respectivamente HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg). Posteriormente, outros cinco grupos de ratos foram tratados (pela via oral) com L-NAME 60 mg/kg (um inibidor da óxido nítrico sintase) (1 hora antes do início dos experimentos) seguido do tratamento oral com água deionizada (5 ml/kg), HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou espironolactona (50 mg/kg). A urina foi separada e seu volume mensurado 8 horas após o início das coletas. As concentrações de sódio foram determinadas nas amostras de urina após o final dos experimentos.

4.8.2.5 Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal

As análises para a determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal foram coordenadas pela professora Dr^a Elisa Suzana Carneiro Pôças do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ).

Para isto, ratos machos normotensos foram submetidos à eutanásia por decapitação, tendo seus rins imediatamente retirados. Os órgãos foram secos com o auxílio de um papel de filtro, pesados e armazenados em freezer com temperatura a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ até a preparação do homogeneizado. Os órgãos foram homogeneizados em um Potter com solução de sacarose (0,25 M, tamponada com Tris-HCl, pH 7,4). O homogeneizado foi submetido a tratamento caotrópico antes de ser congelado e depois submetido a um esquema de centrifugações diferenciais para se obter uma fração subcelular enriquecida em $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, conforme descrito anteriormente (NOEL e GODFRAIND, 1984).

A atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ foi determinada segundo o método colorimétrico, o qual se baseia na determinação quantitativa do fosfato inorgânico (Pi) liberado

devido à hidrólise enzimática do ATP. A reação foi processada à 37 °C em meio contendo NaCl 87,6 mM, MgCl₂ 3 mM, ATPNa₂ 1,2 mM, EGTA 1 mM, NaN₃ 10 mM, tampão maleato-Tris 20 mM (pH 7,4), na presença ou ausência de KCl 3 mM e ouabaína 1 mM. Da mesma forma, paralelamente, foram realizadas incubações com concentrações crescentes de HETM, TMLR ou ISQ (3, 10 e 30 µM). Após um intervalo de 2 h, a reação é interrompida pela adição de solução de Fiske gelada. Assim, o Pi produzido pela hidrólise enzimática do ATP é levado a reagir com o molibdato de amônio, formando o fosfomolibdato de amônio e os valores de absorbância são determinados por espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 650 nm, após 20 min da adição do reagente de Fiske.

A avaliação da inibição da atividade Na⁺/K⁺/ATPásica é realizada através da comparação entre a diferença dos valores de atividade ATPásica total e da atividade basal (estes obtidos na ausência de K⁺ e em presença de 1 mM de ouabaína – concentração que atinge a inibição máxima) e os valores de atividade obtidos na presença de concentrações crescentes de HETM, TMLR ou ISQ (POCAS *et al.*, 2003).

4.8.2.6 Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária

Foi realizada a determinação da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária segundo técnica descrita previamente (TASHIAN, 1989).

Para este protocolo, amostras de sangue foram coletadas de animais normotensos, tratados por sete dias com veículo (água destilada), HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg) ou ISQ (10 mg/kg). Do material resultante, o soro e o concentrado de hemácias foram separados. A 1 ml do concentrado de hemácias, obtido dos grupos tratados, adicionou-se 3 ml de água destilada para hemólise, seguindo-se a separação do estroma pela adição de 3 ml de clorofórmio, agitação vigorosa da mistura e centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante destinado à determinação da atividade da anidrase carbônica foi então diluído na razão 1/10 (v/v) em água destilada, obtendo-se um hemolisado na diluição 1/40 (v/v). Em dois tubos foi pipetado 0,05 ml do hemolisado diluído 1/40 (v/v) em água destilada, ao qual se acrescentou 1 ml de acetato de α-naftila a 1,7 mM em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, contendo dioxana a 2%. A um dos tubos adicionou-se, antes do substrato, 1 ml de acetazolamida a 8 mM em uma solução diluída de NaOH, seguindo-se da incubação em banho maria durante 20 minutos a 37 °C. Em outro

tubo, a acetazolamida foi adicionada após o período de incubação. Ao final acrescentou-se, a ambos os tubos, 0,5 ml de 5-cloro-o-toluidina (Fast Red-TR salt) a 2 mg/ml em uma solução de laurilsulfato de sódio a 1,2%.

Após aguardar 15 minutos para o completo desenvolvimento da cor mediu-se a absorbância em 555 nm, contra tubos brancos contendo água destilada em lugar das amostras (enzima). A atividade da anidrase carbônica eritrocitária corresponde a diferença da absorbância do tubo 2 pelo tubo 1, sendo o tubo 1 aquele que recebeu acetazolamida no início da incubação e o tubo 2 o que recebeu este inibidor após transcorridos os 20 minutos de incubação. Foi considerada 1 unidade (U) de atividade como 1 μ mol de acetato de α -naftol produzido por minuto por ml de hemolisado.

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

Ratos normotensos ou SHR foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/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 20), destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 3 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 de cada animal 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 cateter de polietileno, devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinado à mensuração contínua da pressão arterial. Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/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 v 4.00, MacLab, ADI Instruments, EUA).

4.8.3.1 Avaliação dos efeitos do HETM e da TMLR na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos

Nestes experimentos, uma única dose de HETM (100 mg/kg, v.o.), ou veículo (CT), foram administrados aos animais 1,5, 3, 6 e 12 horas antes da mensuração da PAM. A cirurgia foi iniciada 30 minutos antes do tempo desejado. Um intervalo de 15 minutos foi aguardado, e então a PAM foi mensurada por mais 30 minutos. Outros grupos de ratos que receberam HETM (10-300 mg/kg, v.o.), TMLR (12,5-100 mg/kg, v.o.) ou veículo, tiveram a PAM mensurada após 1,5 horas dos tratamentos (melhor resposta hipotensora). Cada animal foi testado apenas com uma droga/dose estudada.

4.8.3.2 Avaliação da atividade hipotensora do HETM e da TMLR em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Neste protocolo, grupos de ratos WKY e SHR receberam por via intraduodenal o HETM ou a TMLR nas doses de 100 e 50 mg/kg, respectivamente. Para a estabilização da pressão sanguínea, após o procedimento cirúrgico e administração da droga vegetal, um intervalo de 15 minutos foi aguardado, e então a PAM foi mensurada por mais 30 minutos. O grupo controle recebeu veículo pela via intraduodenal em um volume constante 100 µl/100 g.

4.8.3.3 Avaliação dos efeitos da isoquercitrina (ISQ) na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos

Para este experimento, a isoquercitrina foi testada de duas maneiras:

I – Após o período de estabilização (15 minutos), diferentes grupos de ratos normotensos receberam pela via endovenosa uma injeção de veículo (solução salina) ou a ISQ nas doses de 0,5; 1; 2 e 4 mg/kg. A administração da ISQ foi padronizada em um volume constante de 100 µl/100 g de peso corporal.

II – Diferentes grupos de ratos normotensos receberam pela via oral, veículo ou uma dose de 5 ou 10 mg/kg de ISQ. Após uma (01) hora, os animais foram

anestesiados e canulados, e um intervalo de 15 minutos foi respeitado (perfazendo 1.5 horas do início dos tratamentos). Em seguida, a PAM foi mensurada por 30 minutos.

4.8.3.4 Efeitos da pré-administração da ISQ sobre as alterações na PAM induzida pela angiotensina I e bradicinina

Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina e administradas pela via intravenosa (*bolus*) em um volume constante de 100 µl/100g de peso corporal. Depois da avaliação da PAM basal, diferentes grupos de ratos normotensos receberam angiotensina I (Ang I) na dose de 10 pmol/kg, ou bradicinina (BK) na dose de 30 nmol/kg. Quando a PAM retornava aos valores basais, a ISQ (4 mg/kg), captopril (10 nmol/kg), ou somente solução salina (0,9%) foram administrados. Após um período de 5 minutos, o protocolo foi repetido (Ang I ou BK). As mudanças na PAM foram calculadas como a diferença entre os valores basais e as variações mensuradas após a administração de cada dose de Ang I ou BK (MONTENEGRO *et al.*, 2009).

4.8.3.5 Efeitos da ISQ sobre a resposta hipertensora da angiotensina II

Depois da avaliação da PAM basal, os animais receberam uma administração intravenosa de angiotensina II (Ang II) na dose de 10 pmol/kg. A dose foi selecionada com base em estudos anteriores (MONTENEGRO *et al.*, 2009). Quando a PAM retornava aos valores basais, ISQ (4 mg/kg), losartan (1 mg/kg) ou solução salina (0,9%) foram administrados. Após um período de 5 minutos o protocolo foi repetido (Ang II 10 pmol/kg). As mudanças na PAM foram calculadas como a diferença entre os valores basais e as variações mensuradas após a administração de Ang II.

4.8.3.6 Avaliação dos efeitos da ISQ sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME

Os animais foram preparados para o registro da PAM conforme descrito anteriormente, e a veia femoral contralateral 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 com N- ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) (7 mg/kg/min) por 30 minutos. Após esse período foi administrado, pela outra veia femoral, ISQ (4 mg/kg), acetilcolina (10 nmol/kg) ou apenas solução salina (0,9%), com intervalos de 10 minutos entre cada administração. O mesmo procedimento foi repetido com outro grupo de animais, porém não foi realizada a infusão com o L-NAME. Este protocolo bem como as doses utilizadas de cada droga foi baseado em estudos anteriores (CRESTANI *et al.*, 2009).

4.8.3.7 Avaliação da participação da via NO/GMPc na hipotensão causada pela ISQ

Após a cirurgia e período de estabilização, a ISQ (4 mg/kg) foi injetada pela via intravenosa e o seu efeito hipotensor foi observado. Aguardou-se o retorno da PAM aos níveis habituais e, em seguida, ODQ (2 mg/kg) foi administrado por via endovenosa de forma lenta (aproximadamente 5 minutos). Após um período de aproximadamente cinco minutos a ISQ foi administrada novamente. Nesse protocolo comparou-se o efeito da ISQ antes e após a administração do ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel) (CRESTANI *et al.*, 2009).

4.8.3.8 Avaliação do efeito hipotensor e da atividade da ECA plasmática induzida pela ISQ em modelo de administração prolongada de L-NAME

Para este protocolo, diferentes grupos de ratos, receberam pela via oral, duas vezes ao dia, por sete dias, veículo ou uma dose de 10 mg/kg de ISQ, isoladamente, ou concomitantemente com o L-NAME (60 mg/kg). Após este período, os animais foram anestesiados e canulados, e um intervalo de 15 minutos foram aguardados. Em seguida, a PAM foi mensurada por 30 minutos. No final deste período, amostras de sangue (2 ml) foram obtidas e o soro separado por centrifugação (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C). A atividade da ECA plasmática foi determinada por fluorimetria indireta segundo técnica previamente descrita (SANTOS *et al.*, 1985).

4.8.4 Determinação de nitrato/nitrito sérico (NOx)

A fim de utilizarmos um marcador da biodisponibilidade do óxido nítrico corporal, amostras de plasma proveniente de animais SHR tratados por sete dias

com veículo, ISQ (5 e 10 mg/kg), apocinina (inibidor da NADPH oxidase; 100 mg/kg) ou captopril (60 mg/kg) foram desproteinizadas com sulfato de zinco diluído 1:1 com água Milli-Q. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras de plasma foram incubadas a 37 °C durante 2 horas em presença da nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria. Em seguida, 100 µl do sobrenadante foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q) e colocados em placas de 96 poços para leitura a 540 nm em um leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente.

4.8.5 Marcação dos ânions superóxido e análise por microscopia confocal

Muitos estudos têm demonstrado um grande aumento na formação vascular do O_2^- relacionado à HAS (CSISZAR *et al.*, 2002; CERIELLO, 2006). Este radical reage com o NO e diminui a sua biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos mediados por ele.

Portanto, para avaliar a produção de ROS nas artérias mesentéricas provenientes de animais SHR tratados por sete dias com veículo, ISQ (5 e 10 mg/kg) ou apocinina (100 mg/kg), amostras da artéria mesentérica superior, livres de tecidos conectivos, foram congeladas em um meio de montagem para tecido fresco (Tissue-Tek® O.C.T, Optimal Cutting Temperature) e conservada a -80°C. Secções transversais de 25 µm de espessura foram cortadas em micrótomo criostato a -20 °C a partir dos segmentos das artérias mesentéricas congeladas em Tissue-Tek®. As lâminas foram em seguida colocadas à temperatura ambiente em câmara úmida (por 20 min). A sonda fluorescente dihidroetidina (DHE; $2,5 \cdot 10^{-6}$ M) foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. Após estes procedimentos, as lâminas foram montadas com Vectashield® (meio de montagem anti-branqueamento) e examinadas em microscópio confocal com uma objetiva de 20X, com imersão de água. A excitação das amostras foi realizada a 488 nm com um laser de Argônio e o sinal de emissão foi registrado através de um filtro 565–610 nm. A quantificação da fluorescência foi realizada pelo programa Sharp 2000.

4.9 Forma de análise dos resultados e testes estatísticos

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6$ animais em cada grupo). Os gráficos necessários foram construídos com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t de Student para amostras não-pareadas, ou a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls, quando aplicáveis. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05.

V RESULTADOS

5.1 Análise fitoquímica

5.1.1 Espectrofotometria de absorção atômica

Os resultados das análises dos metais presentes nas folhas secas de *T. majus* obtidos por espectrofotometria de absorção atômica estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise de metais presentes nas folhas secas de *T. majus*.

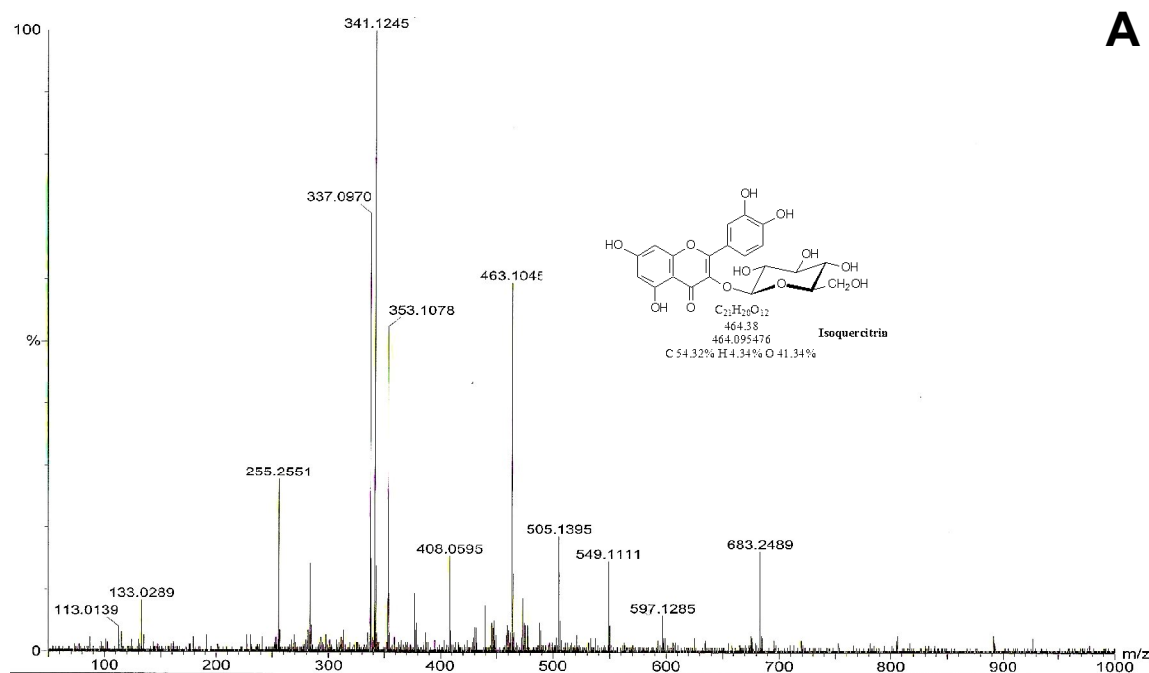
Metais	Concentração média (mg/100g)
<i>Cromo (Cr)</i>	0,76 ± 0,12
<i>Níquel (Ni)</i>	0,32 ± 0,07
<i>Chumbo (Pb)</i>	0,17 ± 0,05
<i>Ferro (Fe)</i>	6,91 ± 1,45
<i>Zinco (Zn)</i>	7,90 ± 2,11
<i>Cobre (Cu)</i>	2,09 ± 0,75
<i>Sódio (Na)</i>	4,32 ± 0,89
<i>Potássio (K)</i>	7,90 ± 1,15
<i>Cálcio (Ca)</i>	146,66 ± 11,91
<i>Magnésio (Mg)</i>	82,33 ± 5,23

Os resultados expressam a média ± desvio padrão das médias de três determinações.

O conteúdo de metais presentes nas plantas medicinais pode ser variável, e depende, entre outros fatores, da região de cultivo. O aumento expressivo nestes valores pode influenciar a reabsorção iônica de sódio e potássio nos túbulos renais, induzindo possível diurese osmótica (BENJUMEA *et al.*, 2005). Os dados apresentados neste trabalho demonstram uma quantidade de metais dentro dos padrões de qualidade estipulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para alimentos e bebidas (BRASIL, 1998) e, da mesma forma, dentro dos padrões de normalidade para a maioria das plantas medicinais utilizadas pela população (ANDRADE *et al.*, 2005).

5.1.2 Espectrometria de massas com ionização por electropray (ESI-MS)

A espectrometria de massas com ionização por electropray (ESI-MS) tem se tornado, recentemente, uma das técnicas analíticas mais poderosas para o estudo dos compostos polares, hidrofílicos ou bioativos de plantas medicinais (YAMASHITA e FENN, 1984; GASKELL, 1997; SCHINOR *et al.*, 2006). O HETM e o TMLR foram analisados pela inserção direta ESI-MS nas modalidades de íon negativo e positivo. A investigação por ESI-MS forneceu informações relevantes sobre os principais componentes polifenólicos presentes no HETM e TMLR obtidos de *T. majus*; sendo que, os mesmos, têm sido extensamente citados na literatura como dotados de importantes atividades biológicas. Os principais polifenólicos identificados para o HETM e TMLR através das impressões digitais obtidas por ESI-MS foram a isoquercitrina e o caempferol glicosilado, identificados como moléculas desprotonadas (íon molecular) de m/z 463 e 447, respectivamente (Figura 4 A e B). Estes resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura (CATHARINO *et al.*, 2006; SCHINOR *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007; ROESLER *et al.*, 2008) e confirmados pela análise de HPLC-UV, tendo suas estruturas confirmadas pela co-injeção de padrões certificados (Sigma Chemical; EUA) e identificadas pelo tempo de retenção.



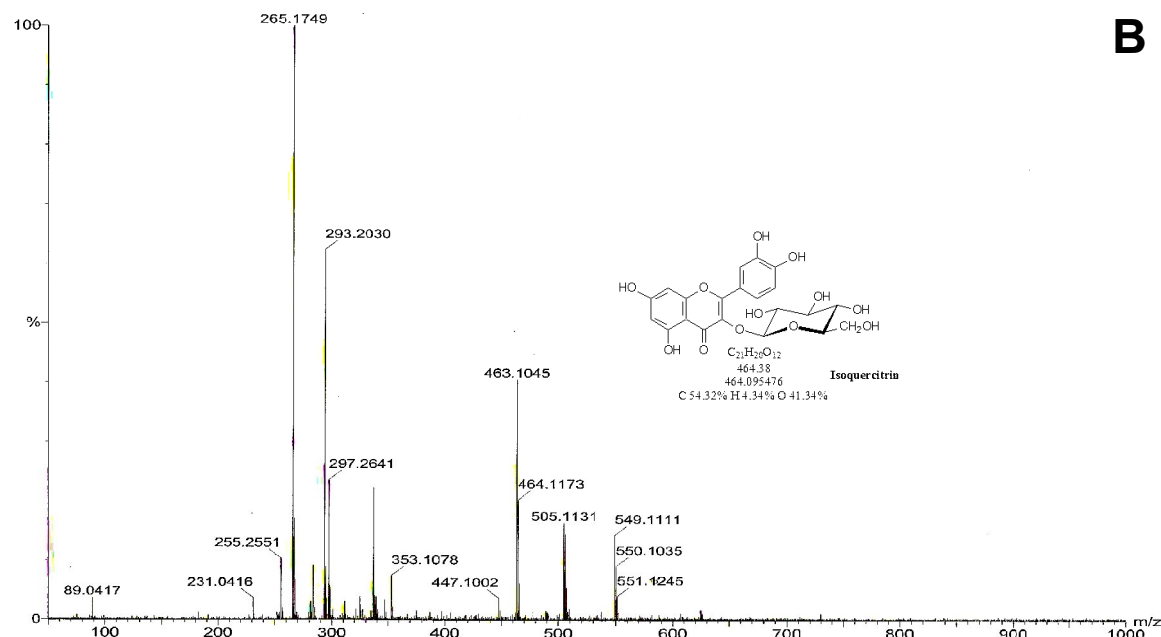


Figura 4 – Espectros de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) do extrato etanólico (A) e fração purificada livre de sacarose (B) obtidos de *T. majus*.

5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas realizados para o HETM e TMLR estão apresentados na Figura 5. A análise por CLAE revelou a presença significativa de isoquercitrina e de caempferol glicosilado nas amostras analisadas. Segundo dados quantitativos obtidos, o flavonol isoquercitrina foi o composto polifenólico majoritário encontrado tanto no HETM quanto na TMLR. O método quantitativo utilizado foi validado previamente para a isoquercitrina (LI *et al.*, 2008), e os índices (%) deste composto para o HETM e TMLR foi de 3,86 e 9,35%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Quantidade de isoquercitrina (ISQ) determinada por CLAE no HETM e na TMLR.

Amostra	Quantidade de isoquercitrina (mg/g)
<i>HETM</i>	38,64 ± 0,30
<i>TMLR</i>	93,45 ± 2,80

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média de três determinações.

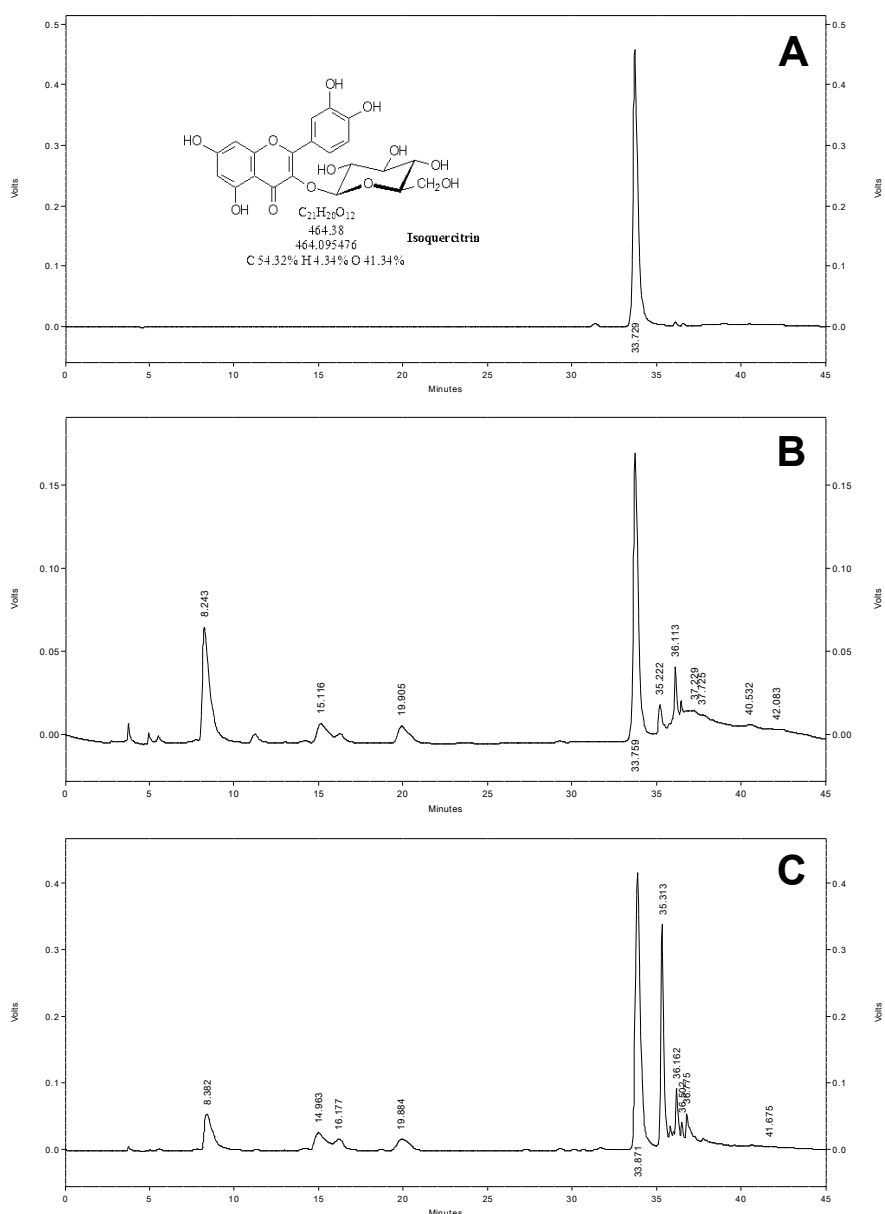


Figura 5 – Cromatogramas para a isoquercitrina (A), extrato etanólico (B) e fração purificada livre de sacarose (C) obtidos de *T. majus*.

Com base neste resultado, e considerando que um composto polifenólico fosse o responsável pela atividade biológica desta droga vegetal, conduzimos o estudo biomonitorado utilizando o referido composto como metabólito secundário de escolha em nossos ensaios farmacológicos.

5.2 Teste de atividades gerais (hipocrático) e toxicidade aguda

Antes dos protocolos, foram realizados testes de atividades gerais e toxicidade aguda com o extrato aquoso (infuso 10%) e HETM obtidos de *T. majus*. A administração de uma dose única (5 g/kg, v.o.) de ambos os extratos não provocaram nenhuma alteração comportamental nos animais tratados em

comparação aos grupos controle (água, v.o.) durante todo o período de observação (14 dias).

No tratamento com dose única de 1 g/kg por via intraperitoneal, 100% dos animais tratados com o infuso e 80% dos animais tratados com o HETM não apresentaram alterações de comportamento. Cinco minutos após o tratamento, 20% dos animais tratados com 1 g/kg e 40% dos animais que receberam 3 g/kg de HETM (i.p.) apresentaram prostração, passividade e perda da atividade exploratória, sendo que estas alterações persistiram por até 360 minutos após o início dos experimentos. Neste mesmo período, não foram observadas (com nenhum dos extratos testados) lentificação significativa ou diminuição aos estímulos dolorosos e sonoros em comparação aos animais tratados com o veículo (salina, i.p.).

Foram observadas ptose palpebral e contorções abdominais em 20 e 50%, respectivamente, dos animais tratados com o HETM (3 g/kg, i.p.); sendo que estas alterações ocorreram entre 5 a 15 minutos após a administração. Não foram observadas alterações do diâmetro pupilar, catatonía ou hiperemia significativa de extremidades (orelhas, cauda e patas) após a administração dos extratos em estudo, em comparação com os animais tratados apenas com salina.

Todos os animais (100%) tratados com os extratos obtidos de *T. majus*, apresentaram alteração na coloração da urina (laranja escuro) e micção freqüente, quando comparados com o grupo controle.

Vinte e quatro horas após os tratamentos, todos os animais apresentaram comportamento semelhante aos dos animais do grupo controle (salina, i.p.) e nenhuma morte foi observada por todo o período experimental (14 dias).

5.3 Avaliação da atividade diurética

5.3.1 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única)

5.3.1.1 Efeito diurético do infuso obtido de *T. majus*

Diferentes parâmetros foram analisados para investigar uma possível atividade diurética da infusão (2,5; 5 e 10%) obtidas das folhas secas e pulverizadas de *T. majus*. Os dados apresentados nas figuras 6, 7 e 8 são referentes ao volume de urina excretado, eletrólitos presentes na urina (sódio, potássio, cloreto e

bicarbonato), condutividade, pH e densidade. O tratamento com o infuso a 10%, correspondente a dose de 500 mg/kg da droga vegetal seca, induziu um significativo aumento na excreção de sódio urinário (controle $99,3 \pm 4,6$ mmol/l; infuso $120,0 \pm 6,8$ mmol/l; * $p < 0,05$) (Figura 6B). Todos os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos grupos controles.

