

SANDRA CRESTANI

EFEITOS DAS FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS DA *Maytenus ilicifolia*
Mart. ex Reissek (Celastraceae) SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE
RATOS.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Consuelo A. Marques
Co-Orientador: Prof^o Dr. José Eduardo da Silva Santos

Co-Orientadora: Dr^a Cândida Aparecida Leite Kassuya

**CURITIBA
2008**

Ao meu pai (Luiz Valmir) e minha mãe (Ione), pelo carinho, incentivo, amor e dedicação em todos os momentos de minha vida, sem vocês eu não seria quem sou.

À minha irmã (Silvânia), em alguns momentos minha companheira de finais de semana longos no laboratório e minha eterna amiga. Meu cunhado (Paulo) que compreendeu a importância de tudo e abriu mão da companhia da esposa. Meu amado sobrinho (Luiz Paulo) que mesmo sem entender muitas coisas, me forneceu algo muito importante, seu sorriso e carinho.

Ao meu marido Danilo que mesmo achando que estava difícil ou às vezes, sem entender o porque de tudo, sempre me apoiou e me acompanhou nos experimentos, trocas e pesagens de ratos quando precisei, abrindo mão de seus feriados, finais de semana e às vezes de seu próprio trabalho em prol da realização desse estudo.

Agradecimentos

A Deus por ter me dado força e coragem para nunca desistir, por ter iluminado meus pensamentos para que eu sempre 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 orientadora, pelo acompanhamento e ensinamentos científicos, pela dedicação e paciência que sempre teve para comigo, mesmo estando assoberbada de compromissos e reuniões.

Ao professor Dr. José Eduardo da Silva Santos pelas valorosas sugestões e correções, pelo apoio, paciência e confiança. Por me ensinar que é preciso mais do que fazer experimento, é preciso pensar como pesquisador, espero que um dia eu consiga.

À Cândida Kassuya, que chegou ao departamento durante a produção deste trabalho, mas me "adotou" e me ajudou sempre que precisei, até mesmo nos finais de semana.

Ao professor Dr. Marcelo Iacomini (Depto. De Bioquímica - UFPR) por permitir a parceria para o estudo das frações da *M. ilicifolia* e pelo fornecimento do material fitoquímico.

Ao Thales Ricardo Cipriani, pela atenção, dedicação e empenho na obtenção dos extratos e frações da *M. ilicifolia*.

À Yanna, minha "irmãzinha científica" pelo carinho e desprendimento que me dedicou sempre que a procurei e por ter me ajudado em momentos super difíceis, mesmo que o assunto não estivesse ligado à dissertação, sua amizade foi fundamental para o término deste trabalho.

À Silvia pelo sorriso acolhedor, pela atenção e pela precisão infalível nas pesagens.

À Lindacir e Nair pelos muitos auxílios prestados.

À Alessandra pelas gargalhadas que tornavam impossível não rir também. E à Cristina pelo modo sempre gentil e educado que sempre respondeu aos questionamentos.

Aos funcionários do biotério, Cândido, Dona Teresa e principalmente Luiz pelos inúmeros auxílios prestados.

A Farmácia Bula Verde pela doação do propranolol utilizado neste trabalho. E a Daniela que intermediou tal doação.

Ao professor Aleksander Roberto Zamprônio e professora Daniela de Almeida Cabrini pelas sugestões e pela concessão do azul de metileno.

Aos meus colegas de laboratório, Kelly, Daniela, Laryssa e Elisangela, por dividirem comigo bons e maus momentos.

À Angelita (professora e Diretora) e Neiva (professora e vice-diretora da Escola Estadual Lúcia Bastos - Ensino Fundamental) por me apoiarem em todos os momentos, mesmo que isto as expusesse, e principalmente por terem sido minhas amigas incondicionais. Vocês são as "chefas" que pedi a Deus.

Aos meus colegas de Escola, que durante estes dois anos me permitiram identificar quais são meus verdadeiros amigos e, estes sempre estiveram comigo.

Aos alunos da Escola Estadual Lúcia Bastos - Ensino Fundamental por seu carinho e paciência durante este período, mesmo que não entendessem o motivo de algumas coisas.