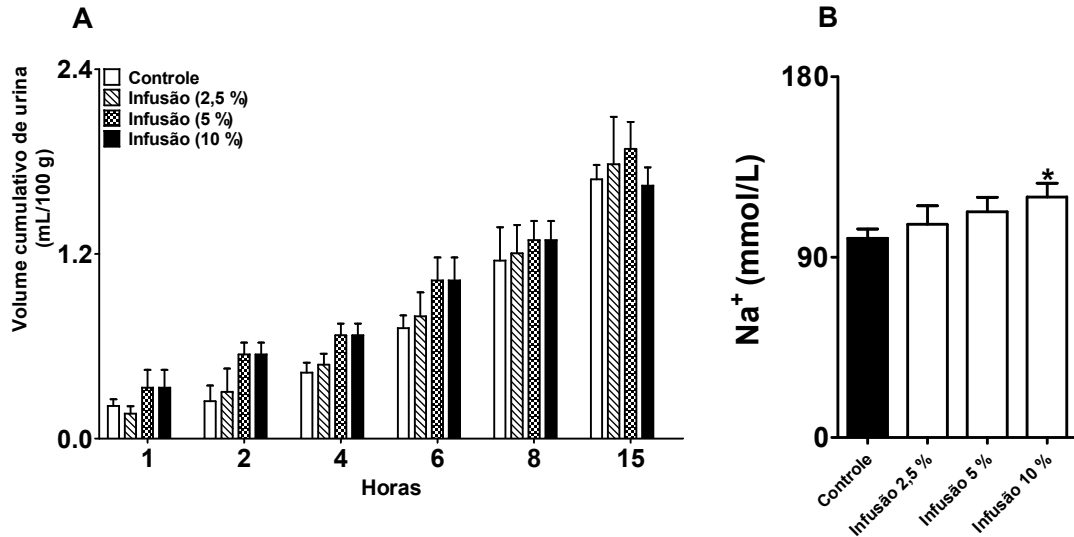


Figura 6 – Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de *T. majus* sobre a concentração de sódio (B) e volume urinário (A). Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados com diferentes doses do infuso (2,5; 5 e 10%) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada após 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas. A concentração de sódio urinário foi determinada na urina final (15 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias (A) e de uma via (B) seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$).

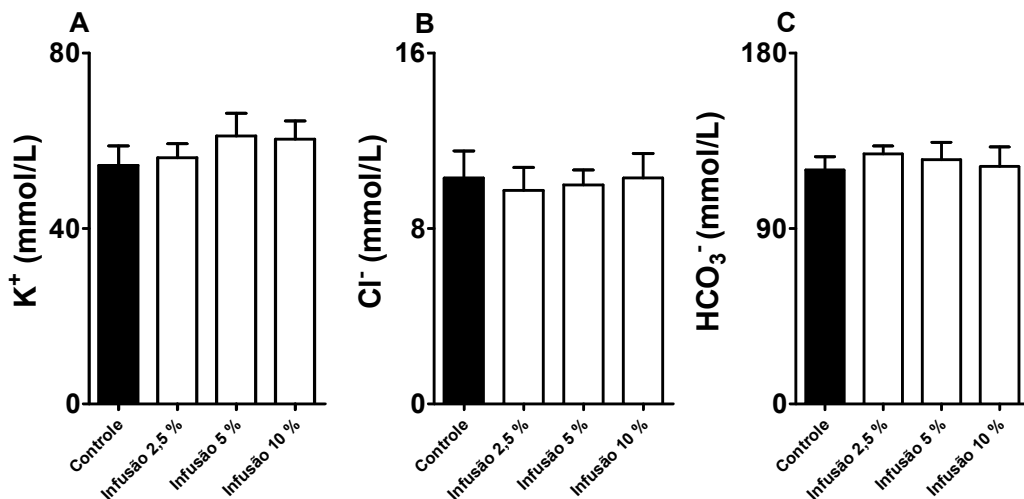


Figura 7 – Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de *T. majus* sobre a concentração urinária de potássio (A), cloreto (B) e bicarbonato (C). Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados com diferentes doses do infuso (2,5; 5 e 10%) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

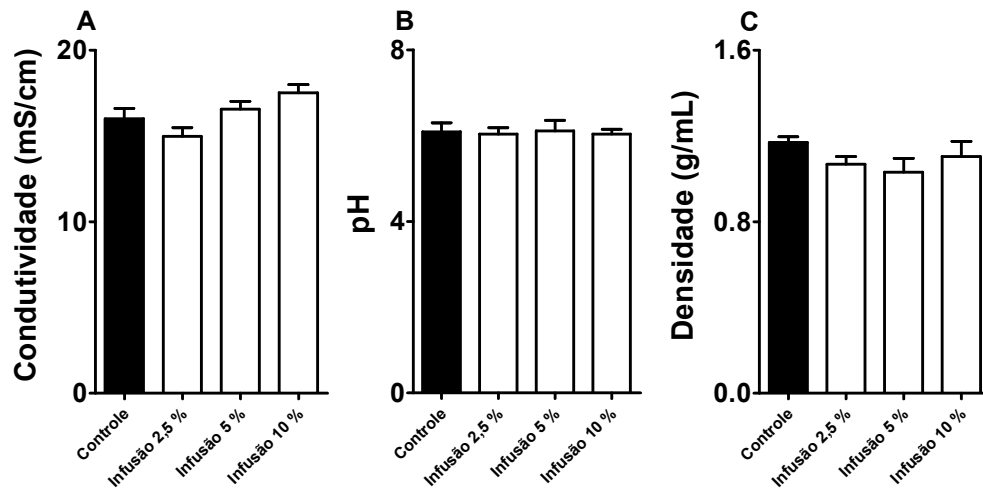


Figura 8 – Efeitos do tratamento oral com a infusão obtida de *T. majus* sobre condutividade (A), pH (B) e densidade (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses do infuso (2,5; 5 e 10%) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.3.1.2 Efeito diurético do HETM obtido de *T. majus*

Em animais normotensos, tratados com o HETM na dose de 300 mg/kg, o volume de urina excretado foi significativamente aumentado após 4 horas do início dos experimentos. O valor médio urinário excretado pelos animais controles obtidos após 4 e 15 horas do início da coleta, foi de $0,52 \pm 0,09$ e $1,22 \pm 0,12$ ml/100g (peso corporal), respectivamente. Neste sentido, o tratamento com o HETM (300 mg/kg) aumentou o volume urinário em $87 \pm 12\%$ e $64 \pm 10\%$, após 4 e 15 horas, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Figura 9A).

As análises quantitativas dos eletrólitos presentes nas amostras de urina revelaram um aumento significativo na excreção renal de sódio nos animais tratados com HETM (300 mg/kg) após 15 horas do início da coleta (controle $97,4 \pm 3,2$ mmol/l; HETM $133 \pm 8,4$ mmol/l; $**p < 0,01$) (Figura 9B). Da mesma forma, a condutividade urinária foi significativamente aumentada quando comparada aos animais controle (controle $16 \pm 0,5$ mS/cm; HETM $18 \pm 0,3$ mS/cm; $*p < 0,05$) (Figura 11A). Todos os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos tratados apenas com água deionizada (Figuras 10 e 11).

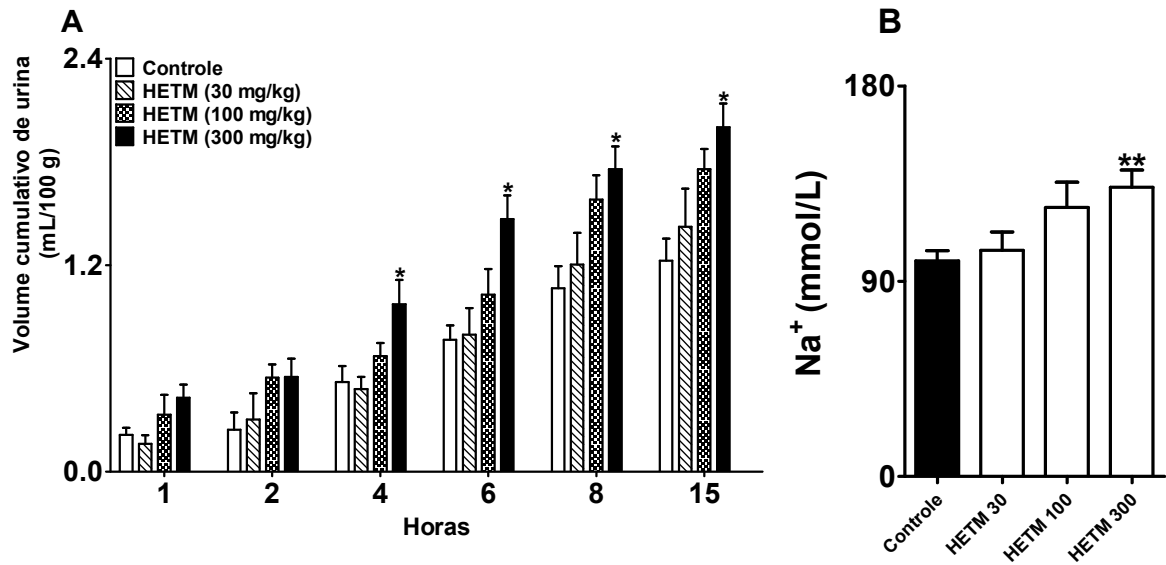


Figura 9 – Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração de sódio (B) e volume urinário (A). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas. A concentração de sódio urinário foi determinada na urina final (15 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veículo (ANOVA de duas vias (A) e de uma via (B) seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05; **p < 0,01).

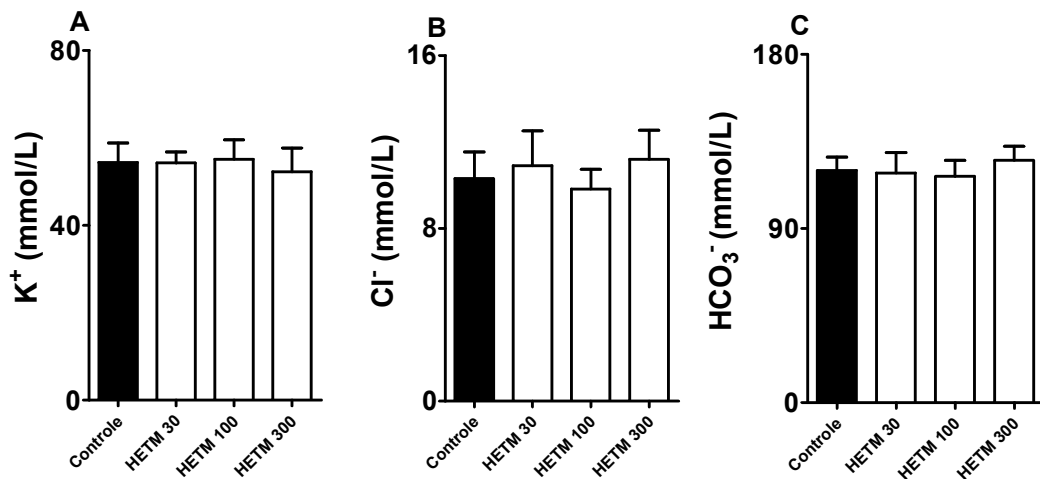


Figura 10 – Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração urinária de potássio (A), cloreto (B) e bicarbonato (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

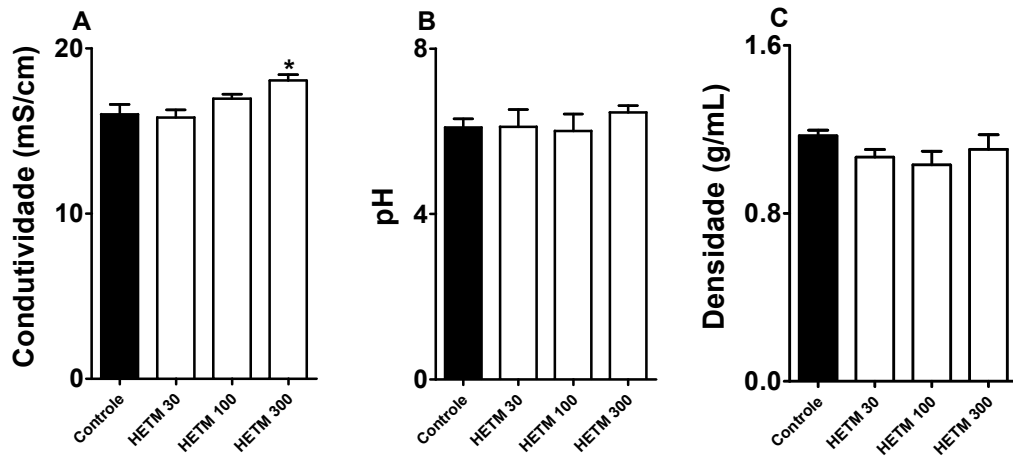


Figura 11 – Efeitos do tratamento oral com o HETM obtido de *T. majus* sobre condutividade (A), pH (B) e densidade (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg) ou veículo, sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$).

5.3.1.3 Estudo comparativo com diuréticos de referência

Com o objetivo de comparar o perfil de resposta diurética do HETM com diferentes diuréticos de uso clínico, e com a finalidade de fornecer indícios de um possível mecanismo diurético, diferentes grupos de ratos normotensos foram tratados com HETM (300 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg), furosemida (FURO; 10 mg/kg) e hidroclorotiazida (HCTZ; 10 mg/kg), sendo que parâmetros relativos ao volume de urina excretado, eletrólitos urinários, condutividade, pH e densidade foram determinados.

Os dados comparativos do volume de urina excretado estão apresentados na figura 12A. De todos os diuréticos utilizados, somente a HCTZ teve um perfil de resposta diurética diferente do HETM, com aumentos de $110 \pm 11\%$ e $42 \pm 15\%$ após 2 e 8 horas do início dos tratamento. Da mesma forma, somente a HCTZ apresentou um significativo aumento na excreção urinária de sódio quando comparado ao HETM (Figura 12B), com valor estimado em $25 \pm 8\%$ (HETM 133 ± 8 mmol/l; HCTZ 166 ± 11 mmol/l; * $p < 0,05$).

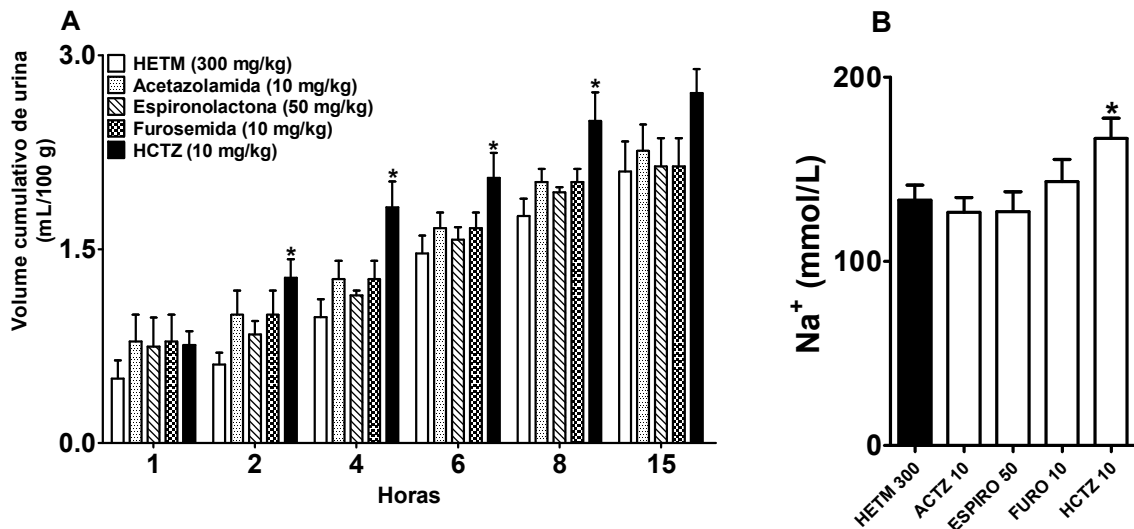


Figura 12 – Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração de sódio (B) e volume urinário (A). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com o HETM (300 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg), furosemida (FURO; 10 mg/kg) ou hidroclorotiazida (HCTZ; 10 mg/kg), sendo a urina coletada após 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas. A concentração de sódio urinário foi determinada na urina final (15 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com o HETM (ANOVA de duas vias (A) e de uma via (B) seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05).

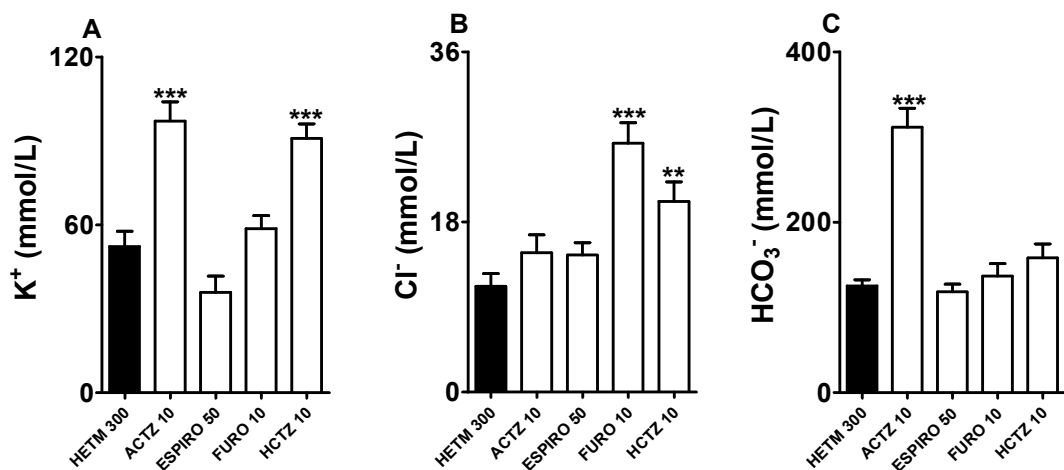


Figura 13 – Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração urinária de potássio (A), cloreto (B) e bicarbonato (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com o HETM (300 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg), furosemida (FURO; 10 mg/kg) ou hidroclorotiazida (HCTZ; 10 mg/kg), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com o HETM (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Em outro parâmetro analisado, o perfil da excreção urinária de potássio para os diuréticos HCTZ e ACTZ foi significativamente diferente do observado para o HETM, com aumentos estimados em $72 \pm 11\%$ e $88 \pm 18\%$, respectivamente (Figura

13A). Da mesma forma, para os animais tratados com a ACTZ, o pH (HETM $6,09 \pm 0,20$; ACTZ $7,82 \pm 0,31$; $**p < 0,01$) e a concentração urinária de bicarbonato (HETM $125 \pm 7,35$ mmol/l; ACTZ 311 ± 22 mmol/l; $***p < 0,001$) foram estatisticamente diferentes (Figura 14B e 13C). Estes resultados nos permitem sugerir que a ACTZ e a HCTZ apresentam um perfil de resposta diurética diferente do HETM.

Considerando a excreção urinária de cloreto, observamos que a FURO e HCTZ apresentaram uma resposta significativamente diferente da observada para o HETM, com aumentos na excreção iônica estimados em $135 \pm 17\%$ e $80 \pm 12\%$, respectivamente (Figura 13B). Nos demais parâmetros analisados (condutividade e densidade) não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em estudo. Neste sentido, o único diurético de referência que apresentou perfil de resposta similar ao HETM, em todos os parâmetros analisados, foi a espironolactona, um diurético poupador de potássio (na dose utilizada). Desta forma, nos demais experimentos executados, utilizamos a mesma como controle positivo em nossos protocolos.

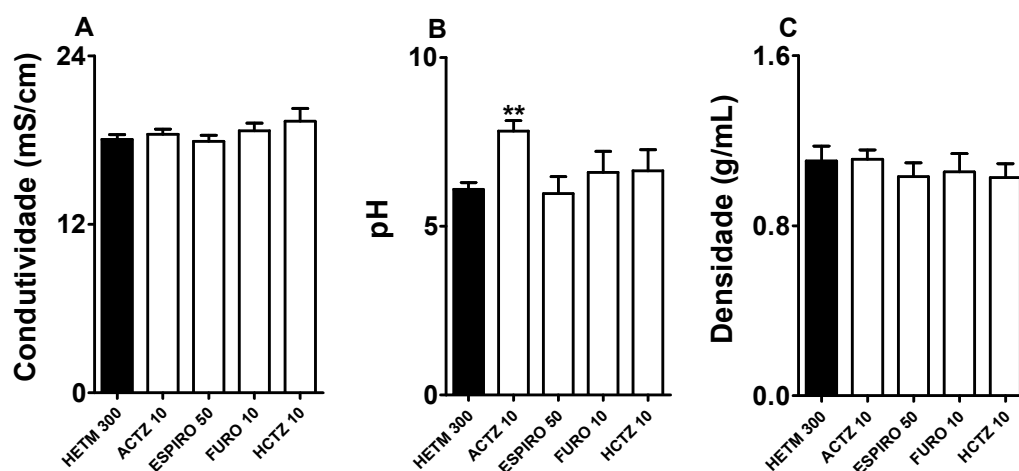


Figura 14 – Efeitos comparativos entre o tratamento oral com diuréticos de referência e o HETM obtido de *T. majus* sobre a condutividade (A), pH (B) e densidade (C). Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados com o HETM (300 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg), furosemida (FURO; 10 mg/kg) ou hidroclorotiazida (HCTZ; 10 mg/kg), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com o HETM (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) ($**p < 0,01$).

5.3.1.4 Efeito diurético da TMLR obtida de *T. majus*

A média basal do volume urinário mensurado nos animais controle (tratados com veículo) foi de $0,84 \pm 0,11$ mL/100g a $2,01 \pm 0,09$ mL/100g (4 e 15 horas respectivamente). O tratamento com dose única oral da fração purificada livre de sacarose (TMLR) obtida de *T. majus* (100 mg/kg) em animais normotensos aumentou significativamente o volume urinário após 4, 6, 8 e 15 horas (Figura 15A). A percentagem de aumento no volume urinário foi de $90 \pm 15\%$ para 4 horas e de $45 \pm 7\%$ para 15 horas após administração oral da TMLR. O diurético de referência espironolactona (ESPIRO) aumentou o volume urinário em $101 \pm 17\%$ para 4 horas e $52 \pm 9\%$ para 15 horas após a administração oral (Figura 15A). As análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas no volume urinário coletado com 1 ou 2 horas após o tratamento com a TMLR ou com a ESPIRO.

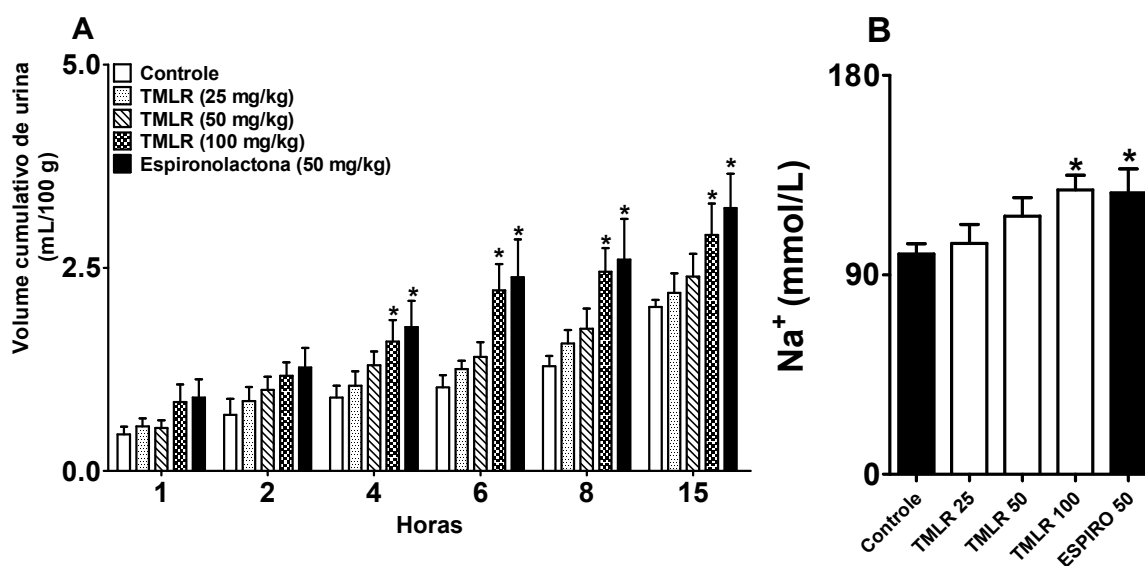


Figura 15 – Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de *T. majus* sobre a concentração de sódio (B) e volume urinário (A). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses da TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas. A concentração de sódio urinário foi determinada na urina final (15 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veículo (ANOVA de duas vias (A) e de uma via (B) seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05).

Os efeitos de uma dose da TMLR sobre a excreção renal de eletrólitos estão representados na figura 15B e 16A, B e C. A fração purificada obtida de *T. majus* aumentou a excreção renal de sódio em $32 \pm 8\%$ quando comparada com o grupo controle (controle $99,3 \pm 4,6$ mmol/l; TMLR $128,3 \pm 6,5$ mmol/l; *p < 0,05). O diurético de referência espironolactona não apresentou resultados significativamente

diferentes do obtido com o tratamento com a TMLR (TMLR $128,3 \pm 6,5$ mmol/l; ESPIRO $127,1 \pm 10,8$ mmol/l). De maneira similar ao observado com a excreção renal de sódio, a condutividade urinária foi significativamente aumentada nos animais tratados com a TMLR ou com a ESPIRO (controle $15,5 \pm 0,4$ mS/cm; TMLR $18,3 \pm 0,2$ mS/cm; ESPIRO $17,9 \pm 0,3$ mS/cm; * $p < 0,05$) quando comparados os grupos controle (Figura 17A). Por outro lado, os animais tratados com a TMLR ou com a ESPIRO não apresentaram diferenças significativas no pH e densidade urinários, tão pouco na excreção renal de potássio, cloreto ou bicarbonato.

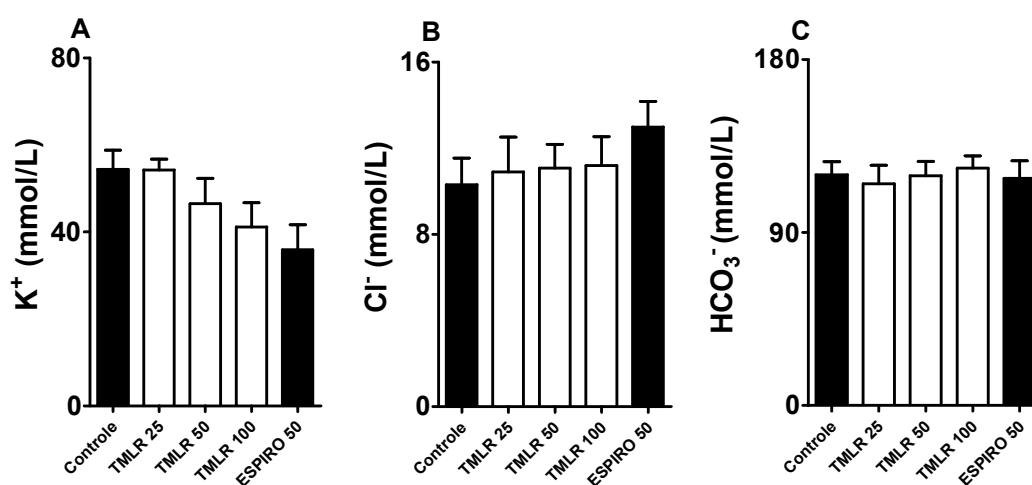


Figura 16 – Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de *T. majus* sobre a concentração urinária de potássio (A), cloreto (B) e bicarbonato (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses da TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

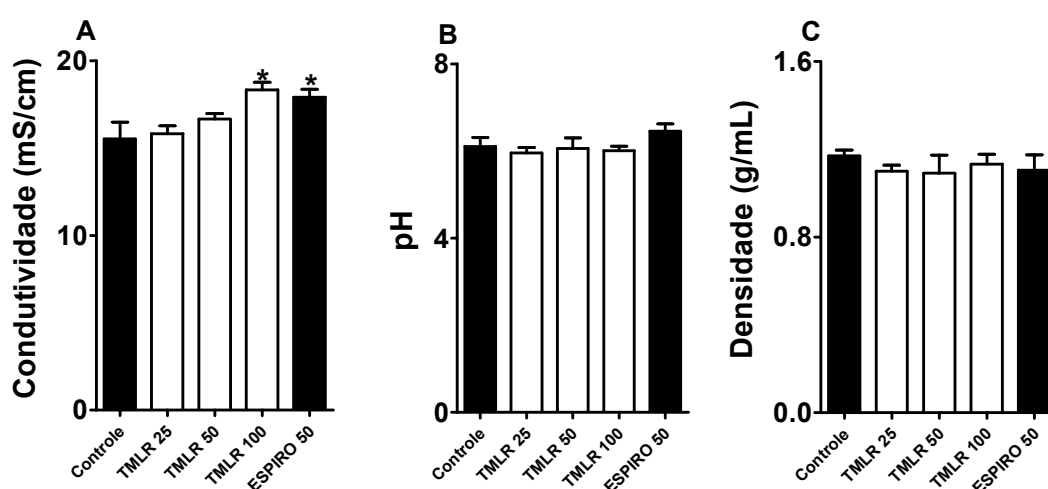


Figura 17 – Efeitos do tratamento oral com a TMLR obtida de *T. majus* sobre a condutividade (A), pH (B) e densidade (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses da TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com o veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$).

5.3.1.5 Efeito diurético da ISQ presente em *T. majus*

As médias de volume urinário coletado dos animais controle (tratados com veículo) foi de $0,75 \pm 0,12$ a $2,11 \pm 0,15$ mL/100g (4 e 15 horas respectivamente). O tratamento com uma dose oral de isoquercitrina (ISQ) (10 mg/kg) em animais normotensos aumentou significativamente o volume urinário após 4, 6, 8 e 15 horas (Figura 18A). A percentagem de aumento do volume urinário foi de $92 \pm 11\%$ para 4 horas e de $56 \pm 9\%$ para 15 horas após administração oral da ISQ. O diurético de referência espironolactona (ESPIRO) aumentou o volume urinário em $104 \pm 18\%$ para 4 horas e $54 \pm 11\%$ para 15 horas após a administração oral (Figura 18A). As análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas no volume urinário coletado com 1 ou 2 horas após o tratamento com a ISQ ou com a ESPIRO.

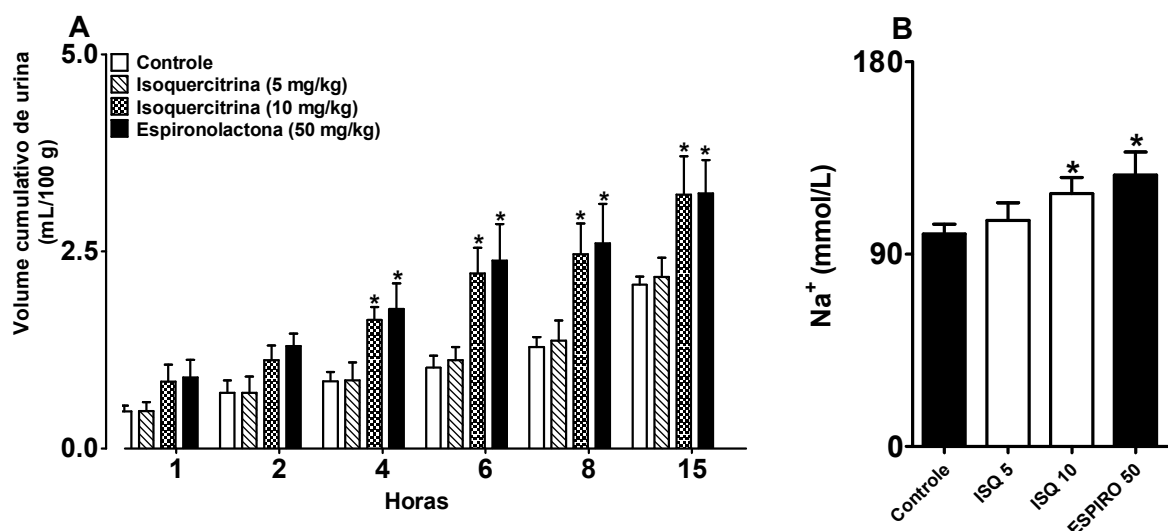


Figura 18 – Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a concentração de sódio (B) e volume urinário (A). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 1, 2, 4, 6, 8 e 15 horas. A concentração de sódio urinário foi determinada na urina final (15 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veículo (ANOVA de duas vias (A) e de uma via (B) seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05).

As análises quantitativas dos eletrólitos presentes nas amostras de urina revelaram um aumento significativo na excreção renal de sódio nos animais tratados com a ISQ (10 mg/kg) e com a ESPIRO (50 mg/kg) 15 horas após o início das coletas (controle – $99,3 \pm 4,6$ mmol/l; ISQ – $118,3 \pm 7,5$ mmol/l; ESPIRO – $127,2 \pm 10,8$ mmol/l; *p < 0,05) (Figura 18B). Da mesma forma, a condutividade urinária foi

significativamente aumentada quando comparada aos animais controle (controle $14,9 \pm 0,9$ mS/cm; ISQ $17,9 \pm 0,3$ mS/cm; ESPIRO $18,0 \pm 0,2$ mS/cm; * $p < 0,05$) (Figura 20A). Todos os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos tratados apenas com água deionizada (Figuras 19 e 20).

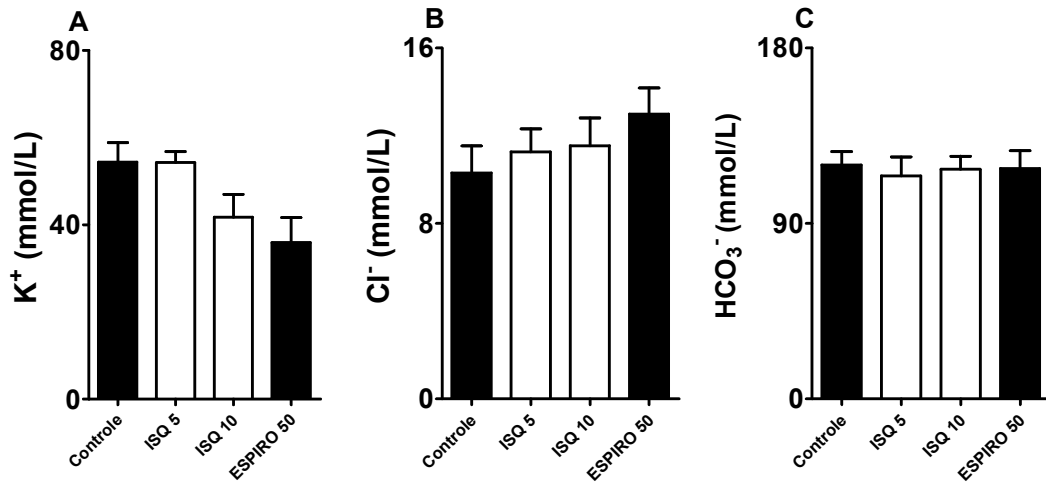


Figura 19 – Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a concentração urinária de potássio (A), cloreto (B) e bicarbonato (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

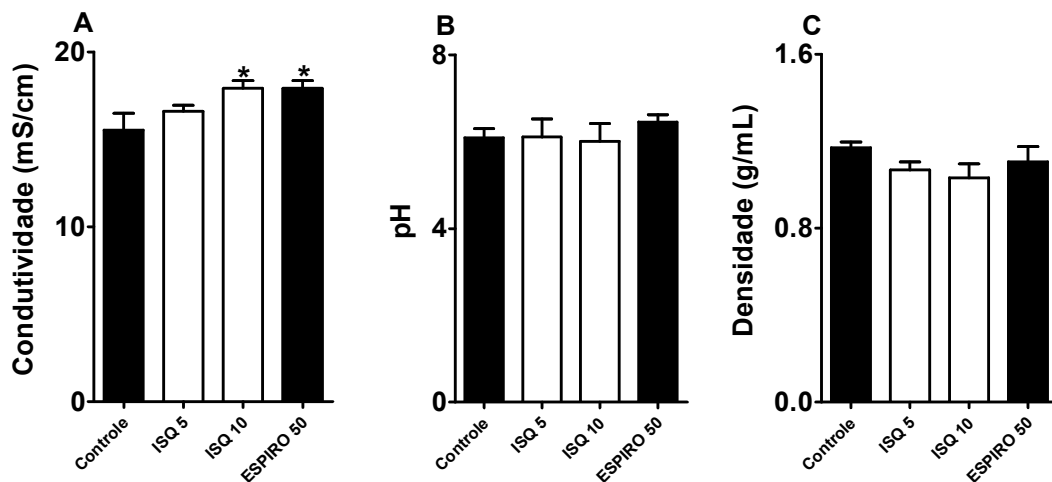


Figura 20 – Efeitos do tratamento oral com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a condutividade (A), pH (B) e densidade (C). Grupos de ratos (n=6) foram tratados com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), sendo a urina coletada após 15 horas. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com o veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$).

5.3.2 Avaliação da atividade diurética prolongada (doses repetidas)

5.3.2.1 Efeito diurético do HETM obtido de *T. majus*

A administração diária do extrato etanólico obtido de *T. majus* (HETM; 300 mg/kg) em animais normotensos produziu significativa diurese a partir do 3º dia de tratamento. A percentagem de aumento do volume urinário foi de $48 \pm 9\%$ após o terceiro e de $53 \pm 11\%$ após o sétimo dia de experimento (Figura 21). O efeito diurético observado nos animais que receberam espironolactona (50 mg/kg) foi semelhante ao obtido com o HETM (Figura 21).

O efeito da administração prolongada do HETM (300 mg/kg) sobre a excreção renal de sódio está apresentada na Figura 22. O extrato vegetal induziu significativa excreção de sódio do 1º ($32 \pm 8\%$) ao 7º dia de tratamento ($38 \pm 10\%$) quando comparado com o grupo controle (dia 1 – controle $106,4 \pm 5,0$ mmol/l; HETM $131,4 \pm 6,11$ mmol/l; * $p < 0,05$. dia 7 – controle $116,2 \pm 8,0$ mmol/l; HETM $164,4 \pm 9,8$ mmol/l; * $p < 0,05$). A atividade natriurética obtida com o diurético de referência espironolactona não foi estatisticamente diferente da observada com o extrato testado (Figura 22). As médias dos níveis de creatinina, uréia, sódio e potássio plasmáticos, mensurados no último dia de tratamento, não foram afetadas por nenhuma das drogas testadas (Figura 23).

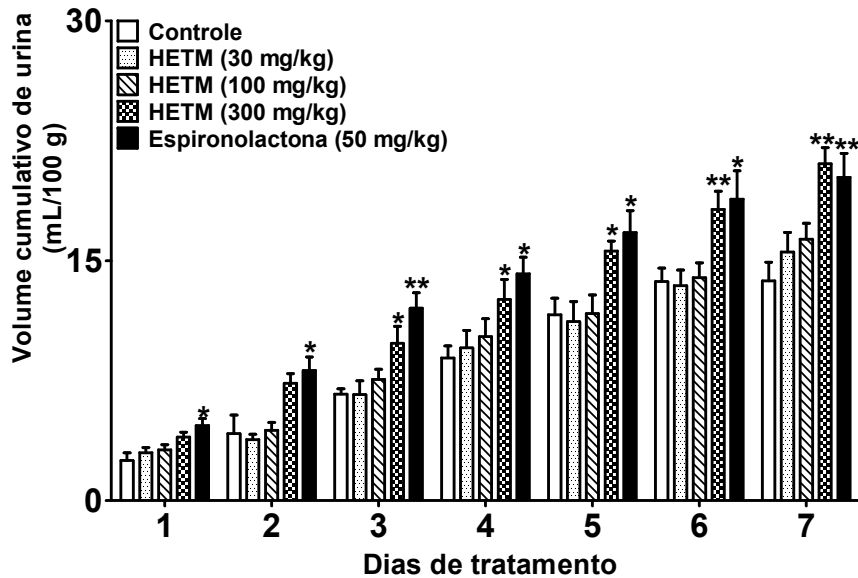


Figura 21 – Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de *T. majus* sobre o volume urinário. Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados, diariamente, com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas, e seu volume determinado. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

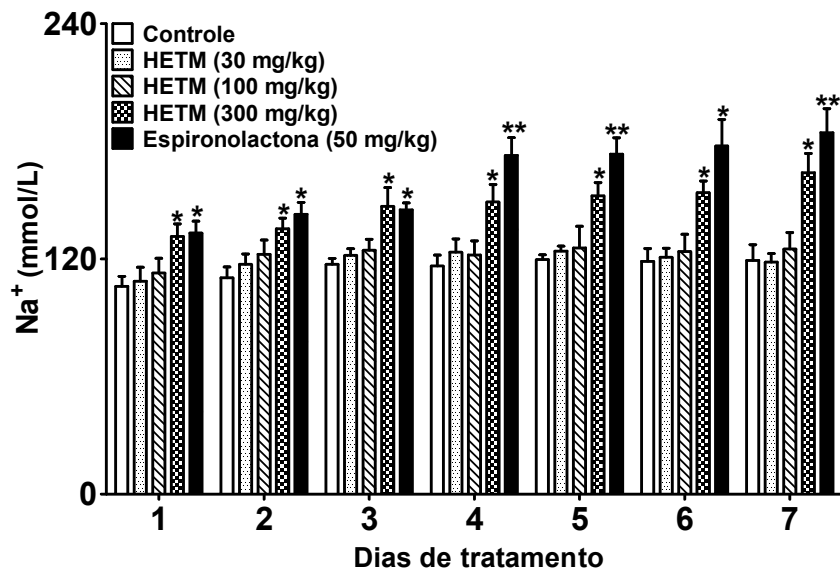


Figura 22 – Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração urinária de sódio. Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados, diariamente, com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas. A concentração urinária de sódio foi determinada, diariamente, em cada amostra de urina. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

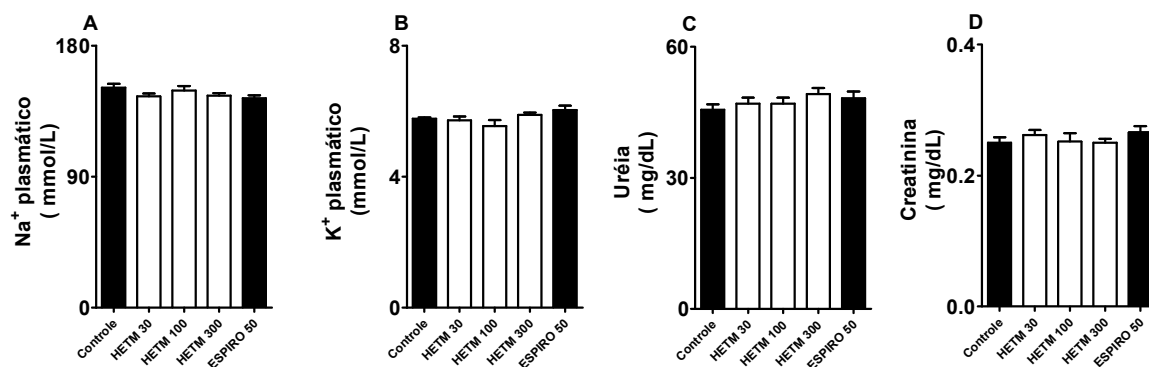


Figura 23 – Efeitos do tratamento prolongado com o HETM obtido de *T. majus* sobre a concentração plasmática de sódio (A), potássio (B), uréia (C) e creatinina (D). Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com diferentes doses do HETM (30, 100 e 300 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veículo (controle). Os parâmetros analisados foram determinados no final do sétimo dia de tratamento. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.3.2.2 Efeito diurético da TMLR obtida de *T. majus*

Em animais normotensos, tratados por sete dias com a TMLR na dose de 100 mg/kg, o volume de urina excretado foi significativamente diferente ao dos animais tratados com o veículo no 1º, 2º, 5º, 6º e 7º dias (Figura 24). A percentagem de aumento do volume urinário foi de $58 \pm 7\%$ no primeiro, e de $31 \pm 7\%$ após o sétimo dia de tratamento. O efeito diurético da espironolactona (50 mg/kg) não foi estatisticamente diferente do produzido pela TMLR (Figura 24).

Os efeitos da administração prolongada da fração purificada livre de sacarose obtida de *T. majus* (TMLR; 100 mg/kg) sobre a excreção renal de sódio está apresentada na Figura 25. Apenas no segundo dia de tratamento, as análises estatísticas não evidenciaram diferença significativa na excreção renal de sódio entre os grupos tratados com o veículo ou com a TMLR. A fração purificada testada induziu a uma significativa excreção de sódio do 1º ($25 \pm 4\%$) ao 7º dia de tratamento ($38 \pm 7\%$) (dia 1 – controle $102,2 \pm 3,7$ mmol/l; TMLR $127,0 \pm 6,0$ mmol/l; * $p < 0,05$. dia 7 – controle $113,4 \pm 6,1$ mmol/l; TMLR $155,8 \pm 12,2$ mmol/l; *** $p < 0,001$). A atividade natriurética obtida com o diurético de referência espironolactona não foi estatisticamente diferente da observada com a TMLR (Figura 25). Da mesma forma que os dados obtidos com o HETM, os níveis séricos de creatinina, uréia, sódio e potássio, mensurados no último dia de tratamento, não foram afetados por nenhum dos tratamentos (Figura 26).

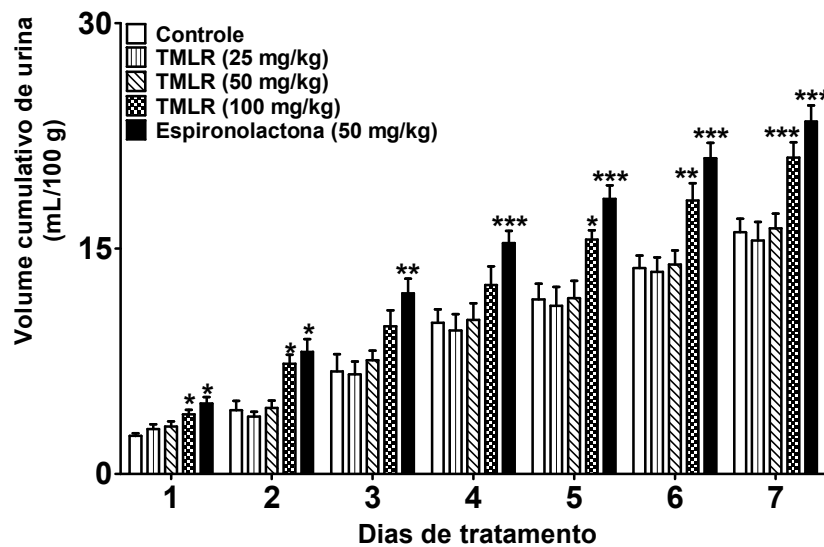


Figura 24 – Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de *T. majus* sobre o volume urinário. Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados, diariamente, com diferentes doses da TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas, e seu volume determinado. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

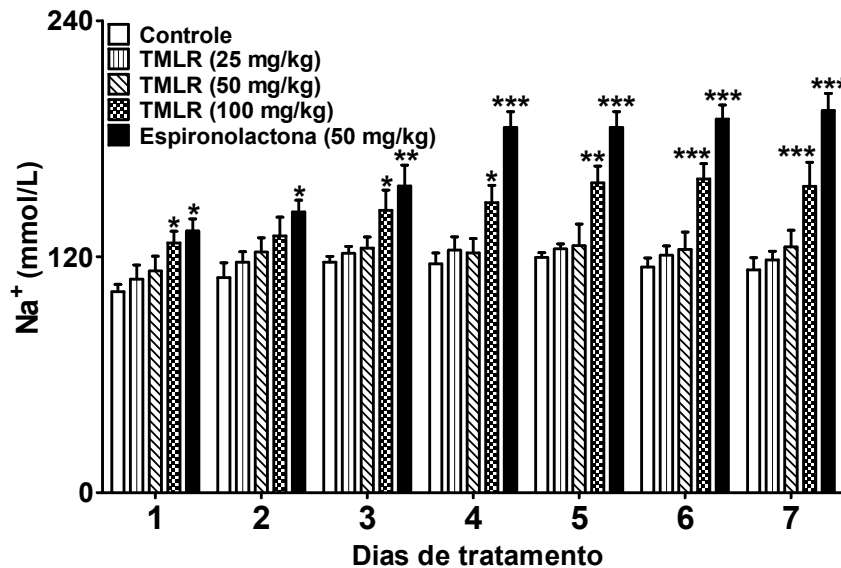


Figura 25 – Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de *T. majus* sobre a concentração urinária de sódio. Grupos de ratos ($n=6$) foram tratados, diariamente, com diferentes doses da TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas. A concentração urinária de sódio foi determinada, diariamente, em cada amostra de urina. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

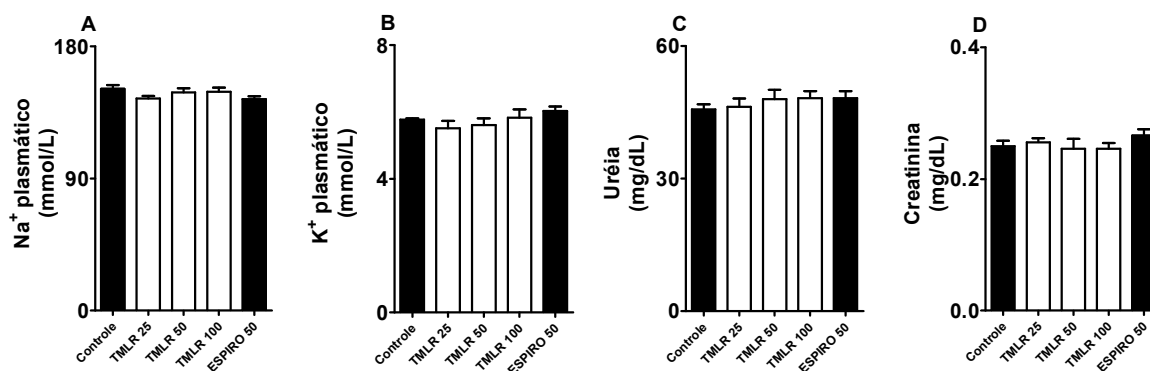


Figura 26 – Efeitos do tratamento prolongado com a TMLR obtida de *T. majus* sobre a concentração plasmática de sódio (A), potássio (B), uréia (C) e creatinina (D). Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com diferentes doses do TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle). Os parâmetros analisados foram determinados no final do sétimo dia de tratamento. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.3.2.3 Efeito diurético da ISQ presente em *T. majus*

Vários estudos relatam que compostos polifenólicos, principalmente os flavonóides, podem apresentar atividade diurética (MAGHRANI *et al.*, 2005). Neste sentido, tendo como base os resultados obtidos na diurese aguda, grupos de ratos normotensos foram tratados diariamente (sete dias) com diferentes doses de isoquercitrina (ISQ; 5 e 10 mg/kg). O volume de urina excretado nos animais tratados com a ISQ (10 mg/kg) foi significativamente diferente ao dos animais controle no 1º, 4º, 5º, 6º e 7º dias (Figura 27). A percentagem de aumento no volume urinário foi de $97 \pm 8\%$ no primeiro, e de $28 \pm 7\%$ após o sétimo dia de tratamento. O efeito diurético da espironolactona (50 mg/kg) não foi estatisticamente diferente do produzido pela ISQ (Figura 27).

A resposta natriurética da ISQ (10 mg/kg) está apresentada na Figura 28. No segundo e terceiro dias de tratamento, as análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas na excreção renal de sódio entre os grupos tratados com o veículo ou com o flavonóide majoritário identificado em *T. majus*. Por outro lado, a ISQ induziu a uma significativa excreção renal de sódio no 1º ($28 \pm 3\%$), 4º, 5º, 6º e 7º ($33 \pm 9\%$) dias de tratamento (dia 1 – controle $99,6 \pm 3,0$ mmol/l; ISQ $128,2 \pm 5,6$ mmol/l; * $p < 0,05$. dia 7 – controle $116,6 \pm 4,2$ mmol; ISQ $150,4 \pm 10,0$ mmol/l; ** $p < 0,01$). A excreção renal de sódio obtida com a espironolactona não foi estatisticamente diferente da observada com a ISQ (Figura 28). Os níveis plasmáticos de creatinina, uréia, sódio e potássio, mensurados no final dos

experimentos, não foram afetados por nenhum dos tratamentos realizados (Figura 29).

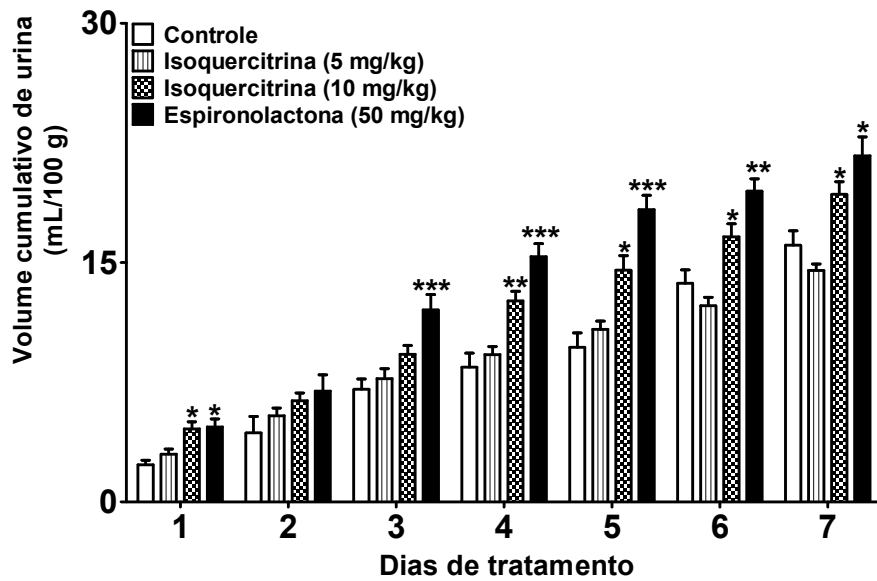


Figura 27 – Efeitos do tratamento prolongado com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre o volume urinário. Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas, e seu volume determinado. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

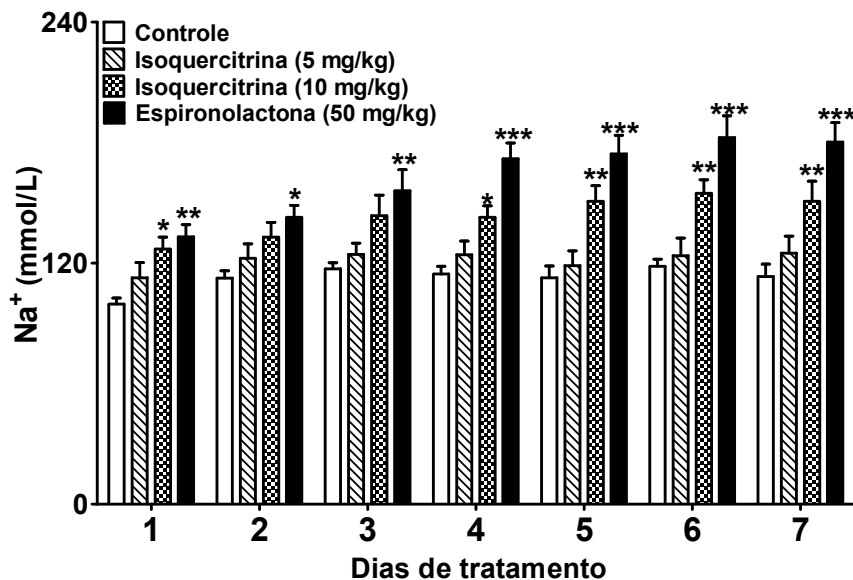


Figura 28 – Efeitos do tratamento prolongado com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a concentração urinária de sódio. Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo a urina coletada a cada 24 horas. A concentração urinária de sódio foi determinada, diariamente, em cada amostra de urina. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

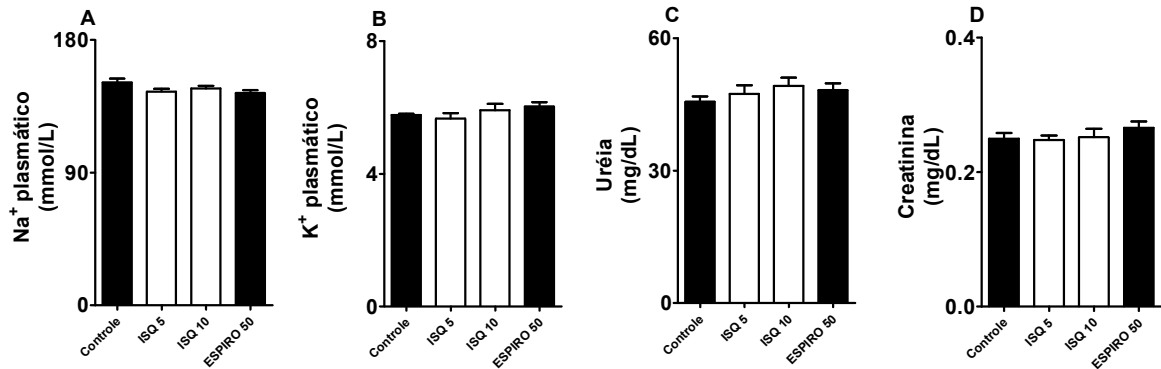


Figura 29 – Efeitos do tratamento prolongado com a isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a concentração plasmática de sódio (A), potássio (B), uréia (C) e creatinina (D). Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com diferentes doses do ISQ (5 e 10 mg/kg), espironolactona (50 mg/kg) ou veiculo (controle). Os parâmetros analisados foram determinados no final do sétimo dia de tratamento. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.3.2.4 Determinação sérica de aldosterona e vasopressina

Os resultados obtidos com a determinação sérica de aldosterona e vasopressina, após o tratamento prolongado (sete dias) com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) estão representados na figura 30. Os dados plotados mostram uma redução de $14 \pm 3\%$ na concentração plasmática de aldosterona, para os animais normotensos tratados com 100 mg/kg de TMLR e de $12 \pm 2\%$ para os que receberam ISQ (10 mg/kg) (Figura 30A). Por outro lado, nenhum dos grupos tratados com o HETM, TMLR ou com a ISQ apresentaram diferenças significativas na determinação da vasopressina sérica (Figura 30B).