A todos os meus colegas de mestrado que de alguma forma contribuíram para tornar os dias no laboratório menos cansativos.

Aos animais meu respeito e gratidão.

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

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver.
[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito,
não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser,
mas, graças a Deus, não sou o que eu era.[...]"*

Martin Luther King

SUMÁRIO

	Lista de Tabelas.....	i
	Lista de Abreviaturas.....	ii
	Lista de Figuras.....	iv
	Resumo.....	v
	Abstract.....	vii
I –	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hipertensão arterial : dados epidemiológicos, tratamento e importância da descoberta de novas opções terapêuticas.....	6
1.2.1	Endotélio vascular e o controle do tônus vascular.....	11
1.2.1.1	A participação do óxido nítrico no controle da pressão arterial.....	12
1.2.1.2	Participação dos canais de Potássio (K ⁺) no controle da pressão arterial.....	14
1.3	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart ex Reissek	18
II –	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
III –	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Material Botânico.....	24
3.2	Frações semi-purificadas da <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek.....	24
3.3	Obtenção das frações semi-purificadas da <i>M. ilicifolia</i>	25
3.4	Drogas e sais.....	26
3.5	Animais.....	27
3.6	Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados.....	28
3.7	PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.7.1	Efeito das frações semi-purificadas da <i>M.ilicifolia</i> sobre os níveis pressóricos de ratos normotensos.....	29
3.7.2	Avaliação dos efeitos do SEEA sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de fenilefrina.....	30
3.7.3	Estudo do envolvimento do nervo vago no efeito do SEEA da <i>M.</i>	

	<i>ilicifolia</i> sobre a pressão arterial de ratos normotensos.....	30
3.7.4	Estudo do envolvimento dos receptores muscarínicos e β -adrenérgicos no efeito hipotensor da <i>M. ilicifolia</i> em ratos normotensos.....	31
3.7.5	Avaliação dos efeitos do SEEA ou FAE sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME ou azul de metileno.....	31
3.7.6	Investigação do envolvimento dos canais de Potássio na Hipotensão causada pela fração SEEA e fração acetato de etila (FAE).....	32
3.8	Análise dos resultados e testes estatísticos.....	33
IV –	RESULTADOS	34
4.1	Efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da infusão de <i>M. ilicifolia</i> em ratos anestesiados.....	34
4.2	Efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da <i>M. ilicifolia</i> em ratos anestesiados.....	36
4.3	Ação hipotensora do SEEA em ratos infundidos com fenilefrina.....	37
4.4	Efeito da transmissão vagal na ação hipotensora do SEEA em ratos anestesiados.....	38
4.5	O efeito hipotensor do SEEA em ratos anestesiados não envolve os receptores β -adrenérgicos e os receptores muscarínicos.....	39
4.6	Participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase na hipotensão causada pelo SEEA.....	42
4.7	Envolvimento dos canais de potássio na hipotensão causada pelo SEEA.....	46
4.8	Efeito hipotensor da fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE) derivadas do SEEA.....	52
4.9	Participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase no efeito hipotensor da fração acetato de etila.....	54
4.10	Participação dos canais de Potássio na hipotensão causada pela FAE.	56
V –	DISCUSSÃO	59
VI –	CONCLUSÕES	73
VII–	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE TABELAS