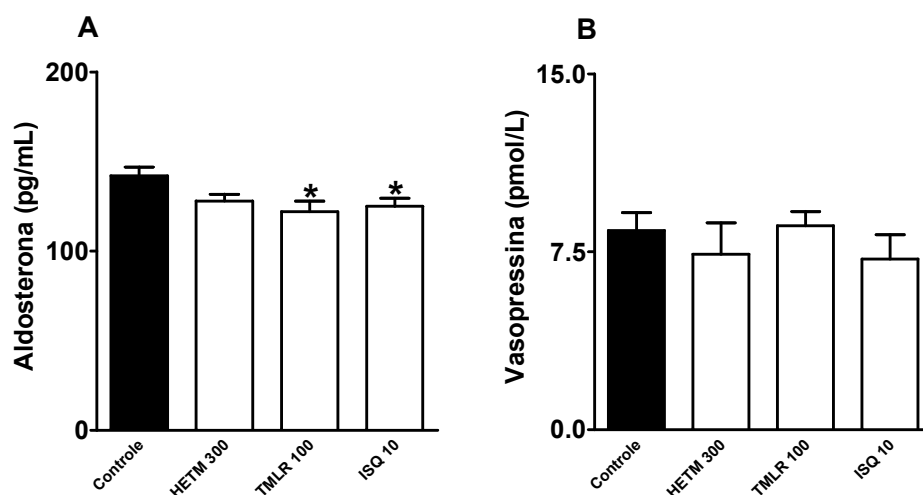


Figura 30 – Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a concentração plasmática de aldosterona (A) e vasopressina (B). Grupos de ratos (n=6) foram tratados, diariamente, com HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg) ou veiculo (controle). Os parâmetros analisados foram determinados no final do sétimo dia de tratamento. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05).

5.3.3 Avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade diurética

5.3.3.1 Avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)

5.3.3.1.1 Tratamento agudo (dose única)

Os resultados já apresentados mostram que o HETM, a TMLR e a isoquercitrina podem acarretar expressiva atividade diurética e natriurética, e que estes efeitos estão acompanhados de uma significativa redução da aldosterona plasmática. A partir destas evidências, foi investigado se esta atividade poderia ser decorrente da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), com consequente redução na formação de angiotensina II e na liberação de aldosterona. Desta forma, avaliamos a possível atividade inibidora sobre a ECA plasmática (*ex vivo*) utilizando técnica de fluorimetria indireta. Os resultados obtidos mostraram uma redução na atividade da ECA plasmática após tratamento agudo com o HETM, nas doses de 100 e 300 mg/kg, com valores estimados em $17 \pm 5\%$ e $28 \pm 6\%$. Da mesma forma, a TMLR nas doses de 50 e 100 mg/kg e a ISQ nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziram a atividade da ECA plasmática em $15 \pm 3\%$, $30 \pm 5\%$, $19 \pm 3\%$ e 39

$\pm 6\%$, respectivamente. O inibidor da ECA de referência, captopril (60 mg/kg), reduziu a atividade desta protease em aproximadamente 60% (Figura 31A, B e C)

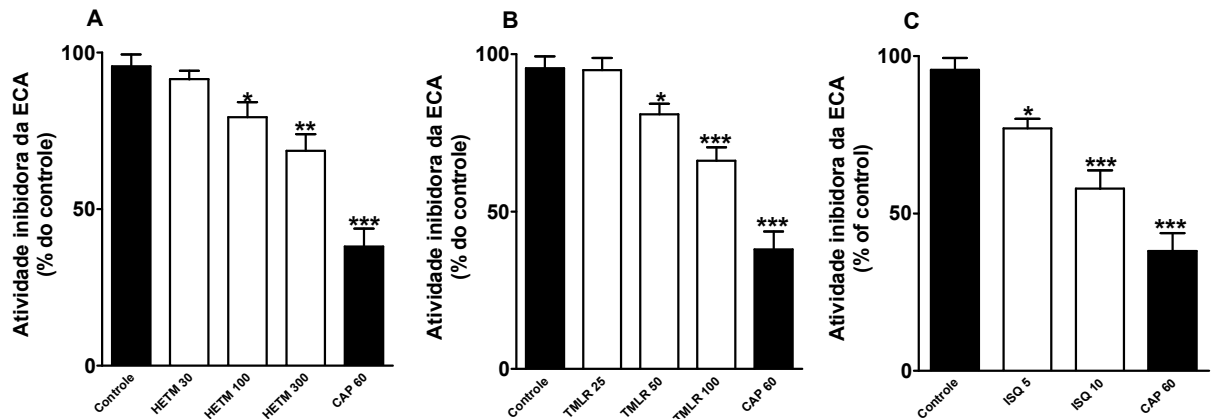


Figura 31 – Efeitos dos tratamentos agudos com o HETM (A), TMLR (B) e isoquercitrina (ISQ) (C) sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados com diferentes doses de HETM (30, 100 e 300 mg/kg), TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), ISQ (5 e 10 mg/kg), captopril (60 mg/kg) ou veiculo (controle), sendo o soro coletado após 1.5 horas. A atividade da ECA plasmática foi determinada por fluorimetria indireta. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veiculo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.3.1.2 Tratamento prolongado (doses repetidas)

Da mesma maneira que no protocolo anterior, avaliamos os efeitos do tratamento prolongado (sete dias) com o HETM, TMLR e ISQ sobre a atividade da ECA plasmática. Os dados apresentados mostram uma significativa redução na atividade da ECA plasmática após o tratamento com HETM, na dose de 300 mg/kg, com valor de redução estimado em $36 \pm 7\%$. Por outro lado, a TMLR nas doses de 50 e 100 mg/kg e a ISQ nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziram a atividade da ECA plasmática em $16 \pm 3\%$, $38 \pm 6\%$, $20 \pm 4\%$ e $43 \pm 8\%$, respectivamente. Da maneira esperada, o controle positivo captopril (60 mg/kg) reduziu a atividade da ECA plasmática em aproximadamente 65% (Figura 32A, B e C)

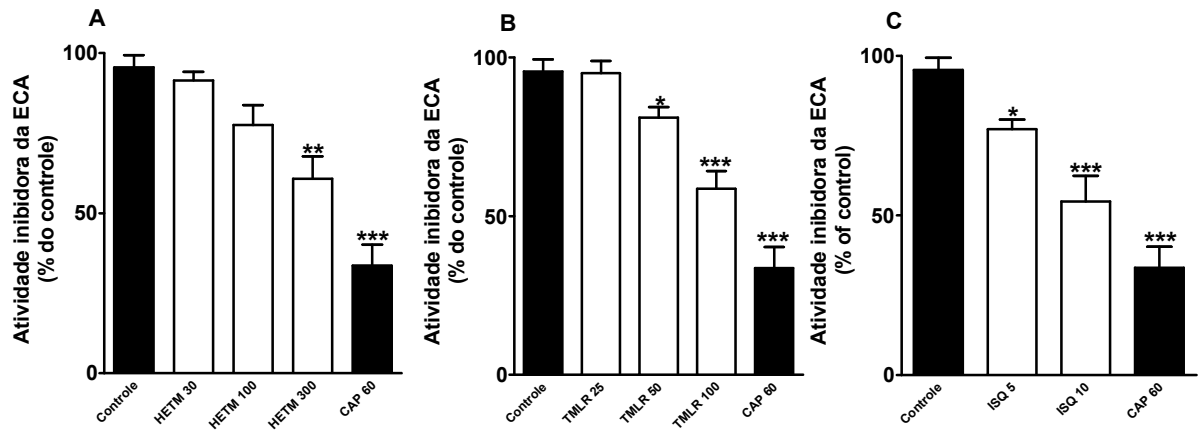


Figura 32 – Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM (A), TMLR (B) e isoquercitrina (ISQ) (C) sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados, diariamente, com diferentes doses de HETM (30, 100 e 300 mg/kg), TMLR (25, 50 e 100 mg/kg), ISQ (5 e 10 mg/kg), captopril (60 mg/kg) ou veículo (controle), sendo o soro coletado após 7 dias. A atividade da ECA plasmática foi determinada por fluorimetria indireta. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.3.2 Estudo do envolvimento da bradicinina na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Considerando que existem relatos de que os inibidores da ECA comercialmente disponíveis exercem suas atividades diuréticas através de um aumento do fluxo sanguíneo renal acarretado pela maior biodisponibilidade da bradicinina, e da conseqüente liberação de prostaglandinas e óxido nítrico endotelial (SAKAMOTO *et al.*, 1994), objetivamos verificar se a atividade diurética obtida com o HETM, TMLR ou com a ISQ poderia ter sua eficácia reduzida após a administração (15 minutos antes do início dos experimentos) de um antagonista dos receptores da bradicinina (HOE-140 1,5 mg/kg, i.p.). Os resultados obtidos mostraram que o pré-tratamento com HOE-140 reduziu em $49 \pm 5\%$ o volume de urina excretado pelos animais que receberam o HETM, e em $33 \pm 2\%$ e $34 \pm 4\%$ para os grupos tratados com a TMLR e ISQ, respectivamente (Figura 33A e B). Da mesma forma, a excreção urinária de sódio foi reduzida em $17 \pm 4\%$ para os animais que receberam o HETM, e em $26 \pm 7\%$ e $16 \pm 3\%$ para os grupos tratados com a TMLR e ISQ, respectivamente (Figura 33C e D). O diurético de referência espironolactona não apresentou alterações significativas em seu perfil de resposta após o tratamento com o antagonista dos receptores da bradicinina (Figura 33A e C).

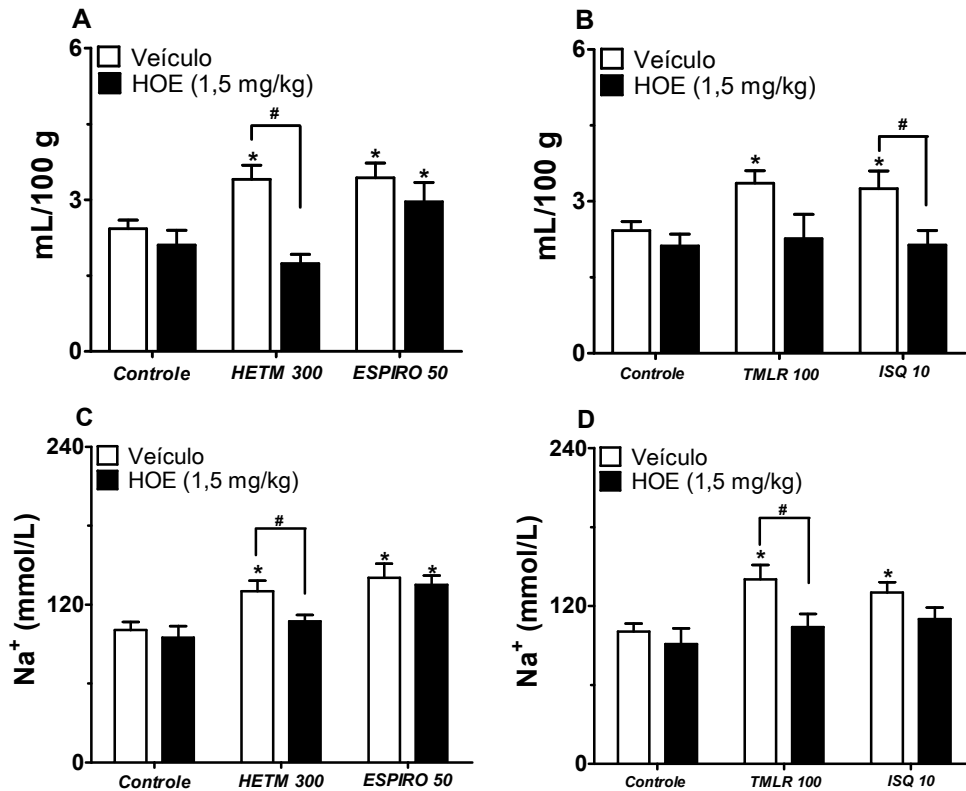


Figura 33 – Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus*, na ausência e presença de HOE-140 sobre o volume urinário (A e B) e concentração de sódio (C e D). Grupos de ratos (n=6) normotensos foram tratados com HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veiculo (controle), isoladamente ou associado com HOE-140 (1,5 mg/kg; i.p.), sendo a urina coletada após 8 horas. O sódio urinário foi determinado na urina final (8 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância dos grupos que receberam veiculo ou HOE-140 em comparação com os respectivos grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls). # denota os níveis de significância em comparação com os grupos que receberam HOE-140 (Student's t-test) (# ou *p < 0,05).

5.3.3.3 Estudo do envolvimento das prostaglandinas na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Como as prostaglandinas renais exercem um relevante efeito na manutenção do fluxo sanguíneo renal (DE MARIA e WEIR, 2003); e devido à bradicinina estar envolvida na liberação de PGI₂ nas arteríolas renais (SAKAMOTO *et al.*, 1994), foi investigado se a atividade diurética obtida com o HETM, TMLR ou com a ISQ poderia ter sua eficácia reduzida com a administração prévia de um inibidor da síntese de prostanóides (indometacina). Os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento (uma hora antes do início dos experimentos) com a indometacina (5 mg/kg, v.o.) reduz em $48 \pm 7\%$ o volume de urina excretado pelo animais que receberam o HETM, e em $38 \pm 9\%$ e $34 \pm 8\%$ para os grupos tratados com a TMLR

e ISQ, respectivamente (Figura 34A e B). Da mesma forma, a excreção urinária de sódio foi reduzida em $26 \pm 4\%$ para o grupo tratado com o HETM, e em $28 \pm 6\%$ e $23 \pm 4\%$ para os animais que receberam TMLR e ISQ, respectivamente (Figura 34C e D). O diurético de referência espironolactona não apresentou mudanças significativas em seu perfil de resposta após o tratamento com a indometacina (Figura 34A e C).

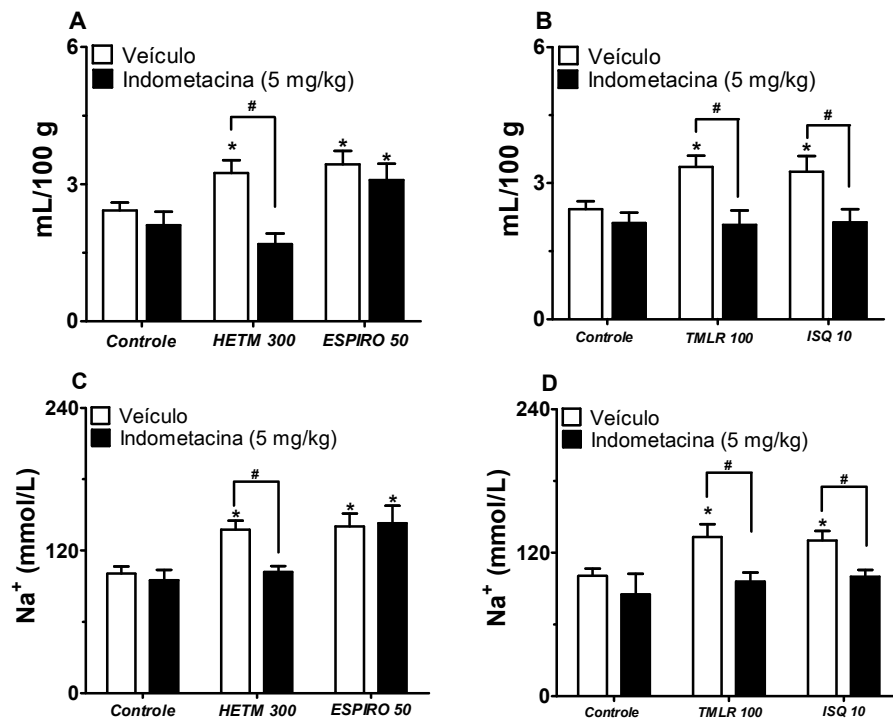


Figura 34 – Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus*, na ausência e presença de indometacina sobre o volume urinário (A e B) e concentração de sódio (C e D). Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados com HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veículo (controle), isoladamente ou associado com indometacina (5 mg/kg; v.o.), sendo a urina coletada após 8 horas. O sódio urinário foi determinado na urina final (8 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância dos grupos que receberam veículo ou indometacina em comparação com os respectivos grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls). # denota os níveis de significância em comparação com os grupos que receberam indometacina (Student's t-test) (# ou * $p < 0,05$).

5.3.3.4 Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade diurética aguda induzida pelo HETM, TMLR e ISQ

Como a bradicinina exerce seus efeitos vasodilatadores, parcialmente, através da liberação do óxido nítrico endotelial, e que esta atividade pode aumentar o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (SAKAMOTO *et al.*, 1994),

foi verificado se a atividade diurética obtida com o HETM, TMLR ou com a ISQ poderia ter sua eficácia reduzida com a administração prévia de um inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME). Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento (uma hora antes do início dos experimentos) com o L-NAME (60 mg/kg; v.o.) reduziu em $30 \pm 9\%$ o volume de urina excretado pelo animais que receberam o HETM, e em $35 \pm 13\%$ e $33 \pm 11\%$ para os grupos que receberam a TMLR e ISQ, respectivamente (Figura 35A e B). Da mesma forma, a excreção urinária de sódio foi reduzida em $23 \pm 9\%$ para o HETM, e em $20 \pm 11\%$ e $24 \pm 8\%$ para a TMLR e ISQ, respectivamente (Figura 35C e D). O diurético de referência espironolactona não apresentou alterações significativas em seu perfil de resposta após o tratamento com o L-NAME (Figuras 35A e C).

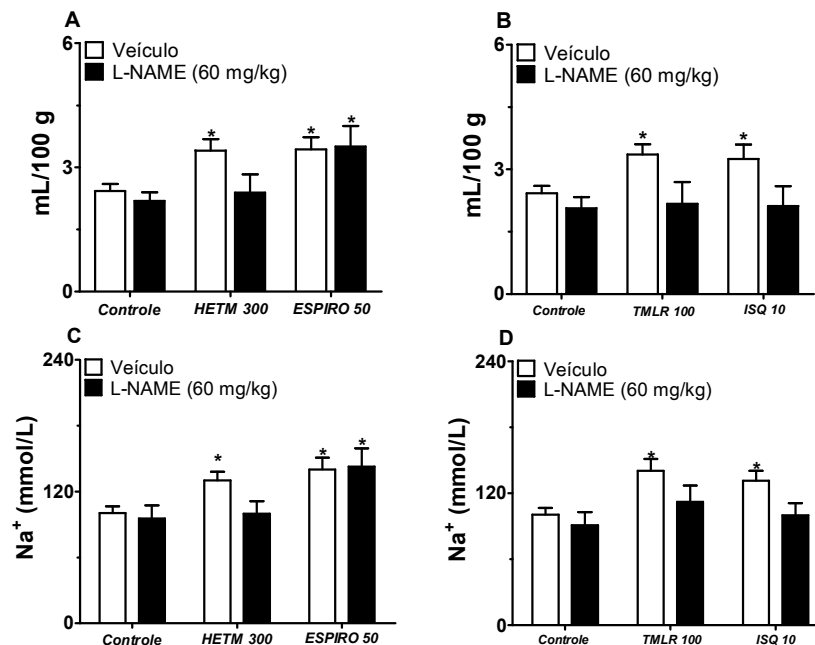


Figura 35 – Efeitos dos tratamentos com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus*, na ausência e presença de L-NAME sobre o volume urinário (A e B) e concentração de sódio (C e D). Grupos de ratos (n=6) normotensos foram tratados com HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg), espironolactona (ESPIRO; 50 mg/kg) ou veiculo (controle), isoladamente ou associado com L-NAME (60 mg/kg; v.o.), sendo a urina coletada após 8 horas. O sódio urinário foi determinado na urina final (8 h). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asterisco denota os níveis de significância dos grupos que receberam veiculo ou L-NAME em comparação com os respectivos grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05).

5.3.3.5 Efeito do HETM, TMLR e ISQ sobre a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal de ratos normotensos

Como grande parte dos diuréticos, principalmente aqueles que atuam diretamente (antagonistas de receptores) e/ou indiretamente (inibidores da ECA) sobre a aldosterona sérica podem reduzir a atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal (JACKSON, 1996), objetivamos verificar através de ensaios *in vitro*, se o HETM, a TMLR ou a isoquercitrina (ISQ) poderiam exercer alguma atividade diretamente sobre esta proteína. Os resultados obtidos mostram que tanto o HETM, como a TMLR ou a ISQ, na concentração de 30 μM reduzem a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal em $12 \pm 2\%$, $14 \pm 4\%$ e $25 \pm 4\%$, respectivamente (Figura 36A e B).

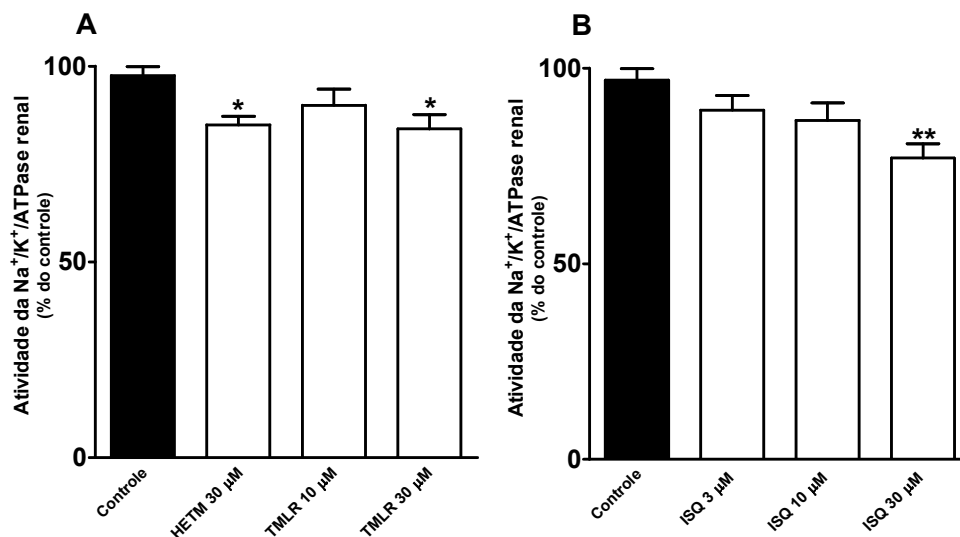


Figura 36 – Efeitos do HETM, TMLR (A) e isoquercitrina (ISQ) (B) presente em *T. majus* sobre a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal. Preparações membranares de rim de ratos ($n=6$) normotensos foram incubadas por duas horas com HETM (30 μM), TMLR (10 e 30 μM), ISQ (3, 10 e 30 μM) ou veiculo (controle). Cada barra representa a média de 6 preparações e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos incubados com HETM, TMLR ou ISQ em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,05$).

5.3.3.6 Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária

A fim de verificarmos se o tratamento prolongado com o HETM, TMLR ou com a isoquercitrina (ISQ) poderiam exercer sua atividade diurética parcialmente e/ou adicionalmente através da inibição da enzima anidrase carbônica, como a acetazolamida e outras sulfonamidas (JACKSON, 1996), os animais foram tratados por sete dias com as respectivas drogas, pela via oral, e o concentrado de hemácias

obtido. Os resultados encontrados mostram que nenhuma das substâncias testadas apresentou atividade sobre a anidrase carbônica eritrocitária (Figura 37), reforçando a idéia de que a atividade diurética observada pode ser decorrente de alterações na hemodinâmica renal. Por outro lado, o inibidor da anidrase carbônica de referência (acetazolamida) reduziu a atividade desta enzima em $44 \pm 6\%$ (Figura 37).

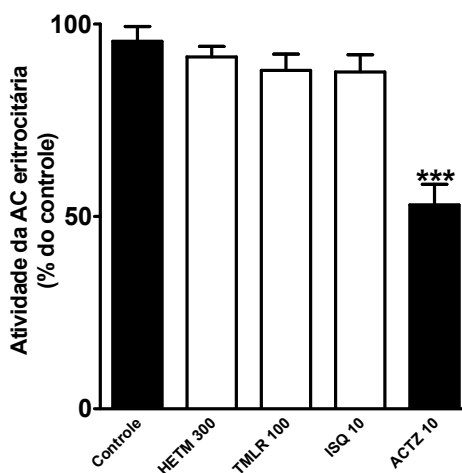


Figura 37 – Efeitos dos tratamentos prolongados com o HETM, TMLR e isoquercitrina (ISQ) presente em *T. majus* sobre a atividade da enzima anidrase carbônica eritrocitária. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados, diariamente com HETM (300 mg/kg), TMLR (100 mg/kg), ISQ (10 mg/kg), acetazolamida (ACTZ; 10 mg/kg) ou veiculo (controle), tendo seu concentrado de hemácias obtido no sétimo dia. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam HETM, TMLR, ISQ ou ACTZ em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (***) $p < 0,001$.

5.4 Avaliação da atividade hipotensora

Baseado nos resultados previamente obtidos, e considerando que substâncias diuréticas e inibidoras da ECA são empregadas como drogas de primeira linha na farmacoterapia da hipertensão, foi investigado se o HETM, a TMLR ou a ISQ poderiam acarretar alguma alteração na pressão arterial média (PAM) de ratos anestesiados. Com esta finalidade, em todos os protocolos realizados os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico descrito no item 4.8.3.

5.4.1 Efeitos do HETM na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados

Nos animais controle, o valor da PAM basal foi de $109,5 \pm 2,5$ mm Hg. Uma hora e trinta minutos (1,5 horas), e três horas (3 horas) após o tratamento oral com HETM (100 mg/kg), a PAM de ratos normotensos anestesiados foi reduzida em 12,8

$\pm 2,3$ e $7,4 \pm 1,3$ mm Hg, respectivamente (Figura 38B), quando comparados ao grupo controle (veículo).

Tendo como indicador a maior eficácia hipotensora do HETM, os demais experimentos foram realizados no tempo de 1,5 horas após a administração. O HETM diminuiu a PAM de maneira significativa, sendo que as doses de 100 e 300 mg/kg apresentaram importante efeito hipotensor, com redução máxima de $14,9 \pm 2,1$ mm Hg para a dose de 300 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Figura 38A). Todos os tratamentos realizados não acarretaram alterações significativas na frequência cardíaca dos animais utilizados (dados não mostrados).

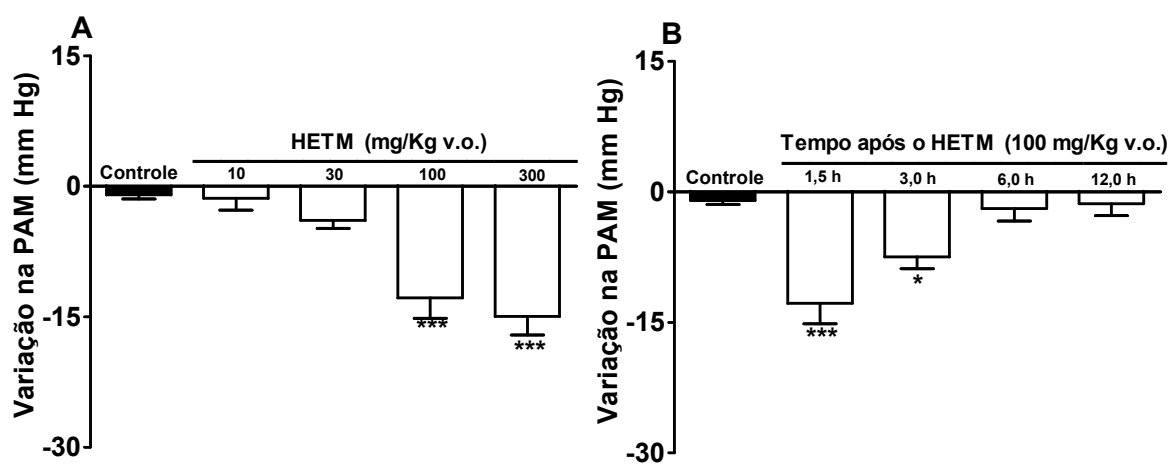


Figura 38 – Efeitos dependentes da dose (A) e do tempo de administração (B) do HETM na pressão arterial de ratos anestesiados. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados pela via oral com diferentes doses de HETM (10-300 mg/kg) ou veículo (controle), tendo sua pressão arterial média (PAM) registrada por 30 minutos. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam HETM em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.4.2 Efeitos da TMLR na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados

A fração purificada livre de sacarose (TMLR) obtida de *T. majus*, administrada pela via oral, promoveu significativo efeito hipotensor após 1,5 horas dos tratamentos. Os valores da PAM dos animais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg foram reduzidos em $14,9 \pm 3,0$ e $18,7 \pm 2,8$ mm Hg, respectivamente, em relação a PAM basal que foi de $109,5 \pm 2,5$ mm Hg (Figura 39).

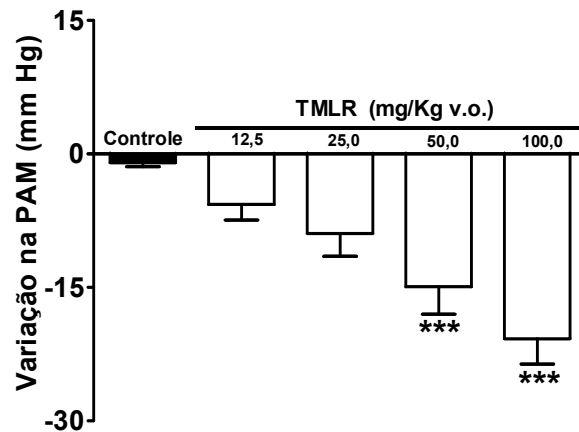


Figura 39 – Efeitos da TMLR na pressão arterial de ratos anestesiados. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados pela via oral com diferentes doses da TMLR (12.5-100 mg/kg) ou veículo (controle), tendo sua pressão arterial média (PAM) registrada por 30 minutos. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam TMLR em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) ($*** p < 0,001$).

5.4.3 Efeito hipotensor do HETM e TMLR em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

A PAM basal registrada em animais espontaneamente hipertensos (SHR) anestesiados, após 15 minutos de estabilização, e antes da administração de qualquer substância, foi de $134,4 \pm 1,8$ mm Hg. Um efeito hipotensor significativo foi observado em animais SRH e Wistar Kyoto (WKY) após a administração intraduodenal de TMLR (50 mg/kg) ou HETM (100 mg/kg). Os valores de redução da PAM em animais SRH foram de $18,7 \pm 4,4$ e $14,1 \pm 6,7$ mm Hg para a TMLR e HETM, respectivamente (Figuras 40A e B). Todos os tratamentos realizados não acarretaram alterações significativas na frequência cardíaca dos animais SHR e WKY utilizados (dados não mostrados).

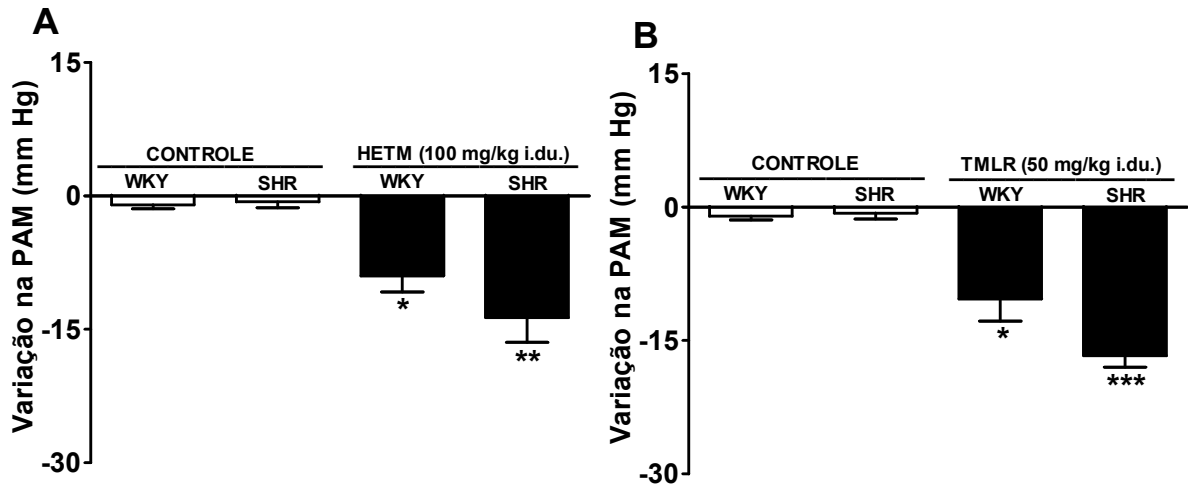


Figura 40 – Efeitos da administração intraduodenal (i.du.) do HETM (A) e da TMLR (B) na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos anestesiados. Grupos de ratos (n=6) SHR e WKY foram tratados pela via intraduodenal com o HETM (100 mg/kg), TMLR (50 mg/kg) ou veiculo (controle), tendo sua pressão arterial média (PAM) registrada por 30 minutos. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam HETM ou TMLR em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

5.4.4 Efeitos da ISQ na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados

O polifenólico majoritário identificado em *T. majus*, isoquercitrina (ISQ), na dose de 10 mg/kg, alterou a PAM de ratos normotensos anestesiados em $15,5 \pm 2,3$ mm Hg, quando comparado com o grupo controle (PAM basal de $108,7 \pm 2,2$ mm Hg), 1,5 horas após o tratamento oral (Figura 41B). Da mesma forma, a administração intravenosa deste flavonóide resultou em um significativo efeito hipotensor, com redução da PAM estimada em $16,4 \pm 3,2$ e $23,2 \pm 3,8$ mm Hg nas doses de 2 e 4 mg/kg, respectivamente, quando comparados com os animais tratados com apenas com salina (i.v.) (Figura 41A).

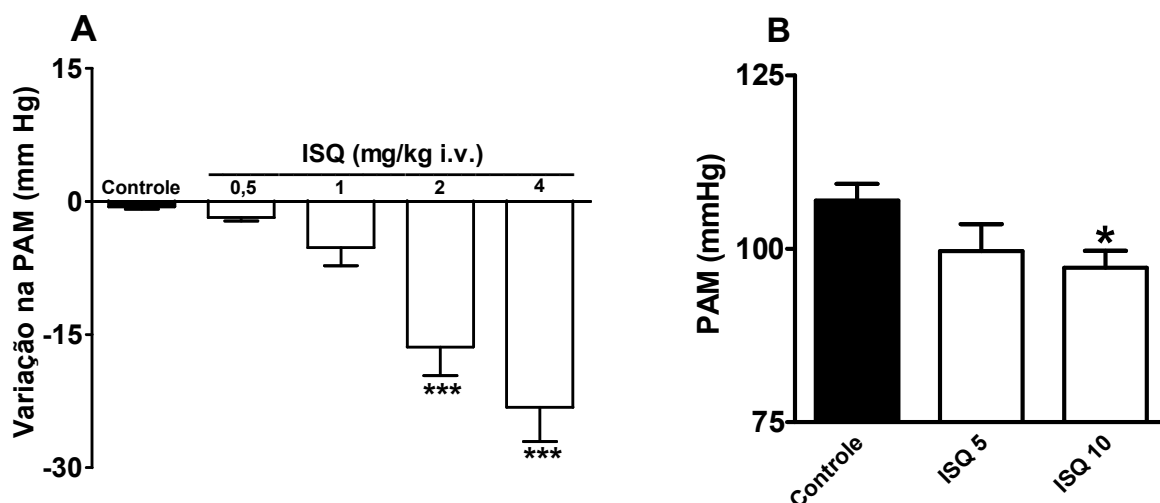


Figura 41 – Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados. Grupos de ratos ($n=6$) normotensos foram tratados com diferentes doses de ISQ pelas vias intravenosa (A) (0.5-4 mg/kg) e oral (B) (5-10 mg/kg), tendo sua pressão arterial média (PAM) registrada. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Efeitos da ISQ sobre a resposta hipertensora induzida pela angiotensina I e hipotensora induzida pela bradicinina em ratos normotensos anestesiados

Como a ISQ foi capaz de inibir a atividade da ECA plasmática (“*ex-vivo*”) em ratos normotensos, objetivamos verificar se esta atividade seria capaz de interferir com o metabolismo da angiotensina I e da bradicinina em um sistema biológico complexo, sugerindo uma possível resposta inibidora “*in vivo*” desta protease

A administração da angiotensina I foi capaz de elevar a PAM em ratos normotensos anestesiados para valores de $161,6 \pm 6,7$ mm Hg. Por outro lado, o captopril (10 nmol/kg) foi capaz de reduzir a resposta hipertensiva da Ang I (10 pmol/kg) em $50 \pm 6\%$, quando comparado com o grupo controle (veículo) (Figura 42A). Da mesma forma, a administração intravenosa de isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) resultou em uma redução da resposta hipertensora induzida pela Ang I (10 pmol/kg) em $31 \pm 5\%$, quando comparado com o grupo controle (Figura 42A).

A duração da resposta hipertensora induzida pela Ang I (minutos) também foi investigada, e tanto a ISQ quanto o captopril foram capazes de reduzir significativamente este parâmetro. A administração intravenosa da ISQ (4 mg/kg) e

do captopril (10 nmol/kg) resultou em uma significativa redução no tempo de efeito da Ang I ($23 \pm 4\%$ e $44 \pm 9\%$, respectivamente) quando comparados com o grupo controle (Figura 42B).

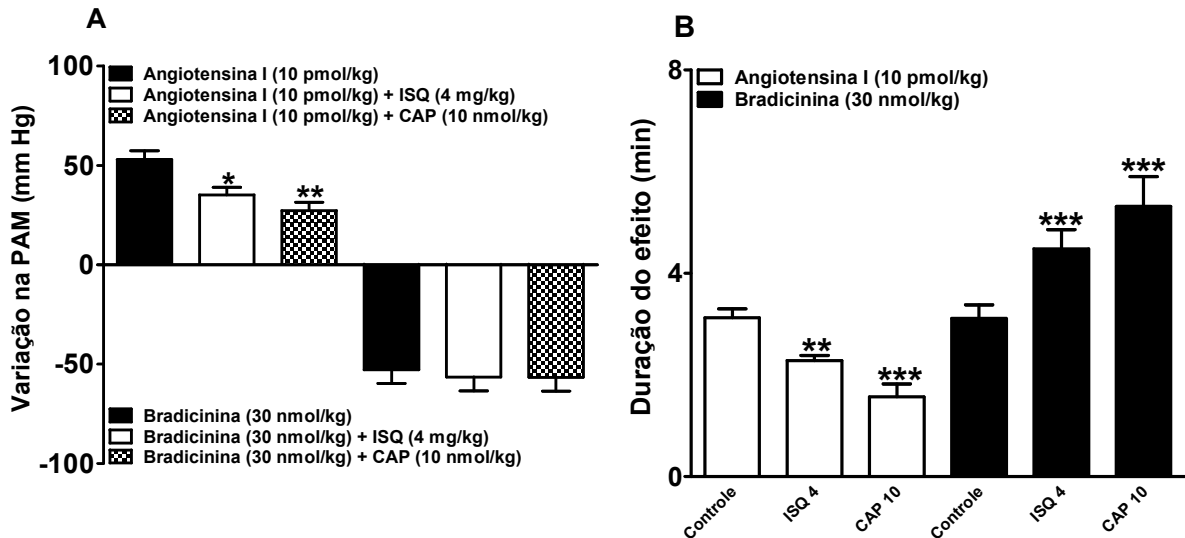


Figura 42 - Efeitos da pré-administração de isoquercitrina (ISQ) sobre a resposta da angiotensina I e bradicinina na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados. (A) Alterações produzidas na PAM (mm Hg) de ratos ($n=6$) normotensos (anestesiados) com administração intravenosa de angiotensina I (10 pmol/kg) e bradicinina (30 nmol/kg), antes e após o pré-tratamento intravenoso (5 minutos) com a isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) ou captopril (CAP; 10 nmol/kg). **(B)** Duração do efeito (minutos) da resposta hipertensora e hipotensora induzida pela angiotensina I (10 pmol/kg) e bradicinina (30 nmol/kg), respectivamente, antes e após o pré-tratamento intravenoso (5 minutos) com a isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) ou captopril (CAP; 10 nmol/kg). Os animais controle receberam somente veículo (NaCl 0.9%). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou CAP em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Baseado nos resultados descritos acima, onde a ISQ parece exibir um efeito inibitório sobre a atividade da ECA (*in vivo*), procuramos evidenciar se esta atividade poderia interferir com a resposta hipotensora da bradicinina, já que desta forma, ela seria menos degradada a cininas inativas. Neste sentido, tanto a pré-administração intravenosa de ISQ (4 mg/kg) como a de captopril (10 nmol/kg), não foram capazes de aumentar significativamente a ação hipotensora da bradicinina, em ratos normotensos anestesiados (Figura 42A). Entretanto, a duração do efeito hipotensor foi significativamente ampliada (para ambas as drogas), com valores estimados em $59 \pm 10\%$ e $77 \pm 15\%$ para a ISQ e captopril, respectivamente (Figura 42B).

5.4.4.2 Efeitos da ISQ sobre a resposta da angiotensina II na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados

A fim de verificarmos se as alterações na PAM induzidas pela ISQ poderia também envolver o bloqueio de receptores AT1 da angiotensina II (Ang II), como previamente relatado (XUE *et al.*, 2008), propomos investigar os efeitos da pré-administração da ISQ sobre a resposta hipertensora da Ang II em ratos normotensos anestesiados.

Neste caso, a administração intravenosa de uma dose de ISQ (4 mg/kg) não resultou em redução da resposta hipertensiva induzida pela Ang II (10 pmol/kg); e também, não alterou o tempo do efeito hipertensivo da mesma, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o losartan (1 mg/kg), uma droga antagonista de AT1, reduziu o efeito da Ang II em $51 \pm 9\%$. Da mesma forma, foi capaz de reduzir a duração do tempo de efeito hipertensivo em $40 \pm 9\%$ (Figura 43A e B). Estes resultados sugerem não haver envolvimento do bloqueio dos receptores AT1 de Ang II no efeito hipotensor da ISQ.

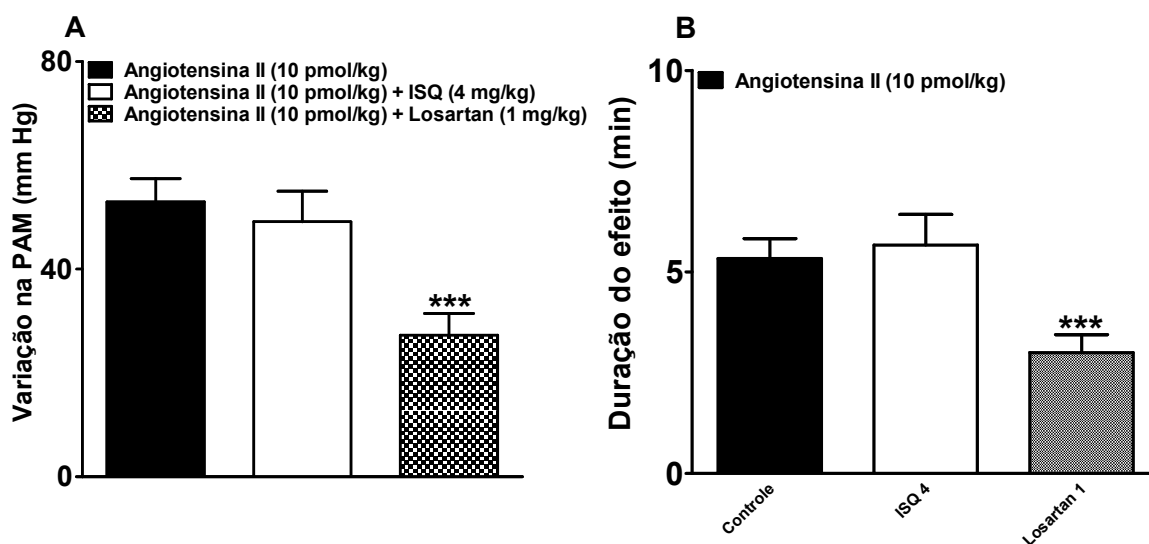


Figura 43 - Efeitos da pré-administração de isoquercitrina (ISQ) sobre a resposta da angiotensina II na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados. (A) Alterações produzidas na PAM (mm Hg) de ratos (n=6) normotensos (anestesiados) com administração intravenosa de angiotensina II (10 pmol/kg) antes e após o pré-tratamento intravenoso (5 minutos) com a isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) ou losartan (1 mg/kg). **(B)** Duração do tempo de efeito (minutos) da resposta hipertensora induzida pela angiotensina II (10 pmol/kg) antes e após o pré-tratamento intravenoso (5 minutos) com a isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) ou losartan (1 mg/kg). Os animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9%). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou losartan em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (***) $p < 0,001$.

5.4.4.3 Efeitos da administração da ISQ sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos expostos a infusão contínua de L-NAME

Como a resposta diurética observada para a ISQ foi significativamente reduzida após o bloqueio da síntese de NO, e considerando que a pressão arterial sistêmica é diretamente influenciada pela biodisponibilidade deste mediador, objetivamos verificar se tratamento agudo com L-NAME poderia alterar a resposta hipotensora induzida pela ISQ.

Com esta finalidade, grupos de animais normotensos foram infundidos com L-NAME (7 mg/kg/min), e apresentaram um aumento sustentado da PAM em cerca de 65 mm Hg, ou seja, um estado agudo de hipertensão. Este fato decorre da propriedade do L-NAME em inibir a atividade da enzima óxido nítrico sintase, impedindo assim a liberação de óxido nítrico.

Os resultados apresentados na figura 44 mostram que no grupo controle (não infundidos com L-NAME) a administração intravenosa de isoquercitrina (4 mg/kg) induziu uma redução na PAM em $23,8 \pm 3,2$ mm Hg. Por outro lado, no grupo infundido com L-NAME, ocorreu uma forte inibição da resposta hipotensora da ISQ, a qual correspondeu a apenas $4,7 \pm 0,7$ mm Hg. A acetilcolina (ACh; 30 nmol/Kg) foi utilizada como controle, e gerou uma hipotensão de $68,5 \pm 7,7$ e $61,8 \pm 4,8$ mm Hg, respectivamente na ausência e na presença do L-NAME (dados não mostrados).

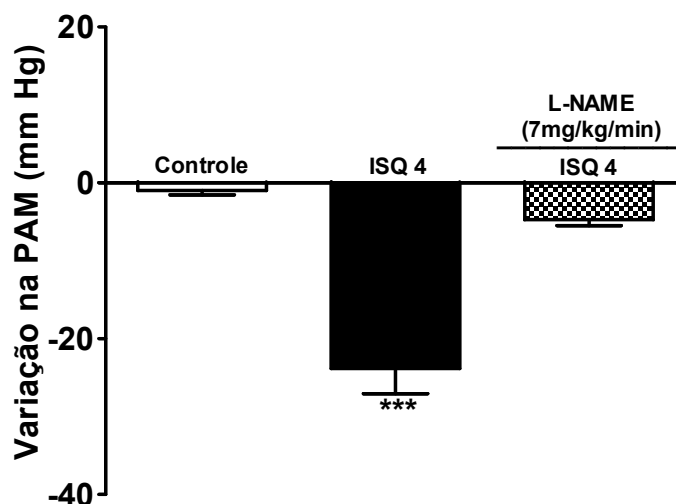


Figura 44 - Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos expostos a infusão contínua de L-NAME. Alterações produzidas na PAM pela administração endovenosa de isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) em ratos (n=6) normotensos (anestesiados) antes e após a infusão contínua de L-NAME (7 mg/kg/min). Os animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9%). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou ISQ + L-NAME em comparação com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (***) ($p < 0,001$).

5.4.4.4 Efeitos da administração da ISQ sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos expostos ao pré-tratamento com ODQ

Para avaliarmos a real participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase na hipotensão causada pela isoquercitrina, utilizamos um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, o ODQ. Os resultados obtidos mostraram que a administração da ISQ na dose de 4 mg/kg (i.v.) provocou uma significativa redução na PAM dos animais controle (na ausência de ODQ), com valores médios de redução de $20,7 \pm 2,9$ mm Hg. Nos animais tratados (ODQ; 2 mg/kg) a redução dos níveis pressóricos acarretados pela ISQ foi de apenas $2,8 \pm 1,3$ mm Hg, mostrando a significativa participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase no efeito hipotensor observado (Figura 45). A queda da PAM gerada pela ACh foi de $59,7 \pm 4,6$ e $64,8 \pm 5,5$ mm Hg, respectivamente, na ausência e na presença do ODQ (dados não mostrados). Os dados obtidos foram analisados em comparação à PAM basal do grupo tratado apenas com salina ($109,7 \pm 3,1$ mm Hg).

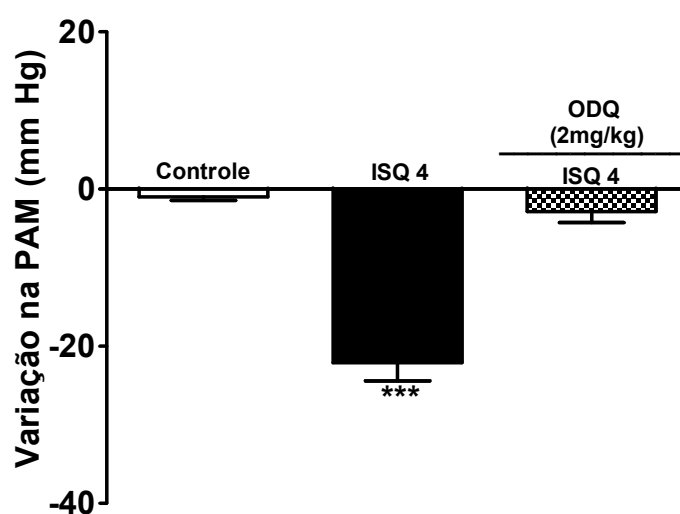


Figura 45 - Efeitos da administração da isoquercitrina (ISQ) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos expostos ao pré-tratamento com ODQ. Alterações produzidas na PAM pela administração endovenosa de isoquercitrina (ISQ; 4 mg/kg) em ratos (n=6) normotensos (anestesiados) antes e após a administração endovenosa de ODQ (2 mg/kg). Os animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9% + DMSO 1%). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou ISQ + ODQ em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (***) ($p < 0,001$).

5.4.4.5 Efeitos do tratamento prolongado com L-NAME frente à resposta hipotensora e inibidora da ECA da ISQ

Com base nos resultados anteriores em que evidenciamos uma participação direta da inibição da ECA e da liberação de óxido nítrico vascular no efeito diurético e hipotensor da ISQ, objetivamos verificar se o pré-tratamento com L-NAME, pela via oral, por sete dias, poderia influenciar na resposta hipotensora e inibidor da ECA deste composto, quando administrado oralmente. Neste caso, o pré-tratamento com o L-NAME não alterou significativamente a PAM dos grupos controle ($94,5 \pm 3,1$ mm Hg na ausência do L-NAME e $107,9 \pm 4,6$ mm Hg na presença do L-NAME). Por outro lado, o pré-tratamento com este composto (L-NAME) aboliu a resposta hipotensora observada com a isoquercitrina, alterando os valores da PAM de $77,8 \pm 3,0$ mm Hg (na ausência do L-NAME) para $95,5 \pm 5,8$ mm Hg (na presença do L-NAME) (Figura 46A). Da mesma forma, o pré-tratamento com o L-NAME reduziu a atividade inibidora da ECA da ISQ de $43 \pm 8\%$ para $10 \pm 4\%$, sem alterar, no entanto, o efeito inibidor da ECA do captopril ($65 \pm 7\%$ na ausência do L-NAME e $61 \pm 8\%$ na presença do L-NAME) (Figura 46B).

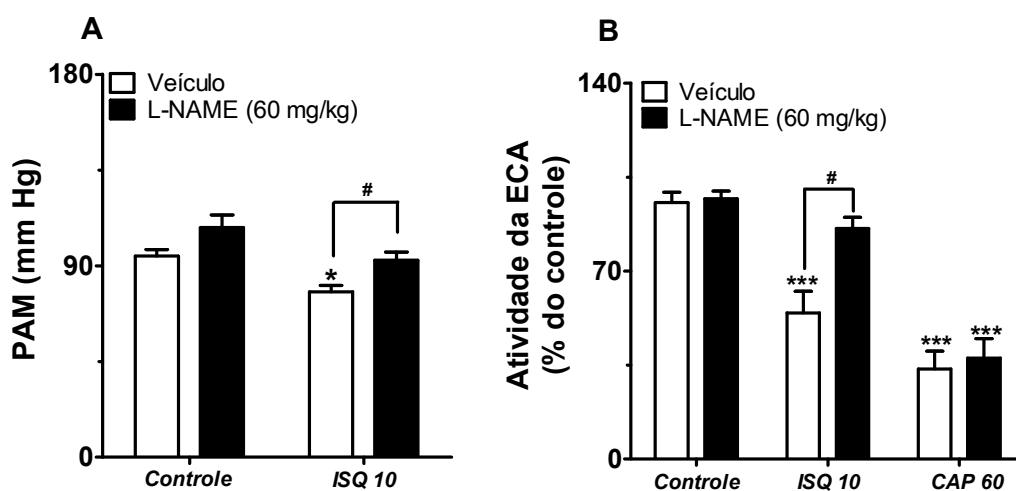


Figura 46 – Efeitos do tratamento prolongado com o L-NAME sobre a resposta hipotensora (A) e inibidora da ECA (B) da isoquercitrina (ISQ). Grupos de ratos (n=6) normotensos foram tratados, diariamente, pela via oral, por sete dias, com a ISQ (10 mg/kg), captopril (60 mg/kg) ou veiculo, associado ou não ao L-NAME (60 mg/kg). No final dos protocolos a pressão arterial média (PAM) foi registrada por 30 minutos em animais anestesiados. A atividade da ECA plasmática foi determinada por fluorimetria indireta em amostras de soro coletadas no final dos tratamentos (7º dia). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou CAP em comparação com os respectivos grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls). # denota os níveis de significância entre os grupos que receberam veiculo ou L-NAME (Student's t-test) (# ou *p < 0,05; ***p < 0,001).

5.4.5 Efeitos do tratamento prolongado com a ISQ frente à determinação de nitrato/nitrito sérico (NOx)

Considerando que recentes trabalhos co-relacionam a redução do estresse oxidativo e o aumento da biodisponibilidade de NO com drogas inibidoras da ECA (DESIDERI *et al.*, 2008; MARTELLI *et al.*, 2009; DE LA ROSA *et al.*, 2010; XIA e LAZARTIGUES, 2010), objetivamos evidenciar se o tratamento com a isoquercitrina (ISQ; 5 e 10 mg/kg), pela via oral, por sete dias, em animais espontaneamente hipertensos (SHR) poderia influenciar na biodisponibilidade do óxido nítrico corporal. Neste caso, utilizamos como controles a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (APC; 100 mg/kg) e o captopril (CAP; 60 mg/kg), um clássico inibidor da ECA. Os resultados do presente protocolo estão descritos na figura 47. O tratamento com a ISQ na dose de 10 mg/kg aumentou a concentração de nitrito sérico em $187 \pm 7\%$ em comparação com o grupo controle. Por outro lado, as doses de 5 mg/kg de isoquercitrina, e os tratamentos realizados com a apocinina ou com o captopril não acarretaram aumentos significativos (em comparação com o controle) na concentração deste marcador da biodisponibilidade de óxido nítrico.

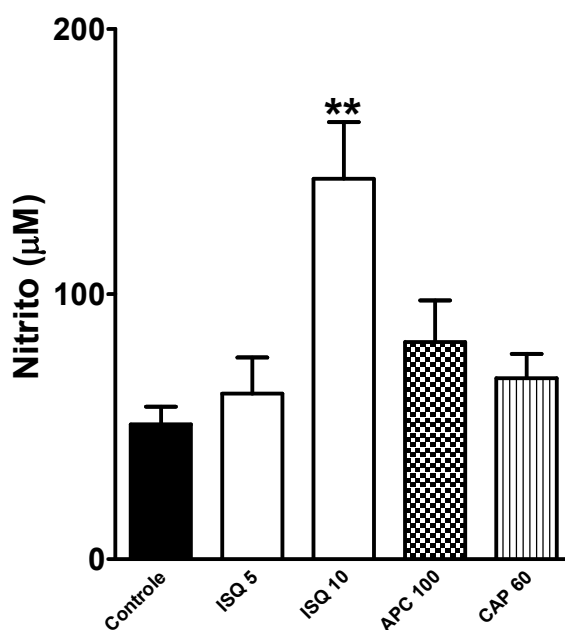


Figura 47 – Efeitos dos tratamentos prolongados com a isoquercitrina (ISQ) sobre a concentração plasmática de nitrito. Grupos de ratos (n=6) SHR foram tratados, diariamente, com a ISQ (5 e 10 mg/kg), apocinina (APC; 100 mg/kg) captopril (CAP; 60 mg/kg) ou veiculo, sendo o soro coletado após 7 dias. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância em comparação com o grupo tratado apenas com o veiculo (controle) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (**p < 0,01).

5.4.6 Efeitos do tratamento prolongado com a ISQ frente à marcação dos ânions superóxido e análise por microscopia confocal

Com a hipótese de que o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico pode ser decorrente de uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), em consequência de uma possível atividade antioxidante; e considerando que existem relatos na literatura de que a isoquercitrina pode apresentar esta atividade (VITOR *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009), objetivamos verificar se o tratamento prolongado com este polifenólico (sete dias) poderia influenciar na produção de ERO em artérias mesentéricas de animais espontaneamente hipertensos (SHR), e indiretamente, na biodisponibilidade do óxido nítrico. Os resultados obtidos com a marcação dos ânions superóxido e análise por microscopia confocal são apresentados na figura 48 (A, B, C e D). Neste caso, evidenciamos uma redução significativa na produção de ERO, com valores estimados em $62 \pm 4\%$, $52 \pm 11\%$ e $20 \pm 8\%$ para a isoquercitrina (ISQ; 5 e 10 mg/kg) e para a apocinina (APC; 100 mg/kg), respectivamente (Figura 48E).

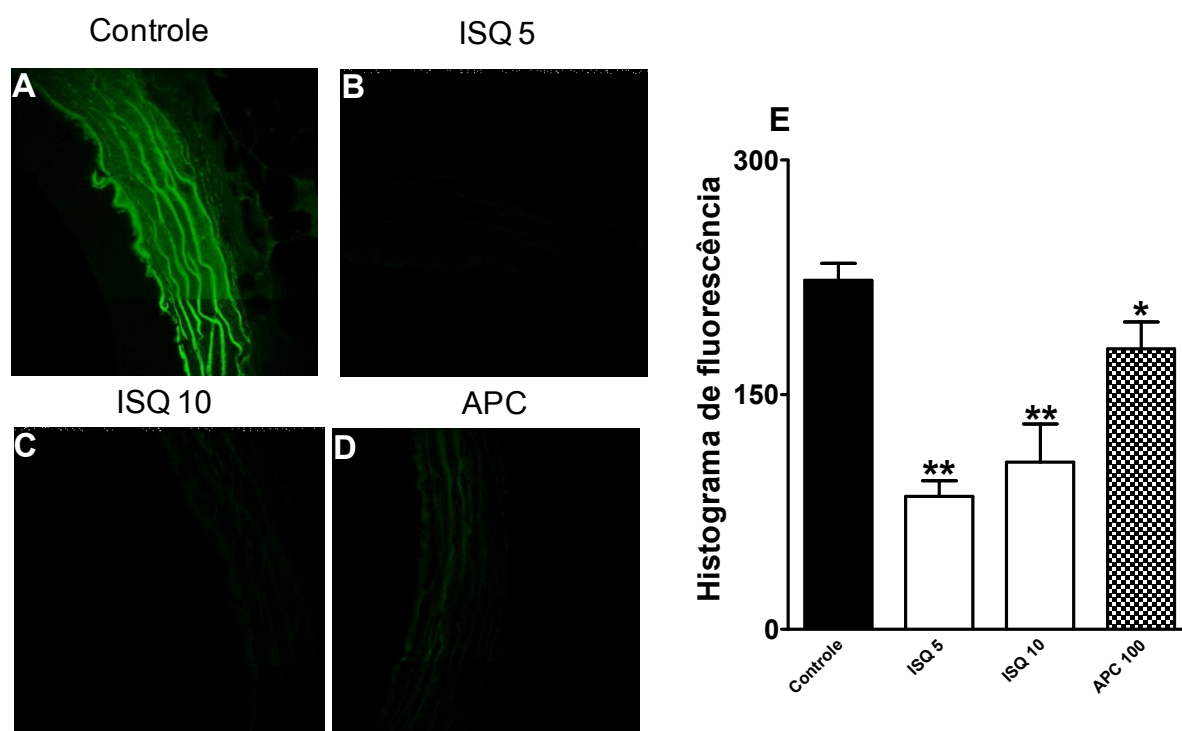


Figura 48 – Efeitos dos tratamentos prolongados com a isoquercitrina (ISQ) sobre as espécies reativas de oxigênio (ERO) em artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos (A-E). Grupos de ratos SHR (n=6) foram tratados, diariamente, pela via oral, por sete dias, com diferentes doses de ISQ (5 e 10 mg/kg), apocinina (APC; 100 mg/kg) ou veiculo. Amostras das artérias mesentéricas foram obtidas, congeladas e seccionadas em criostato (25 μ m). Lâminas foram preparadas com a sonda fluorescente dihidroetidina e examinadas em microscópio confocal. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram os E. P. M. Asteriscos denotam os níveis de significância dos grupos que receberam ISQ ou APC em comparação com os grupos controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls) (*p < 0,05; **p < 0,01).

VI DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos produtos naturais têm sido alvos de pesquisas básicas e clínicas para o desenvolvimento de novas drogas diuréticas e conseqüentemente hipotensoras. Dentre estas, a grande maioria, utiliza o emprego popular como referencial de novas pesquisas (WRIGHT *et al.*, 2007; TOVCHIGA e SHTRYGOL, 2009).

Neste sentido, atualmente, existem diversas evidências (etnobotânicas e farmacológicas) a respeito dos benefícios que os extratos obtidos de *T. majus* podem acarretar no tratamento de distúrbios cardiovasculares e renais (BINET, 1964; PANIZZA, 1998; LORENZI e MATOS, 2002; FERREIRA *et al.*, 2004; GOOS *et al.*, 2006). Além disso, extratos brutos obtidos de outras espécies do gênero *Tropaeolum*, tais como *Tropaeolum tuberosum* tem sido relatadas como potenciais agentes que poderiam alterar as funções do sistema urinário (JOHNS *et al.*, 1982; DE-LA-CRUZ *et al.*, 2007). Entretanto, os mecanismos que são à base de tais ações e os princípios ativos responsáveis por estas atividades permanecem desconhecidos. Os resultados aqui apresentados estenderam os dados precedentes, e mostraram-nos, pela primeira vez, que os componentes ativos presentes no extrato bruto etanólico (HETM) obtido das folhas do *T. majus* e de sua fração purificada livre de sacarose (TMLR) são eficazes em induzir ações diuréticas e hipotensoras, utilizando animais normotensos e SHR.

A utilização do *T. majus* como planta medicinal alcança diversas culturas, estendendo-se dos índios sul americanos às comunidades do mediterrâneo (LORENZI e MATOS, 2002; FERRO, 2006). Seu uso popular pode ser influenciado, pelo menos em parte, devido à baixa toxicidade apresentada. Estudos prévios relatam que a administração oral de até 5 g/kg da infusão e do extrato etanólico (70%) obtido das folhas desta espécie não apresentou alteração comportamental e/ou toxicidade aguda em camundongos (ZANETTI *et al.*, 2003). Neste ínterim, importantes evidências da baixa toxicidade do extrato bruto obtido das folhas de *T. majus* foram observadas neste estudo. Além da não alteração de parâmetros da função renal após o tratamento prolongado, a administração do infuso e do HETM em doses elevadas (5 g/kg), por via oral, não alterou significativamente o comportamento dos animais no teste de toxicidade aguda. Da mesma forma, as alterações comportamentais apresentadas pelos ratos tratados com uma dose do HETM, por via intraperitoneal, foram leves e não duraram mais que 24 horas.

Análises fitoquímicas prévias, realizadas com *T. majus*, mostraram que os principais metabólitos presentes nas folhas desta espécie são glicosinolatos e compostos polifenólicos, incluindo flavonóides e terpenóides (KJAER *et al.*, 1978; LYKKESFELDT e MOLLER, 1993; DE MEDEIROS *et al.*, 2000; GRIFFITHS *et al.*, 2001; MIETKIEWSKA *et al.*, 2004; SANGALLI *et al.*, 2004; ZANETTI *et al.*, 2004). Considerando que as atividades biológicas atribuídas aos glicosinolatos são ínfimas (WIELANEK e URBANEK, 2006), conduziu-nos a imaginar que os compostos polifenólicos, principalmente os flavonóides, poderiam ser os responsáveis pelas ações aqui observadas.

Estudos prévios demonstram que diversos compostos polifenólicos obtidos de produtos naturais podem apresentar atividades diuréticas e/ou hipotensoras (PECHANOVA *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2007; YUNG *et al.*, 2008; JADHAV *et al.*, 2010); dentre estes, destacando-se os flavonóides, algumas saponinas e os ácidos orgânicos (MAGHRANI *et al.*, 2005). No que se refere à atividade diurética, acredita-se que estes efeitos possam ser decorrentes de um aumento no fluxo sanguíneo renal (STANIC e SAMARZIJA, 1993) ou através da inibição da reabsorção tubular de água e eletrólitos (PANTOJA *et al.*, 1991).

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de compostos polifenólicos contidos em certos alimentos (vegetais, vinho tinto, chá verde, chocolate e algumas frutas e grãos) estão associados a uma redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular (RENAUD e GUEGUEN, 1998). Da mesma forma, diversas evidências têm mostrado associação direta entre o consumo regular de alimentos ricos em compostos polifenólicos, tais como o *T. majus*, com uma redução do risco de doenças cardiovasculares e renais (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003; GELEIJNSE e HOLLMAN, 2008).

Os efeitos cardioprotetores dos compostos polifenólicos podem ser atribuídos, ao menos em parte, à suas propriedades antioxidantes (que permitem neutralizar os ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio), à estimulação das enzimas antioxidantes endógenas e à inibição da xantina oxidase e da NADPH oxidase. Assim, em conjunto, estas propriedades antioxidantes melhoram a biodisponibilidade do NO ao proteger sua degradação pelos ânions superóxido (STOCLET *et al.*, 2004; QUEEN e TOLLEFSBOL, 2010).

Por outro lado, recentes trabalhos relatam que a proteção vascular acarretada pelos polifenóis pode ser decorrente de uma ação direta sobre os vasos sanguíneos. Como exemplo, os polifenóis do vinho são potentes estimuladores do relaxamento

dependente do NO e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (NDIAYE *et al.*, 2003; NDIAYE *et al.*, 2004; NDIAYE *et al.*, 2005). Também é descrito que os polifenóis podem aumentar a produção do NO por intermédio da ativação de uma via redox-sensível, a via PI3-kinase/Akt, conduzindo à fosforilação da eNOS e sua ativação, e igualmente por um mecanismo dependente da concentração citosólica de cálcio livre (ANDRIAMBELOSON *et al.*, 1997; NDIAYE *et al.*, 2003; NDIAYE *et al.*, 2004; NDIAYE *et al.*, 2005). Além disso, os compostos polifenólicos podem aumentar a síntese da prostaciclina e inibir a síntese da endotelina (OAK *et al.*, 2003). A administração crônica de compostos polifenólicos é igualmente capaz de aumentar a expressão da eNOS e a produção do NO (RATHEL *et al.*, 2007). Da mesma forma, os compostos polifenólicos como as chalconas (ex: buteína), flavonóis (ex: quercetina) e estilbenos (ex: resveratrol) foram às primeiras moléculas identificadas com a capacidade de ativar um grupo de proteínas cardioprotetoras denominadas sirtuínas (SIRT1). Assim, a ativação das SIRT1 no endotélio vascular, pode estimular a produção do NO e prevenir a disfunção endotelial observada em patologias como a HAS (NAYAGAM *et al.*, 2006; MILNE *et al.*, 2007).

Este conjunto de mecanismos pode ajudar a explicar as propriedades diuréticas, hipotensoras, anti-hipertensivas e antiateroscleróticas dos compostos polifenólicos (LABINSKY *et al.*, 2006). No entanto, poucos estudos foram dedicados à caracterização e validação das propriedades cardioprotetoras dos compostos polifenólicos presentes em *T. majus*. Neste sentido, nós investigamos, identificamos e quantificamos a presença do flavonóide isoquercitrina no HETM e na TMLR. Além disso, verificamos que este composto polifenólico pode ser o responsável, pelo menos em parte, pelas atividades cardio-renais aqui explicitadas.

A isoquercitrina, identificada por técnicas espectrométricas como o composto polifenólico majoritário encontrado no HETM e TMLR, e utilizada neste trabalho, é um flavonol glicosilado (quercetina-3-O-glicosídeo), presente de forma abundante em várias plantas comestíveis e medicinais, que apresenta boa solubilidade e alta absorção pelo trato gastrointestinal (CHANG *et al.*, 2005).

Vários benefícios cardiovasculares da isoquercitrina e de plantas ricas neste composto são descritos na literatura científica, tais como ação ateroprotetora e estabilizadora de placas ateroscleróticas (ENKHMAA *et al.*, 2005; MOTOYAMA *et al.*, 2009), anti-hipertensiva (EMURA *et al.*, 2007), antiagregante plaquetária (EL HAOUARI *et al.*, 2007) e inibidora da ECA (*in vitro*) (LACAILLE *et al.*, 2001).

No que concerne a atividade inibidora da ECA, diversos produtos naturais tem se mostrado como boas fontes destes compostos. Diferentes metabólitos secundários oriundos de produtos naturais, incluindo os flavonóides, são relatados por inibirem competitivamente a atividade da ECA (SOMANADHAN *et al.*, 1999; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; KWON *et al.*, 2010). Acredita-se que este efeito possa ser decorrente da geração de complexos de quelato dentro do centro ativo enzimático, inibindo a função desta enzima. Assim, com a premissa de que a ECA é uma dipeptidil carboxipetidase que contém dois átomos de zinco em sua molécula, possuindo dois sítios de ligação, um amino e outro carboxi terminal, é possível que as hidroxilas livres dos grupos funcionais destes compostos polifenólicos possam interagir diretamente com os íons zinco no centro ativo enzimático, inativando competitivamente a atividade da ECA (CHEN *et al.*, 1992).

Confirmando achados prévios, que sugerem que o extrato aquoso obtido de *T. majus* pode apresentar fraca atividade inibidora sobre ECA (*in vitro*) (HAN *et al.*, 1991); os resultados aqui mostrados evidenciam que tanto o HETM, quanto a TMLR e a isoquercitrina, apresentam efeito inibidor significativo sobre a atividade desta protease, durante os tratamentos agudo ou prolongado. Considerando que o polifenólico ISQ apresenta quatro grupos hidroxil livres na aglicona, que por força de ressonância dos anéis fenólicos podem estabilizar cargas negativas, é possível que estes grupos funcionais possam gerar complexos com os íons zinco (que apresentam orbitais vazios capazes de acomodar elétrons) dentro do centro ativo da ECA, acarretando sua inibição (Figura 49).

Não obstante, drogas inibidoras da ECA podem inibir o metabolismo da bradicinina, que através da ativação de receptores do subtipo B₂, podem liberar mediadores vasodilatadores como o óxido nítrico e PGI₂, contribuindo para os efeitos cardiovasculares destas substâncias (TIRAPELLI *et al.*, 2009). Por outro lado, a redução da concentração sérica da aldosterona, somado ao aumento da pressão hidrostática nas arteríolas renais (devido à vasodilatação) pode contribuir diretamente para os efeitos diuréticos e natriuréticos observados (SAKAMOTO *et al.*, 1994; GALLIENI *et al.*, 2010).

Neste sentido, os achados obtidos neste estudo mostram uma significativa inibição da ECA, induzida pela ISQ, com conseqüente redução no metabolismo das cininas em ratos anestesiados, confirmada através do aumento na duração da resposta hipotensora induzida pela bradicinina. Considerando que a ISQ é o

flavonóide majoritário de *T. majus*, é provável que parte da resposta hipotensora e diurética observada após o tratamento com o HETM e TMLR seja decorrente desta atividade.

Embora dados recentes da literatura referem-se à capacidade da ISQ em induzir vasodilatação (“*in vitro*”) por antagonizar os receptores AT1 da angiotensina II em veia porta de ratos hipertensos (XUE *et al.*, 2008), não evidenciamos este efeito em ratos normotensos anestesiados. Estes achados sugerem que esta atividade, talvez, não seja relevante na regulação da resistência periférica (“*in vivo*”) e consequentemente na pressão arterial do modelo utilizado.

Outro efeito constantemente atribuído aos flavonóides e a isoquercitrina refere-se à redução do estresse oxidativo (VITOR *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009); que pode ser definido como a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, e ocorre quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (CAI e HARRISON, 2000). Tais substâncias oxidantes são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO), e entre os mais importantes estão o O_2^- , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^\cdot) e o peroxinitrito ($OONO^\cdot$). Em condições fisiológicas, as ROS atuam como moléculas de sinalização regulando o crescimento do músculo liso vascular (VSM), e como fatores de transcrição e expressão de gene. Nestas condições, a produção de ERO e peróxidos são balanceados por um eficiente sistema de antioxidantes, que são moléculas capazes de remover ERO, prevenindo, possíveis danos. Antioxidantes enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD) e catalase têm um papel importante na conversão de ERO a oxigênio e água. Da mesma forma, vários outros antioxidantes não-enzimáticos são também importantes em sequestrar radicas livres (vitaminas C, vitamina E e glutathione) balanceando a quantidade de ERO (MAEDA e INOBUCHI, 2010).

Sob condições patológicas, ERO são produzidas em quantidades excessivas. Este desvio no balanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes, chamado estresse oxidativo, pode ter importantes efeitos na função celular e tecidual, conduzindo à disfunção endotelial, hipertrofia do músculo liso vascular, apoptose, peroxidação lipídica, inflamação e aumento da deposição da matriz extracelular (UEMURA *et al.*, 2001; KADOGLU *et al.*, 2005). Nas células de mamíferos, as potenciais fontes enzimáticas produtoras de espécies reativas de oxigênio incluem a respiração mitocondrial, o ácido araquidônico via enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase, o citocromo P450, a xantina oxidase, a NADPH oxidase, a NO

sintase, as peroxidases e proteínas heme (CAI e HARRISON, 2000; MAEDA e INOBUCHI, 2010). Apesar de muitas dessas fontes serem potencialmente capazes de produzir espécies derivadas de oxigênio, três dessas fontes têm sido mais estudadas no que se refere ao sistema cardiovascular. Essas incluem a xantina oxidase, NADPH oxidase e NO sintase (CUI *et al.*, 2009; SPANIER *et al.*, 2009; TERASHIMA *et al.*, 2009).

Estudos utilizando diversos ensaios de oxidação *in vitro* e *ex vivo* já constataram que a isoquercitrina têm propriedades antioxidantes. Como por exemplo, a redução da lesão endotelial acarretada pelo H₂O₂ (VITOR *et al.*, 2004), a inibição da peroxidação lipídica e no sequestro de radicais livres, além de uma possível atividade sobre a superóxido dismutase (KIM *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Neste sentido, um aumento na biodisponibilidade de NO pode ter um importante papel na resposta antioxidante desta substância, uma vez que já foi demonstrado previamente que o pré-tratamento de células com baixas concentrações de NO pode aumentar a resposta de defesa contra ERO causadoras de importantes lesões endoteliais (KIM *et al.*, 1995).

Corroborando com dados supracitados, observamos um aumento expressivo da concentração sérica de nitrito, um marcador importante da biodisponibilidade do óxido nítrico corporal em animais SHR submetidos a tratamento prolongado com a isoquercitrina. Por outro lado, observamos uma redução marcante na produção de ERO nas artérias mesentéricas destes animais, levando-nos a hipótese de que o efeito antioxidante da ISQ pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade do NO, e conseqüentemente, para os efeitos cardio-renais evidenciados em animais tratados com o HETM, TMLR ou com a própria ISQ (Figura 49).

Apesar da grande quantidade de benefícios cardiovasculares atribuídos a ISQ, informações acerca da eficácia deste composto como possível agente diurético, ou de produtos naturais (ricos neste flavonóide) dotados desta atividade, permanecem obscuros. Tecnicamente, diuréticos são agentes que aumentam o fluxo urinário e a excreção renal de sódio, e são usados para ajustar o volume e/ou a composição dos fluidos corporais. Estes efeitos são decorrentes da supressão da reabsorção tubular renal de água e eletrólitos ou devido à interferência com o fluxo sanguíneo renal (JACKSON, 1996; GALLIENI *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, diversos diuréticos de uso clínico podem interferir com o transporte iônico de eletrólitos nos túbulos renais. Estas atividades podem ser decorrentes da inibição direta de transportadores renais, localizados principalmente

no ramo ascendente espesso da alça de henle (furosemida) ou no túbulo convoluto distal (hidroclorotiazida). Por outro lado, existem diuréticos que podem inibir a enzima anidrase carbônica (acetazolamida), enzima esta fundamental para a reabsorção renal de bicarbonato de sódio, ou interferirem principalmente com as ações do sistema renina-angiotensina-aldosterona (espironolactona e inibidores da ECA) (SAKAMOTO *et al.*, 1994; JACKSON, 1996).

Apesar de clinicamente contarmos com um grande número de drogas diuréticas, a grande maioria pode induzir vários efeitos adversos metabólicos e hidroeletrólíticos (ERNST e MOSER, 2009). Este fato estimula a investigação de novas moléculas com propriedades diuréticas e possivelmente, menor incidência de efeitos adversos. Desta forma, substâncias derivadas de produtos naturais que apresentem pouca toxicidade e atividade diurética comparável aos agentes utilizados na terapêutica, podem ser consideradas como boas opções clínicas, principalmente se não induzirem uma significativa depleção de potássio (HORISBERGER e GIEBISCH, 1987; CAMARGO *et al.*, 2004; MARTIN-HERRERA *et al.*, 2008).

Evidências recentes sugerem que a atividade diurética observada em algumas plantas medicinais pode ser decorrente de um efeito osmótico acarretado pela grande quantidade de potássio e/ou outros metais presentes nestas espécies (BENJUMEA *et al.*, 2005). Neste sentido, a atividade diurética aguda e prolongada evidenciada para o HETM, TMLR ou para a isoquercitrina, apresentou perfil de reposta similar a espironolactona, ou seja, com atividade poupadora de potássio. Desta forma, os dados apresentados neste trabalho levam-nos a supor que este efeito diurético não esteja relacionado com um mecanismo do tipo osmótico (MARTIN-HERRERA *et al.*, 2008). Este achado é suportado pela determinação quantitativas dos íons presentes nas folhas de *T. majus* L., que mostraram a presença de quantidades muito baixas de potássio e/ou outros metais, sugerindo que o efeito diurético parece não ser devido ao elevado teor iônico, que os túbulos renais são incapazes de absorver, produzindo excreção urinária do tipo osmótica (LOEW, 1991).

Apesar da clara contribuição da inibição da ECA nos efeitos renais observados, evidências relatam a capacidade dos flavonóides em inibir diretamente a atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, independente de sua ligação com a ECA, e conseqüente redução da liberação de aldosterona. Esta atividade é descrita através de estudos de inibição *in vitro*, utilizando tecidos cardíacos, cerebrais e renais de cães e ratos,

com concentrações variando de 4-19 mM. Estes efeitos aparentam estar relacionados com uma ligação diferente do sítio específico do qual os glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, exercem suas atividades (HIRANO *et al.*, 1989; ZHU *et al.*, 1997; UMAROVA *et al.*, 1998; VLKOVICOVA *et al.*, 2009). Neste sentido, é relatado frequentemente que uma redução na atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal reduz a capacidade funcional de transportadores iônicos localizados nos túbulos renais, o que pode resultar em diurese (JACKSON, 1996; GALLIENI *et al.*, 2010). Desta forma, como o HETM, a TMLR e a ISQ foram capazes de reduzir significativamente a atividade desta proteína, em concentrações de 30 μM , utilizando preparações membranares de rim de ratos normotensos, considera-se que parte da resposta diurética observada possa ser decorrente desta atividade (Figura 49).

Por outro lado, pesquisas apontam para a contribuição de algumas cininas na resposta diurética dos inibidores da ECA. Neste aspecto, atribui-se parte da atividade natriurética do ramipril, um inibidor da ECA clinicamente utilizado, à sua capacidade de reduzir o metabolismo da bradicinina (SAKAMOTO *et al.*, 1994). Estes achados corroboram com nossas evidências, pois a resposta diurética e natriurética acarretada pelo HETM, TMLR ou pela ISQ, que apresentaram significativo efeito sobre a ECA, foi abolida após a administração de HOE-140 (um antagonista não seletivo de receptores da bradicinina).

Diversos trabalhos relatam que parte dos benefícios cardiovasculares e renais observados com os inibidores da ECA advém da redução do metabolismo da bradicinina, e, conseqüentemente do estímulo dependente de cálcio (via receptores B2) da síntese de PGI_2 e NO endotelial (LINZ *et al.*, 1993; MURPHEY *et al.*, 2003; GRYGLEWSKI, 2008; SHI *et al.*, 2010). Este efeito deve-se a importância do endotélio na manutenção do tônus vascular e do fluxo sanguíneo renal regulando a liberação de várias substâncias vasoativas (ENDEMANN e SCHIFFRIN, 2004).

Evidências apontam para um papel significativo das prostaglandinas renais, principalmente a PGI_2 , como mediadores da manutenção da hipertonicidade medular e da atividade hormonal dos rins (SATO, 2007; INIGUEZ *et al.*, 2008). Além disso, os prostanóides têm um profundo efeito sobre a manutenção da perfusão sanguínea renal e, conseqüentemente, na taxa de filtração glomerular (TFG), principalmente em algumas situações clínicas, como estresse renal ou depleção de volume (DE MARIA e WEIR, 2003).

Apesar da relevância das prostaglandinas renais na manutenção da diurese, a frequência com que a indometacina, um inibidor clássico da COX1 (enzima chave na via enzimática que produz as prostaglandinas) pode produzir efeitos colaterais renais é baixa, devido estes prostanóides não desempenharem um papel crítico na manutenção da função renal em indivíduos saudáveis. Contudo, drogas que liberam prostaglandinas renais levam ao aumento do fluxo sanguíneo renal, da TFG e da excreção renal de sódio (WHELTON e HAMILTON, 1991). Neste sentido, nossos achados suplementam esta observação, pois quando ratos normotensos foram tratados com o HETM, TMLR ou com a ISQ em associação com a indometacina, a atividade diurética e natriurética foi reduzida substancialmente, enquanto que os animais controle não demonstraram alterações significativas.

Estes dados sugerem que o(s) componente(s) ativo(s) do *T. majus* estão parcialmente envolvidos com a liberação ou com uma atividade dependente das prostaglandinas, seja indiretamente devido à inibição da ECA, ou independente desta (Figura 49). Considerando que o polifenólico majoritário do HETM e da TMLR é a isoquercitrina, torna-se evidente que esta substância seja o potencial responsável por esta atividade, pois alguns flavonóides ou subfrações ricas nestes compostos são descritos como substâncias capazes de induzir a síntese de prostaciclina (KHAZA'AI e WAHLE, 1996; SCHRAMM e GERMAN, 1998; SCHRAMM *et al.*, 2001; MARDLA *et al.*, 2004; AMEER *et al.*, 2010).

Assim como a PGI₂, o NO pode apresentar um papel fundamental na manutenção do tônus vascular e conseqüentemente da pressão arterial. Sua liberação mediada pela bradicinina, ou independente desta, como por exemplo, através da redução do estresse oxidativo, entre outros, pode ter importantes conseqüências sobre o sistema renal e cardiovascular (VANHOUTTE *et al.*, 2005; MAEDA e INOBUCHI, 2010). Comprometimentos da biodisponibilidade de NO, tanto por aumento da sua inativação (estresse oxidativo), como por redução na sua produção ou sinalização parecem participar da fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (RATH *et al.*, 2009; HIRATA *et al.*, 2010).

Trabalhos recentes têm co-relacionado a redução do estresse oxidativo e o aumento da biodisponibilidade do NO com drogas inibidoras da ECA (DESIDERI *et al.*, 2008; MARTELLI *et al.*, 2009; DE LA ROSA *et al.*, 2010; XIA e LAZARTIGUES, 2010). Por outro lado, existem indícios que além de um efeito indireto na ação da bradicinina, estas drogas podem apresentar um possível efeito regulador alostérico

em receptores do tipo B1 e B2, influenciando desta forma a liberação de NO endotelial (ERDOS *et al.*, 2010) (Figura 49).

Evidências substanciais mostram a participação dos compostos polifenólicos, incluindo flavonóides como a quercetina, na inibição da ECA e na liberação e/ou prevenção da degradação do NO (GHOSH e SCHEEPENS, 2009; PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2009). Neste íterim, considerando a capacidade da ISQ em reduzir a atividade da ECA e aumentar a biodisponibilidade do NO endotelial, levounos a considerar, a direta participação do NO nos efeitos cardio-renais observados neste trabalho. Assim, quando animais normotensos foram tratados com L-NAME (um inibidor na NO sintase), ou com o ODQ (um inibidor da guanilato ciclase solúvel), os efeitos diuréticos e hipotensores observados com o HETM, TMLR ou da ISQ foram substancialmente reduzidos; da mesma forma, o tratamento prolongado com o L-NAME aboliu a atividade inibidora sobre a ECA plasmática, sugerindo uma inter-relação entre a liberação do óxido nítrico endotelial e o efeito sobre a ECA (Figura 49).

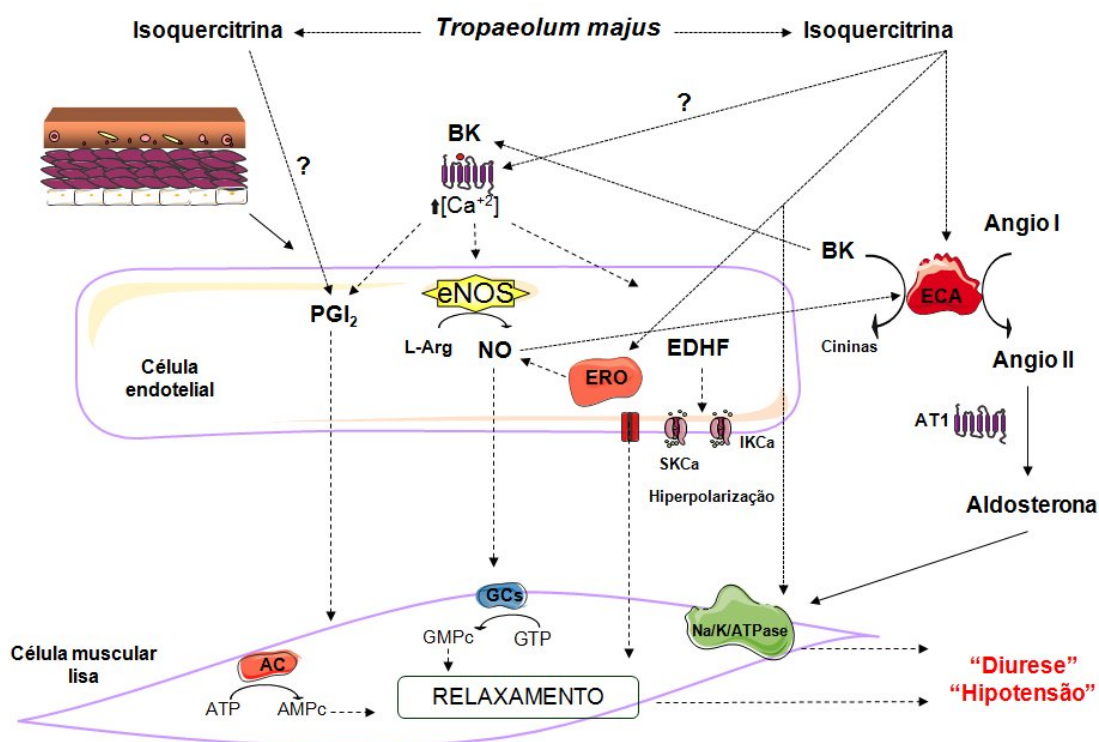


Figura 49 – Síntese dos efeitos renais e cardiovasculares evidenciados para os extratos obtidos de *T. majus* e para a isoquercitrina. Angio I: Angiotensina I; Angio II: Angiotensina II; AT1: Receptor para angiotensina II tipo AT1; Bk: Bradicina; ECA: Enzima conversora de angiotensina; PGI₂: Prostaciclina; eNOS: Óxido nítrico sintetase; NO: Óxido nítrico; EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; IKCa: Canais de potássio de média condutância sensíveis ao cálcio; SKCa: Canais de potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio; AC: Adenilato ciclase; ATP: Trifosfato de adenosina; AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina; GCs: Guanilato ciclase solúvel; GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina; GTP: Trifosfato de guanosina; Na/K/ATPase: Sódio potássio ATPase.

Em síntese, os resultados aqui apresentados sustentam a utilização popular do *T. majus* como fonte de substâncias diuréticas e hipotensoras. Além disso, estes efeitos estão associados aos altos níveis do flavonóide isoquercitrina encontrado nesta espécie. Os resultados também mostram, pela primeira vez, que as ações farmacológicas do HETM, TMLR e da isoquercitrina estão relacionadas com a habilidade destes compostos em interagirem com a via óxido nítrico/guanilato ciclase e com a enzima conversora de angiotensina (Figura 49).

Desta forma, considerando a vantagem de um efeito diurético poupador de potássio, da ausência de sinais clínicos de toxicidade e da não interferência direta com parâmetros relativos às funções renais, sugere-se que o HETM ou seus fitoderivados, após estudos complementares (vide perspectivas futuras), apresentam grande potencial para serem utilizados como terapias adicionais às drogas convencionais utilizadas para determinados transtornos cardiovasculares ou renais.

VII PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseado nos resultados descritos acima podemos tomar como hipótese alguns mecanismos farmacológicos adicionais pelo qual os extratos obtidos de *T. majus* e a ISQ podem exercer seus efeitos renais e cardiovasculares (Figura 50). Estudos posteriores serão necessários para esclarecer estes possíveis mecanismos e ajudar a confirmar ou refutar estas pospostas e, através de ensaios pré-clínicos, validar os efeitos renais e cardiovasculares desta espécie.

1. Poderia a ISQ obtida de *T. majus* exercer alguma atividade direta sobre o receptor da angiotensina do tipo 2?
2. A ativação do receptor AT2 poderia induzir a síntese de cininas (bradicinina) e influenciar os efeitos evidenciados neste trabalho?
3. A ativação do receptor AT2 poderia reduzir a atividade da bomba Na/K/ATPase e influenciar os efeitos renais observados?
4. Poderia a síntese de NO estar aumentada pela ativação da via PI3-kinase/Akt?
5. A síntese aumentada de NO poderia ser influenciada pela ativação da proteína SIRT1 com consequente desacetilação da e-NOS?
6. Os efeitos inibidores da ECA mostrados neste estudo podem ser decorrentes de uma ação direta do NO sobre esta protease?
7. A ISQ obtida de *T. majus* poderia exercer algum efeito direto sobre as metaloproteinases da matriz extracelular, ou estes efeitos são decorrentes da liberação do NO?
8. Os efeitos renais e cardiovasculares evidenciados neste trabalho pode ser decorrente de alguma ação direta da ISQ sobre as pequenas GTPases (Rho-quinases)?

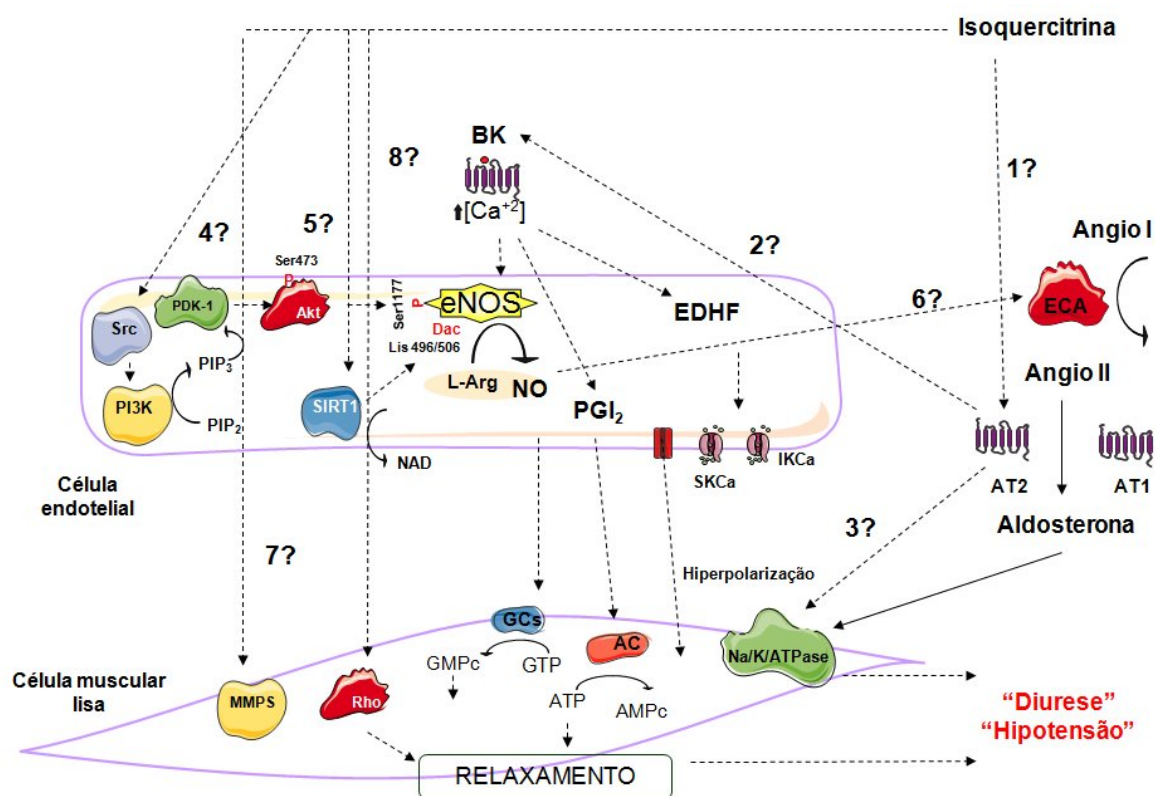


Figura 50 – Possíveis mecanismos farmacológicos para os efeitos renais e cardiovasculares evidenciados nos extratos obtidos de *T. majus* e para a isoquercitrina. Angio I: Angiotensina I; Angio II: Angiotensina II; AT1: Receptor para angiotensina II tipo AT1; AT2: Receptor para angiotensina II tipo AT2; Bk: Bradicina; ECA: Enzima convertora de angiotensina; PGI₂: Prostaciclina; eNOS: Óxido nítrico sintetase; NO: Óxido nítrico; EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; IKCa: Canais de potássio de média condutância sensíveis ao cálcio; SKCa: Canais de potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio; AC: Adenilato ciclase; ATP: Trifosfato de adenosina; AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina; GCs: Guanilato ciclase solúvel; GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina; GTP: Trifosfato de guanosina; Na/K/ATPase: Sódio potássio ATPase; MMPs: Metaloproteinases da matriz; Akt: Serina/treonina proteína quinase; Rho: Rho-cinases (pequenas GTPases); SIRT1: Proteína sirtuína tipo 1; PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase; Src: Proteína tirosina quinase Src; PDK-1: Piruvato desidrogenase quinase-1; PIP2: Bifosfato de fosfatidil inositol; PIP3: Trifosfato de fosfatidil inositol; Dac: Desatilação; Ser: Serina; Lis: Lisina; L-Arg: L-arginina; NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

VIII CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

- I. O Infuso obtido de *T. majus* parece não apresentar atividade diurética aguda significativa no modelo experimental utilizado;
- II. O extrato etanólico (HETM) obtido de *T. majus* apresenta um ou mais componentes ativos capazes de promover efeito diurético e natriurético, além de induzir uma redução na pressão arterial média em animais normotensos e SHR;
- III. A fração purificada livre de sacarose (TMLR) obtidas a partir do HETM também apresenta um ou mais componentes ativos capazes de promover efeito hipotensor e anti-hipertensivo, além de propiciar uma significativa resposta diurética;
- IV. O composto polifenólico majoritário identificado em *T. majus*, isoquercitrina (ISQ), apresenta efeito hipotensor e diurético significativo após o tratamento agudo e prolongado;
- V. A resposta diurética observada para o HETM, TMLR e ISQ parece não depender de mecanismos osmóticos, nem da inibição da enzima anidrase carbônica; e tem como característica principal um efeito natriurético e poupador de potássio;
- VI. Os efeitos diuréticos evidenciados para o HETM, TMLR e ISQ aparentam depender da inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), com conseqüente redução da aldosterona sérica e uma menor atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ renal;
- VII. Os efeitos diuréticos do HETM, TMLR e ISQ parecem ter a contribuição da inibição do metabolismo da bradicinina e da conseqüente liberação de prostaglandinas e do NO endotelial;
- VIII. As respostas hipotensoras acarretadas pelo HETM, TMLR e ISQ apresentam como característica principal um efeito paralelo e inter-relacionado com a inibição da ECA e a ativação da via NO/guanilato ciclase;
- IX. A resposta hipotensora observada com a ISQ parece não depender do antagonismo de receptores da angiotensina II;

- X. O tratamento prolongado com a isoquercitrina é capaz de aumentar a biodisponibilidade do NO corporal e reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em artérias mesentéricas de animais espontaneamente hipertensos.

IX REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTIS-GORETTA, L. *et al.* Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem*, v. 54, n. 1, p. 229-34, Jan 11 2006.

ACTIS-GORETTA, L. *et al.* Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett*, v. 555, n. 3, p. 597-600, Dec 18 2003.

ADARAMOYE, O. A. *et al.* Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. *J Ethnopharmacol*, v. 124, n. 3, p. 457-62, Jul 30 2009.

AGUIAR, J. A. Tratamento da hipertensão arterial em população de baixa renda. *Arq. Bras. Cardiol.* , v. 36, p. 301-313, 1981.

AMEER, O. Z. *et al.* Pharmacological mechanisms underlying the vascular activities of *Loranthus ferrugineus* Roxb. in rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol*, v. 127, n. 1, p. 19-25, Jan 8 2010.

ANDRADE, E. C. B. *et al.* Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n. 3, p. 591-596, 2005.

ANDRADE, J. P. *et al.* Aspectos Epidemiológicos da Aderência ao Tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica. *Arq. Bras. Cardiol.* , v. 79, n. 4, p. 375-379, 2002.

ANDRIAMBELOSON, E. *et al.* Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*, v. 120, n. 6, p. 1053-8, Mar 1997.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, v. 10 Suppl 11, p. S30-9, Jan 1999.

ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, v. 81, n. 1 Suppl, p. 317S-325S, Jan 2005.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? . *Bull. W.H.O.*, v. 79, n. 7, p.691-692, 2001. Disponível em:<[www.who.int/bulletin/archives/79\(7\)691.pdf](http://www.who.int/bulletin/archives/79(7)691.pdf)>.

AXON, R. N. *et al.* Prevalence and management of hypertension in the inpatient setting: A systematic review. *J Hosp Med*, Jul 22 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): a review between 1980 - 2000. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, n. 3, p. 421- 446, 2006.

BASTOS, D. H. *et al.* Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*, v. 12, n. 3, p. 423-32, 2007.

- BENJUMEA, D. *et al.* Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic Canary species. *J Ethnopharmacol*, v. 100, n. 1-2, p. 205-9, Aug 22 2005.
- BENNETT, W. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation. *Kluwer Academic*, v. 3rd ed Boston, p. 975-998, 1995.
- BINET, L. A biologist physician in the country. *Biol. Med.*, v. 53, n. 1, p. 5-28, 1964.
- BOORHEM, R. L. *Reader's Digest - segredos e virtudes das plantas medicinais*. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil LTDA, 1999.
- BOWN, D. *The herb Society of América – encyclopedia of herbs & their uses*. New York: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995.
- BRASIL. Portaria n. 211, de 11 set. 1981. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*, v. 119, n. 175, p. 17325-17328, 15 Set 1981.
- BRASIL. Resolução COPLAN n.º 8/88, de 8 de mar. 1988. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*, v. 126, n. 48, p. 3999-4000, 11 Mar 1988.
- BRASIL. Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em alimentos *Portaria ANVISA N.º 685, de 27 de agosto de 1998*, v. 1, p. 1-5, 1998.
- BUSNELLO, R. G. *et al.* Características associadas ao abandono do acompanhamento de pacientes hipertensos atendidos em um ambulatório de referência. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 76, p. 349-351, 2001.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, v. 87, n. 10, p. 840-4, Nov 10 2000.
- CAMARGO, M. E. *et al.* Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat. *J Ethnopharmacol*, v. 95, n. 2-3, p. 363-6, Dec 2004.
- CASTROP, H. *et al.* Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, v. 90, n. 2, p. 607-73, Apr 2010.
- CATANZARO, D. F.; FRISHMAN, W. H. Angiotensin receptor blockers for management of hypertension. *South Med J*, v. 103, n. 7, p. 669-73, Jul 2010.
- CATHARINO, R. R. *et al.* Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, v. 41, n. 2, p. 185-90, Feb 2006.
- CERIELLO, A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol*, v. 17, n. 5, p. 510-8, Oct 2006.
- CHANG, Q. *et al.* Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 59, n. 3, p. 549-55, Apr 2005.

CHAO, J. *et al.* Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biol Chem*, v. 391, n. 4, p. 345-55, Apr 2010.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-103, 1998.

CHEN, C. H. *et al.* Inhibition of angiotensin-I-converting enzyme by tetrahydroxyxanthenes isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. *J Nat Prod*, v. 55, n. 5, p. 691-5, May 1992.

CHEN, J. M. *et al.* Blood pressure lowering efficacy of beta-blockers as second-line therapy for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 1, p. CD007185, 2010.

CHERIF, S. *et al.* [A clinical trial of a titrated Olea extract in the treatment of essential arterial hypertension]. *J Pharm Belg*, v. 51, n. 2, p. 69-71, Mar-Apr 1996.

CHIEJ, R. *The MacDonald Encyclopedia of Medicinal Plants*. London: MacDold Publ, 1988.

CODY, R. J. *et al.* Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest*, v. 78, n. 5, p. 1362-74, Nov 1986.

COMINACINI, L. *et al.* Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 302, p. 679-684, 2003.

CORRÊA, A. D. *et al.* *Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica*. 4. ed. Petrópolis: Vozes, 2001.

COSTANZO, S. *et al.* Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. *Circulation*, v. 121, n. 17, p. 1951-9, May 4 2010.

CRACKOWER, M. A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, v. 417, n. 6891, p. 822-8, Jun 20 2002.

CRESTANI, S. *et al.* A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vascul Pharmacol*, v. 51, n. 1, p. 57-63, Jul 2009.

CSISZAR, A. *et al.* Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*, v. 90, n. 11, p. 1159-66, Jun 14 2002.

CUI, W. *et al.* NADPH oxidase isoforms and anti-hypertensive effects of atorvastatin demonstrated in two animal models. *J Pharmacol Sci*, v. 111, n. 3, p. 260-8, Nov 2009.

DA CUNHA, A. P. *et al.* *Plantas na terapêutica: farmacologia e ensaios clínicos*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.

DE-LA-CRUZ, H. *et al.* Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *J Ethnopharmacol*, v. 111, n. 2, p. 284-94, May 4 2007.

DE BOLD, A. J. *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, v. 28, n. 1, p. 89-94, Jan 5 1981.

DE CATERINA, A. R.; LEONE, A. M. Why beta-blockers should not be used as first choice in uncomplicated hypertension. *Am J Cardiol*, v. 105, n. 10, p. 1433-8, May 15 2010.

DE LA ROSA, A. P. *et al.* Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide*, v. 23, n. 2, p. 106-11, Sep 15 2010.

DE MARIA, A. N.; WEIR, M. R. Coxibs-beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 25, p. 41-49, 2003.

DE MEDEIROS, J. M. *et al.* Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *J Ethnopharmacol*, v. 72, n. 1-2, p. 157-65, Sep 2000.

DERER, W. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonists: inhibition of the renin angiotensin system. *MMW Fortschr Med*, v. 152, n. 6, p. 48-9, Feb 11 2010.

DESIDERI, G. *et al.* Different effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelin-1 and nitric oxide balance in human vascular endothelial cells: evidence of an oxidant-sensitive pathway. *Mediators Inflamm*, v. 2008, p. 305087, 2008.

DESTRO, M. *et al.* New strategies and drugs in the treatment of hypertension: monotherapy or combination? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, v. 5, n. 1, p. 69-81, Jan 1 2010.

DESTRO, M. W. B. *et al.* Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sanguínea. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* v. 33, n. 2, p. 107-111, 2006.

DRESSLER, W. W.; SANTOS, J. E. Social and cultural dimensions of hypertension in Brazil: a review. *Cad. Saúde Pública*, v. 16, n. 2, p. 303-315, 2000.

DRUMMOND, M.; BARROS, M. B. A. Social inequalities in adult mortality in São Paulo city. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 2, n. 1, p. 34-49, 1999.

DUARTE, J. *et al.* Effects of oleuropeoside in isolated guinea-pig atria. *Planta Med*, v. 59, n. 4, p. 318-22, Aug 1993.

EDWARDS, G. *et al.* K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, v. 396, n. 6708, p. 269-72, Nov 19 1998.

EGAN, B. M. *et al.* Does dark chocolate have a role in the prevention and management of hypertension?: commentary on the evidence. *Hypertension*, v. 55, n. 6, p. 1289-95, Jun 2010.

EL HAOUARI, M. *et al.* Antiaggregant effects of Arbutus unedo extracts in human platelets. *J Ethnopharmacol*, v. 113, n. 2, p. 325-31, Sep 5 2007.

ELTON, T. S. *et al.* Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 184, n. 2, p. 1067-73, Apr 30 1992.

EMURA, K. *et al.* Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v. 53, n. 1, p. 68-74, Feb 2007.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, v. 15, n. 8, p. 1983-92, Aug 2004.

ENKHMAA, B. *et al.* Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, v. 135, n. 4, p. 729-34, Apr 2005.

ERDOS, E. G. *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*, v. 55, n. 2, p. 214-20, Feb 2010.

ERICKSON, A. L. *et al.* Clevidipine: a short-acting intravenous dihydropyridine calcium channel blocker for the management of hypertension. *Pharmacotherapy*, v. 30, n. 5, p. 515-28, May 2010.

ERNST, M. E.; MOSER, M. Use of diuretics in patients with hypertension. *N Engl J Med*, v. 361, n. 22, p. 2153-64, Nov 26 2009.

FAGARD, R. H. Physical activity, physical fitness and the incidence of hypertension. *J Hypertens*, v. 23, n. 2, p. 265-7, Feb 2005.

FAILLI, P. *et al.* Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, v. 8, p. 32, 2009.

FARSNWORTH, N. R. Medicinal plants in therapy. *Bull W. H. O.*, v. 63, p. 956-981, 1985.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, n. 6, p. 1215-25, Jun 2006.

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

FERREIRA, R. B. G. *Crescimento, desenvolvimento e produção de flores e frutos da capuchinha em função de populações e de arranjos de plantas.* (2000). 134 f. -

Mestrado em Agronomia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2000.

FERREIRA, R. B. G. *et al.* Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 7, n. 1, p. 57-66, 2004.

FERREIRA, S. H. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, S. H. *et al.* Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol*, v. 231, n. 25, p. 237-9, Jun 23 1971.

FERRO, D. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. São Paulo: Atheneu, 2006.

FIRMO, J. O. A. *et al.* The Bambuí Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, p. 817-827, 2003.

FLORENCIO, V.; JUNIOR, V. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

FRANCISCHI, J. N. *A farmacologia em nossa vida*. 1. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

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

GALLIENI, M. *et al.* Renal effects of combined anti-hypertensive treatments. *Recenti Prog Med*, v. 101, n. 2, p. 70-7, Feb 2010.

GARLAND, J. G.; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, v. 105, n. 2, p. 429-35, Feb 1992.

GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 32, p. 677-688, 1997.

GAZDA, V. E. *et al.* Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *J Ethnopharmacol*, v. 105, n. 1-2, p. 187-95, Apr 21 2006.

GEEGANAGE, C.; BATH, P. M. Vasoactive drugs for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 7, p. CD002839, 2010.

GELEIJNSE, J. M.; HOLLMAN, P. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms? *Am J Clin Nutr*, v. 88, n. 1, p. 12-3, Jul 2008.

GELEIJNSE, J. M. *et al.* Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*, v. 75, n. 5, p. 880-6, May 2002.

GHOSH, D.; SCHEEPENS, A. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res*, v. 53, n. 3, p. 322-31, Mar 2009.

GILANI, A. H. *et al.* Gut modulatory, blood pressure lowering, diuretic and sedative activities of cardamom. *J Ethnopharmacol*, v. 115, n. 3, p. 463-72, Feb 12 2008.

GOLDSTEIN, L. B.; HANKEY, G. J. Advances in primary stroke prevention. *Stroke*, v. 37, n. 2, p. 317-9, Feb 2006.

GONZALEZ, M. *et al.* High-salt diet inhibits expression of angiotensin type 2 receptor in resistance arteries. *Hypertension*, v. 45, n. 5, p. 853-9, May 2005.

GOOS, K. H. *et al.* [Efficacy and safety profile of a herbal drug containing nasturtium herb and horseradish root in acute sinusitis, acute bronchitis and acute urinary tract infection in comparison with other treatments in the daily practice/results of a prospective cohort study]. *Arzneimittelforschung*, v. 56, n. 3, p. 249-57, 2006.

GRIFFITHS, D. W. *et al.* Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. *Phytochemistry*, v. 57, n. 5, p. 693-700, Jul 2001.

GRYGLEWSKI, R. J. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep*, v. 60, n. 1, p. 3-11, Jan-Feb 2008.

GUS, I. *et al.* Prevalência, Reconhecimento e Controle da Hipertensão Arterial Sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 83, n. 5, p. 429-433, 2004.

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, v. 252, n. 5014, p. 1813-6, Jun 28 1991.

HACKAM, D. G. *et al.* The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. *Can J Cardiol*, v. 26, n. 5, p. 249-58, May 2010.

HAN, G. Q. *et al.* The screening of Chinese traditional drugs by biological assay and the isolation of some active components. *Int J Chin Med* v. 16, p. 1-17, 1991.

HANSSON, L. *et al.* Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet*, v. 351, n. 9118, p. 1755-62, Jun 13 1998.

HERAN, B. S. *et al.* Blood pressure lowering efficacy of potassium-sparing diuretics (that block the epithelial sodium channel) for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 1, p. CD008167, 2010.

HERTOG, M. G. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, v. 342, n. 8878, p. 1007-11, Oct 23 1993.

HIGUCHI, S. *et al.* Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*, v. 112, n. 8, p. 417-28, Apr 2007.

HIRANO, T. *et al.* Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on Na⁺,K⁺-ATPase: aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. *Life Sci*, v. 45, n. 12, p. 1111-7, 1989.

HIRATA, Y. *et al.* Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Int Heart J*, v. 51, n. 1, p. 1-6, Jan 2010.

HOOPER, L. *et al.* Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, v. 88, n. 1, p. 38-50, Jul 2008.

HORISBERGER, J. D.; GIEBISCH, G. Potassium-sparing diuretics. *Ren Physiol*, v. 10, n. 3-4, p. 198-220, 1987.

HOWELL, L. *et al.* Use of herbal remedies by Hispanic patients: do they inform their physician? *J Am Board Fam Med*, v. 19, n. 6, p. 566-78, Nov-Dec 2006.

INIGUEZ, M. A. *et al.* Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem*, v. 114, n. 3, p. 201-9, Jul 2008.

IZAWA, Y. *et al.* ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*, v. 308, n. 2, p. 291-9, Aug 15 2005.

JACKSON, E. K. Drugs affecting renal and cardiovascular function. In: HARDMAN, J. C. *et al.* (Ed.). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Pergamon Press, 1996. p. 685-713.

JADHAV, R. B. *et al.* Diuretic activity of squamate mistletoe, *Viscum angulatum*. *Pharm Biol*, v. 48, n. 4, p. 417-21, Apr 2010.

JIN, X. *et al.* Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation. *Yakugaku Zasshi*, v. 130, n. 5, p. 723-8, May 2010.

JOHNS, T. *et al.* Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *J Ethnopharmacol*, v. 5, n. 2, p. 149-61, Mar 1982.

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

KADOGLOU, N. P. *et al.* Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology*, v. 56, n. 2, p. 173-89, Mar-Apr 2005.

KAMBAYASHI, Y. *et al.* Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem*, v. 268, n. 33, p. 24543-6, Nov 25 1993.

KANNEL, W. B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA*, v. 275, n. 20, p. 1571-6, May 22-29 1996.

KATZMARZYK, P. T. *et al.* Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Arch Intern Med*, v. 164, n. 10, p. 1092-7, May 24 2004.

KAU, S. T. *et al.* A method for screening diuretic agents in the rat. *J Pharmacol Methods*, v. 11, n. 1, p. 67-75, Mar 1984.

KELI, S. O. *et al.* Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*, v. 156, n. 6, p. 637-42, Mar 25 1996.

KHAZA'AI, H.; WAHLE, K. W. Effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism and prostacyclin (PGI₂) formation in human vascular endothelial cells. *Biochem Soc Trans*, v. 24, n. 2, p. 173S, May 1996.

KIM, B. H. *et al.* Distinct inhibitory mechanisms of isoquercitrin gallate and its aglycone on zymosan-induced peroxynitrite production in macrophages. *Nitric Oxide*, v. 17, n. 3-4, p. 134-42, Nov-Dec 2007.

KIM, Y. M. *et al.* Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, v. 374, n. 2, p. 228-32, Oct 30 1995.

KJAER, A. *et al.* Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. *Phytochemistry*, v. 17, p. 1285-1287, 1978.

KLARENBACH, S. W. *et al.* Identification of factors driving differences in cost effectiveness of first-line pharmacological therapy for uncomplicated hypertension. *Can J Cardiol*, v. 26, n. 5, p. e158-63, May 2010.

KUWAHARA, K.; NAKAO, K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J*, Jun 19 2010.

KWON, E. K. *et al.* Flavonoids from the buds of *Rosa damascena* inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and angiotensin I-converting enzyme. *J Agric Food Chem*, v. 58, n. 2, p. 882-6, Jan 27 2010.

LABINSKY, N. *et al.* Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem*, v. 13, n. 9, p. 989-96, 2006.

LACAILLE, D. *et al.* Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, v. 8, n. 1, p. 47-52, Jan 2001.

LAGANOVIC, M. Fixed combinations of antihypertensive medications--new opportunity in treatment of hypertension. *Lijec Vjesn*, v. 132, n. 3-4, p. 94-8, Mar-Apr 2010.

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

LESSA, I. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca e da Hipertensão Arterial Sistêmica no Brasil. *Rev. Bras. de Hipertensão*, v. 8, p. 383-392, 2001.

LESSA, I.; FONSECA, J. Raça, aderência ao tratamento e/ou consultas e controle da hipertensão arterial. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 68, p. 443-449, 1997.

LEWINGTON, S. *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 14 2002.

LI, J. *et al.* HPLC analysis and pharmacokinetic study of quercitrin and isoquercitrin in rat plasma after administration of *Hypericum japonicum* thunb. extract. *Biomed Chromatogr*, v. 22, n. 4, p. 374-8, Apr 2008.

LIMA, E. M. Avaliação de Fatores de Risco Associados com Elevação da Pressão Arterial em Crianças e Adolescentes. *Jornal de Pediatria*, v. 80, n. 1, p. 3-5, 2004.

LINZ, W. *et al.* Contribution of bradykinin to the Cardiovascular Effects of Ramipril. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 22, n. 9, p. 1-8, 1993.

LOEW, D. *Diuréticos: química, farmacología y terapéutica incluida fitoterapia*. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1991.

LORENZI, H.; DE SOUSA, H. M. *Plantas Ornamentais no Brasil*. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. *São Paulo Medical Journal*, v. 123, n. 1, p. 3-4, 2005.

LUCKSON, M. Hypertension management in older people. *Br J Community Nurs*, v. 15, n. 1, p. 17-21, Jan 2010.

LURBE, E.; TORRO, M. I. Early vascular phenotypes in the genesis of hypertension. *Pediatr Nephrol*, v. 25, n. 4, p. 763-7, Apr 2010.

LYKKESFELDT, J.; MOLLER, B. L. Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. (isothiocyanates as potent enzyme inhibitors). *Plant Physiol*, v. 102, n. 2, p. 609-613, Jun 1993.

MAEDA, Y.; INOBUCHI, T. Oxidative stress. *Nippon Rinsho*, v. 68, n. 5, p. 814-8, May 2010.

MAGHRANI, M. *et al.* Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J Ethnopharmacol*, v. 99, n. 1, p. 31-5, May 13 2005.

MAGOS, G. A. *et al.* Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*, v. 117, n. 1, p. 58-68, Apr 17 2008.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: MALONE, M. H. (Ed.). *New Natural Products and Plants with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Berlim, 1977. p. 23-53.

MARDLA, V. *et al.* Potentiation of antiaggregating effect of prostaglandins by alpha-tocopherol and quercetin. *Platelets*, v. 15, n. 5, p. 319-24, Aug 2004.

MARTELLI, A. *et al.* Pharmacodynamic hybrids coupling established cardiovascular mechanisms of action with additional nitric oxide releasing properties. *Curr Pharm Des*, v. 15, n. 6, p. 614-36, 2009.

MARTIN-HERRERA, D. *et al.* Diuretic activity of some *Withania aristata* Ait. fractions. *J Ethnopharmacol*, v. 117, n. 3, p. 496-9, May 22 2008.

MATOS, A. C.; LADEIA, A. M. Assessment of Cardiovascular Risk Factors in a Rural Community in the Brazilian State of Bahia. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 81, n. 3, p. 297-302, 2003.

MATROUGUI, K. *et al.* Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension*, v. 34, n. 4 Pt 1, p. 659-65, Oct 1999.

MERCADIER, J. J. *et al.* Atrial natriuretic factor messenger ribonucleic acid and peptide in the human heart during ontogenic development. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 159, n. 2, p. 777-82, Mar 15 1989.

MESSERLI, F. H. *et al.* Dogma disputed: can aggressively lowering blood pressure in hypertensive patients with coronary artery disease be dangerous? *Ann Intern Med*, v. 144, n. 12, p. 884-93, Jun 20 2006.

MIETKIEWSKA, E. *et al.* Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiol*, v. 136, n. 1, p. 2665-75, Sep 2004.

MILNE, J. C. *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, v. 450, n. 7170, p. 712-6, Nov 29 2007.

MION JR, D. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq. Bra. Cardiol.*, v. 82, n. 4, p. 1-14, 2004.

MOLINA, M. D. C. B. *et al.* Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 6, p. 743-749, 2003.

MONTENEGRO, M. F. *et al.* Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. *Eur J Pharmacol*, v. 607, n. 1-3, p. 173-7, Apr 1 2009.

MOTOYAMA, K. *et al.* Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. *Nutrition*, v. 25, n. 4, p. 421-7, Apr 2009.

MURPHEY, L. *et al.* Contribution of bradykinin to the cardioprotective effects of ACE inhibitors. *European Heart Journal*, v. 5, n. 37-41, 2003.

NAFTILAN, A. J. *et al.* Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, v. 83, n. 4, p. 1419-24, Apr 1989.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol*, v. 445, p. 355-67, Jan 1992.

NAYAGAM, V. M. *et al.* SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents. *J Biomol Screen*, v. 11, n. 8, p. 959-67, Dec 2006.

NDIAYE, M. *et al.* Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J*, v. 19, n. 3, p. 455-7, Mar 2005.

NDIAYE, M. *et al.* Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 310, n. 2, p. 371-7, Oct 17 2003.

NDIAYE, M. *et al.* Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol*, v. 142, n. 7, p. 1131-6, Aug 2004.

NEFF, K. M.; NAWARSKAS, J. J. Hydrochlorothiazide versus chlorthalidone in the management of hypertension. *Cardiol Rev*, v. 18, n. 1, p. 51-6, Jan-Feb 2010.

NISKANEN, L. *et al.* Inflammation, abdominal obesity, and smoking as predictors of hypertension. *Hypertension*, v. 44, n. 6, p. 859-65, Dec 2004.

NOBLAT, A. C. B. *et al.* Complicações da Hipertensão Arterial em Homens e Mulheres Atendidos em um Ambulatório de Referência. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 83, n. 4, p. 308-313, 2004.

NOEL, F.; GODFRAIND, T. Heterogeneity of ouabain specific binding sites and (Na⁺ + K⁺)-ATPase inhibition in microsomes from rat heart. *Biochem Pharmacol*, v. 33, n. 1, p. 47-53, Jan 1 1984.

NOLA, I. A. *et al.* Dietary habits and cardiovascular diseases. *Acta Med Croatica*, v. 64, n. 2, p. 89-95, May 2010.

OAK, M. H. *et al.* Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n. 6, p. 1001-7, Jun 1 2003.

OATES, J. A. Fármacos anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. In: GILMAN, A. G. (Ed.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 2003. p. 571-592.

PANIZZA, S. *Plantas que curam (cheiro de Mato)*. 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998.

PANTOJA, C. V. *et al.* Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anaesthetized dogs. *J Ethnopharmacol*, v. 31, n. 3, p. 325-31, Mar 1991.

PECHANOVA, O. *et al.* Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney. *Physiol Res*, v. 55 Suppl 1, p. S17-30, 2006.

PEREZ-VIZCAINO, F. *et al.* Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*, v. 61, n. 1, p. 67-75, Jan-Feb 2009.

PEREZ, V. F.; DUARTE, J. Flavonols: biochemistry behind cardiovascular effects. In: FRAGA, C. G. (Ed.). *Plant Phenolics and Human Health*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 197-214.

PHILLIPS, O. A. *et al.* Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *J Ethnopharmacol*, v. 104, n. 3, p. 351-5, Apr 6 2006.

PICCIARELLI, P.; ALPI, A. Embryo-suspensor of *Tropaeolum majus*: Identification of gibberellin A₆₃. *Phytochemistry*, v. 26, n. 2, p. 329-330, 1987.

PICCIARELLI, P. *et al.* Gibberellin-like activity in suspensors of *Tropaeolum majus* L. and *Cytisus laburnum* L. *Planta*, v. 162, n. 6, p. 566-568, 1984.

PIERIN, A. M. G. *et al.* O desafio do controle da hipertensão arterial e a adesão ao tratamento. In: PIERIN, A. M. G. (Ed.). *Hipertensão arterial: uma proposta para o cuidar*. São Paulo: Manole, 2004. p. 275-289.

PINTÃO, A. M. *et al.* In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Med*, v. 61, n. 3, p. 233-6, Jun 1995.

PINTÃO, A. M.; PAIS, M. S. S. Cell suspension cultures from *Tropaeolum majus* L. establishment and growth conditions. *Bioresource Technology*, v. 47, p. 143-147, 1994.

POCAS, E. S. *et al.* 2-Methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan: a new synthetic inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase with an original mechanism of action. *Biochem Pharmacol*, v. 66, n. 11, p. 2169-76, Dec 1 2003.

POWELL, J. S. *et al.* Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*, v. 245, n. 4914, p. 186-8, Jul 14 1989.

PRISTA, L. N. *et al.* *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.

QUEEN, B. L.; TOLLEFSBOL, T. O. Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci*, v. 3, n. 1, p. 34-42, Feb 2010.

QUINN, R. R. *et al.* The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part I - blood pressure measurement, diagnosis and assessment of risk. *Can J Cardiol*, v. 26, n. 5, p. 241-8, May 2010.

RATH, G. *et al.* Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *J Physiol Pharmacol*, v. 60 Suppl 4, p. 105-9, Oct 2009.

RATHEL, T. R. *et al.* Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process. *J Hypertens*, v. 25, n. 3, p. 541-9, Mar 2007.

REILLY, T.; SCHORK, M. R. Vasopressin antagonists: Pharmacotherapy for the treatment of heart failure. *Ann Pharmacother*, v. 44, n. 4, p. 680-7, Apr 2010.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC/UFRS, 2001. p. 41-62.

RENAUD, S.; GUEGUEN, R. The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp*, v. 216, p. 208-17; discussion 217-22, 152-8, 1998.

REUTER, H. D. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2. Pharmacology and Medical Application. *Phytomedicine*, v. 2, p. 73-91, 1995.

REUTER, H. D. Therapeutic effects and applications of Garlic and its preparations. In: KOCH, H. P. *et al* (Ed.). *Garlic - an introduction to the therapeutic applications of Allium sativum L.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 376.

REZENDE, D. F. *et al.* Prevalence of systemic Hypertension in Students Aged 7 to 14 Years in the Municipality of Barbacena, in the State of Minas Gerais, in 1999. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 81, n. 4, p. 381-386, 2003.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 104, n. 1048-1054, 2007.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* v. 110, p. 711-717, 2008.

ROTHWELL, P. M. Limitations of the usual blood-pressure hypothesis and importance of variability, instability, and episodic hypertension. *Lancet*, v. 375, n. 9718, p. 938-48, Mar 13 2010.

RUAN, Y. *et al.* Beta adrenergic receptor stimulated prostacyclin synthesis in rabbit coronary endothelial cells is mediated by selective activation of phospholipase D: inhibition by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 281, n. 3, p. 1038-46, Jun 1997.

SACKS, F. M.; CAMPOS, H. Dietary therapy in hypertension. *N Engl J Med*, v. 362, n. 22, p. 2102-12, Jun 3 2010.

SACRAMENTO, H. T. Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais *Jornada Catarinense de Plantas Medicinais*. Lages: Anais, 2001. p. 57-61.

SADKI, C. *et al.* Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers and *Cynodon dactylon* rhizomes extracts in rats. *J Ethnopharmacol*, v. 128, n. 2, p. 352-6, Mar 24 2010.

SAKAMOTO, T. *et al.* Contribution by bradykinin to the natriuretic response to the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn-Schumiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 350, p. 84-89, 1994.

SALGADO, C. M.; CARVALHAES, J. T. A. Arterial hypertension in childhood. *Jornal de Pediatria*, v. 79, n. 1, 2003.

SANGALLI, A. *et al.* Resíduos orgânicos e nitrogênio na produção de biomassa da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) 'jewel' *Ciênc. Agrotec.*, v. 28, n. 4, p. 831-839, 2004.

SANTA CRUZ, N. C. Avances en la investigacion de tioglicosidos em plantas del género *Tropaeolum*, actividad antibacteriana y antifungica. *Boletin de la sociedad química del Perú* v. 57, n. 4, p. 235-245, 1991.

SANTOS, A. A. C. *et al.* O Diagnóstico da Hipertensão Arterial na Criança e no Adolescente. *Pediatria*, v. 25, n. 5, p. 174-183, 2003.

SANTOS, R. A. *et al.* An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*, v. 7, n. 2, p. 244-52, Mar-Apr 1985.

SATOA, M. Association between prostaglandin E2 receptor gene and essential hypertension. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v. 77, n. 1, p. 15-20, 2007.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. L. Inhibition of the renin angiotensin system: implications for the endothelium. *Curr Diab Rep*, v. 6, n. 4, p. 274-8, Aug 2006.

SBC/SBH. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Disponível em: <http://www.sbh.org.br/documentos/index.asp>. Acesso em: 03 mar 2009. 2006.

SCALBERT, A. *et al.* Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, v. 81, n. 1 Suppl, p. 215S-217S, Jan 2005.

SCHENKEL, E. P. *et al.* *Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul, 1999.

SCHINOR, E. C. *et al.* Biological activities and chemical composition of crude extracts from *Chresta exsucca*. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 42, p. 83-90, 2006.

SCHRAMM, D. D.; GERMAN, J. B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 9, n. 10, p. 560 - 566, 1998.

SCHRAMM, D. D. *et al.* Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr*, v. 73, n. 1, p. 36-40, Jan 2001.

SCHULZ, V. *et al.* *Rational Phytotherapy*. Hedelberg: Pro, 2001.

SHI, L. *et al.* Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. *Drug Discov Today*, v. 15, n. 9-10, p. 332-41, May 2010.

SHIMOKAWA, H. *et al.* The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 28, n. 5, p. 703-11, Nov 1996.

SILVA, C. G. *et al.* In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata. *Phytomedicine*, v. 16, n. 8, p. 761-7, Aug 2009.

SIRAGY, H. M. *et al.* Increased renal vasodilator prostanoids prevent hypertension in mice lacking the angiotensin subtype-2 receptor. *J Clin Invest*, v. 104, n. 2, p. 181-8, Jul 1999.

SMET, D.; PETER, A. G. M. Herbal remedies. *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 25, p. 2046-2056, 2002.

SMITH, W. L. *et al.* Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, v. 271, n. 52, p. 33157-60, Dec 27 1996.

SOMANADHAN, B. *et al.* An ethnopharmacological survey for potential angiotensin converting enzyme inhibitors from Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, v. 65, n. 2, p. 103-12, May 1999.

SOMOVA, L. I. *et al.* Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol*, v. 84, n. 2-3, p. 299-305, Feb 2003.

SOUZA NETO, E. P. *et al.* [To understand blood pressure and heart rate variability]. *Ann Fr Anesth Reanim*, v. 22, n. 5, p. 425-52, May 2003.

SPANIER, G. *et al.* Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol*, v. 60 Suppl 4, p. 111-6, Oct 2009.

SPARRE, B. Tropaeoláceas. In: REITZ, R. (Ed.). *Flora Illustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. Cap.26.

STANIC, G.; SAMARZIJA, I. Diuretic activity of *Satureja montana* subsp. *Montana* extracts and oil in rats *Phytother Res*, v. 7, n. 5, p. 363-366, 1993.

STOCLET, J. C. *et al.* Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol*, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, Oct 1 2004.

STRANGES, S. *et al.* Relationship of alcohol drinking pattern to risk of hypertension: a population-based study. *Hypertension*, v. 44, n. 6, p. 813-9, Dec 2004.

STRIJDOM, H. *et al.* Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr*, v. 20, n. 5, p. 303-10, Sep-Oct 2009.

TASHIAN, R. E. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and functions. *Bioessays*, v. 10, p. 189-191, 1989.

TERASHIMA, M. *et al.* Impact of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species on coronary arterial remodeling: a comparative intravascular ultrasound and histochemical analysis of atherosclerotic lesions. *Circ Cardiovasc Interv*, v. 2, n. 3, p. 196-204, Jun 2009.

TIRAPELLI, C. R. *et al.* Mechanisms underlying the vascular actions of endothelin 1, angiotensin II and bradykinin in the rat carotid. *Pharmacology*, v. 84, n. 2, p. 111-26, 2009.

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

TOUYZ, R. M. *et al.* Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*, v. 17, n. 7, p. 907-16, Jul 1999.

TOVCHIGA, O. V.; SHTRYGOL, S. Effect of medicinal plants on the excretory renal function (a review). *Eksp Klin Farmakol*, v. 72, n. 3, p. 50-9, May-Jun 2009.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

TYLER, V. E. Phytomedicines: back to the future. *J Nat Prod*, v. 62, p. 1589-1592, 1999.

UEMASU, J. *et al.* Suppression of plasma endothelin-1 level by alpha-human atrial natriuretic peptide and angiotensin converting enzyme inhibition in normal men. *Life Sci*, v. 53, n. 11, p. 969-74, 1993.

UEMURA, S. *et al.* Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res*, v. 88, n. 12, p. 1291-8, Jun 22 2001.

UMAROVA, F. T. *et al.* Inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase by flavonoids and their inotropic effect. Investigation of the structure-activity relationship. *Membr Cell Biol*, v. 12, n. 1, p. 27-40, 1998.

VANE, J. R. *et al.* Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, v. 323, n. 1, p. 27-36, Jul 5 1990.

VANE, J. R. *et al.* Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 38, p. 97-120, 1998.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J*, v. 67, n. 7, p. 572-5, Jul 2003.

VANHOUTTE, P. M. *et al.* Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*, v. 144, n. 4, p. 449-58, Feb 2005.

VASAN, R. S. *et al.* Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*, v. 358, n. 9294, p. 1682-6, Nov 17 2001.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. Capuchinha. In: EMBRAPA (Ed.). *Plantas Medicinais Codimentares e Aromáticas*. Corumbá: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

VICHANOVA, S. A. *et al.* Essential oil as a source of new antifungal preparations. *Phytochemistry*, v. 27, p. 1993-1998, 1972.

VITOR, R. F. *et al.* Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol*, v. 93, n. 2-3, p. 363-70, Aug 2004.

VLKOVICOVA, J. *et al.* Dual effect of polyphenolic compounds on cardiac Na⁺/K⁺-ATPase during development and persistence of hypertension in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 87, n. 12, p. 1046-54, Dec 2009.

WANG, R. Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney Int*, v. 76, n. 7, p. 700-4, Oct 2009.

WANG, Y. *et al.* [Ca²⁺]_i and PKC- α are involved in the inhibitory effects of Ib, a novel nonpeptide AngiotensinII subtype AT1 receptor antagonist, on AngiotensinII-induced vascular contraction in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 364, n. 1, p. 118-23, Dec 7 2007.

WARGO, K. A.; BANTA, W. M. A comprehensive review of the loop diuretics: should furosemide be first line? *Ann Pharmacother*, v. 43, n. 11, p. 1836-47, Nov 2009.

WEBB, A. J. *et al.* Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, v. 375, n. 9718, p. 906-15, Mar 13 2010.

WEXLER, R.; AUKERMAN, G. Nonpharmacologic strategies for managing hypertension. *Am Fam Physician*, v. 73, n. 11, p. 1953-6, Jun 1 2006.

WHELTON, A.; HAMILTON, C. W. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: effects on kidney function. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 31, p. 588-598, 1991.

WHO. Environmental Health Criteria *Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals*. Geneva, 1978.

WHO. Pharmacy-Based Hypertension Management Model: Protocol and Guidelines. *A joint CINDI/EuroPharm Forum project*, 2005.

WIELANEK, M.; URBANEK, H. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v. 86, p. 177–186, 2006.

WILDMAN, R. P. *et al.* Alcohol intake and hypertension subtypes in Chinese men. *J Hypertens*, v. 23, n. 4, p. 737-43, Apr 2005.

WILLIAMS, B. *et al.* British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. *BMJ*, v. 328, n. 7440, p. 634-40, Mar 13 2004.

WRIGHT, C. I. *et al.* Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *J Ethnopharmacol*, v. 114, n. 1, p. 1-31, Oct 8 2007.

WRIGHT, H. M.; MALIK, K. U. Prostacyclin formation elicited by endothelin-1 in rat aorta is mediated via phospholipase D activation and not phospholipase C or A2. *Circ Res*, v. 79, n. 2, p. 271-6, Aug 1996.

XIA, H.; LAZARTIGUES, E. Angiotensin-converting enzyme 2: central regulator for cardiovascular function. *Curr Hypertens Rep*, v. 12, n. 3, p. 170-5, Jun 2010.

XU, S.; LEVINE, M. Medical residents' and students' attitudes towards herbal medicines: a pilot study. *Can J Clin Pharmacol*, v. 15, n. 1, p. e1-4, Winter 2008.

XUE, B. *et al.* Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats. *Phytomedicine*, v. 15, n. 9, p. 759-62, Sep 2008.

YAMAGISHI, S. Calcium antagonists: current and future applications based on new evidence. Calcium antagonists and diabetes. *Clin Calcium*, v. 20, n. 1, p. 77-82, Jan 2010.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source another variation of the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, p. 4451-4459, 1984.

YE, M. *et al.* Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, v. 18, n. 1, p. 82-91, Jan 2007.

YUHKI, K. *et al.* Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int Angiol*, v. 29, n. 2 Suppl, p. 19-27, Apr 2010.

YUNG, L. M. *et al.* Tea polyphenols benefit vascular function. *Inflammopharmacology*, v. 16, n. 5, p. 230-4, Oct 2008.

ZANETTI, G. D. *et al.* Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). *IHERINGIA Sér. Bot.*, v. 59, n. 2, p. 173-178, 2004.

ZANETTI, G. D. *et al.* Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 22, n. 2, p. 159-62, 2003.

ZANUTTO, B. S. *et al.* Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. *Biomed Eng Online*, v. 9, p. 4, 2010.

ZARZUELO, A. *et al.* Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*, v. 57, n. 5, p. 417-9, Oct 1991.

ZHAI, P. *et al.* Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *J Clin Invest*, v. 115, n. 11, p. 3045-56, Nov 2005.

ZHANG, G. *et al.* Diuretic activity and kidney medulla AQP1, AQP2, AQP3, V2R expression of the aqueous extract of sclerotia of *Polyporus umbellatus* FRIES in normal rats. *J Ethnopharmacol*, v. 128, n. 2, p. 433-7, Mar 24 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population-based sample: the Strong Heart Study. *Hypertension*, v. 47, n. 3, p. 410-4, Mar 2006.

ZHU, M. *et al.* Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein? *Phytochemistry*, v. 44, n. 3, p. 441-7, Feb 1997.