1	Efeito do SEEA na ausência e na presença do TEA (360 $\mu\text{mol/kg}$).....	46
2	Efeito do SEEA na ausência e na presença de 4-aminopiridina (2 $\mu\text{mol/kg}$).....	48
3	Efeito do SEEA na ausência e na presença de glibenclamida (40 $\mu\text{mol/kg}$).....	50
4	Efeito do FAE na ausência e na presença do TEA (360 $\mu\text{mol/kg}$).....	58
5	Efeito do FAE na ausência e na presença da 4-Aminopiridina (2 $\mu\text{mol/kg}$)....	58
6	Efeito do FAE na ausência e na presença da glibenclamida (40 $\mu\text{mol/kg}$).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	– 4-Aminopiridina
ACh	– Acetilcolina
ADH	– Hormônio Antidiurético
AM	– Azul de metileno
AMPc	– Monofosfato Cíclico de Adenina
Ang II	– Angiotensina II
ANOVA	– Análise de variância
ATP	– Adenosina trifosfato
AT ₁	– Receptor para angiotensina II tipo AT ₁
AVCs	– Acidentes vasculares cerebrais
CHCl ₃	– Clorofórmio
CO ₂	– Dióxido de carbono
DAG	– Diacilglicerol
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DOCA-salt	– Acetato desoxicorticosterona
ECA	– Enzima conversora de angiotensina
EDHF	– Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
ETOH	– Etanol 3 volumes
FAE	– Fração acetato de etila
FAQ	– Fração aquosa
GCs	– Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	– Monofosfato ciclico de guanosina
GTP	– Trifosfato de Guanosina
H ⁺ -K ⁺ -ATPase	– Hidrogênio Potássio ATPase
H ₂ O	– Água
IP ₃	– Trifosfato de Inositol
K ⁺	– Potássio
K _{2p}	– Canais de potássio com domínio de dois poros
K _{ATP}	– Canais de potássio sensíveis ao ATP
K _{Ca}	– Canais de potássio ativados por cálcio

K _{IR}	– Canais de potássio de influxo retificante
K _V	– Canais de potássio dependentes de voltagem
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	– N- ^ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester
MeOH	– Metanol
MLCK	– Quinase da cadeia leve de miosina
Na ⁺	– Sódio
NADP	– Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NO	– Óxido Nítrico
NOS	– Óxido Nítrico sintase
eNOS	– Óxido Nítrico Sintase Endotelial
iNOS	– Óxido Nítrico sintase induzida
nNOS	– Óxido Nítrico sintase neuronal
O ₂	– Oxigênio
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PNA	– Peptídeo Natriurético Atrial
PAM	– Pressão Arterial Média
EDCFs	– Fatores de Contração Derivados do Endotélio
PGs	– Prostaglandinas
PGI ₂	– Prostaciclina
PIP ₂	– Fosfatidil-Inositol-Bifosfato
PKA	– Proteína quinase A
PKG	– Proteína quinase G
PLC	– Fosfolipase C
PNA	– Peptídeo Natriurético Atrial
PPT	– Precipitado
SEEA	– Sobrenadante Etanólico da Extração Aquosa
SEI	– Sobrenadante Etanólico da Infusão
TEA	– Tetraetilamônio
TXA ₂	– Tromboxano A ₂

LISTA DE FIGURAS

1	Exemplar da <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek (Celastraceae).....	19
2	Fluxograma do processo de obtenção das frações da <i>Maytenus ilicifolia</i>	26
3	Efeito hipotensor da fração sobrenadante etanólico da infusão em ratos anestesiados.....	35
4	Efeito hipotensor da fração SEEA sobre os níveis pressóricos de ratos anestesiados.....	36
5	Efeito hipotensor do SEEA na presença da fenilefrina (agonista α_1).....	38
6	Ação hipotensora do SEEA antes e após a secção bilateral do nervo vago em ratos normotensos anestesiados.....	39
7	Efeito hipotensor do SEEA na presença e na ausência de antagonista β -adrenérgico e antagonista muscarínico.....	41
8	Efeito hipotensor do SEEA na presença do L-NAME (inibidor da NO sintase).....	43
9	Efeito hipotensor do SEEA na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel.....	45
10	Efeito hipotensor do SEEA na presença do bloqueador, não seletivo, de canais de potássio.....	47
11	Efeito hipotensor do SEEA na presença do bloqueador de canais de potássio operados por voltagem.....	49
12	Ação do SEEA na presença de bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP.....	51
13	Efeito hipotensor da fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE) derivadas do SEEA em ratos anestesiados.....	53
14	Efeito hipotensor da fração aquosa (FAQ) derivada do SEEA em ratos anestesiados.....	55
15	Ação do FAE na presença de bloqueadores de canais de potássio.....	57

RESUMO

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek conhecida popularmente como espinheira santa, é utilizada para tratar diversos males, como por exemplo problemas gástricos. Há relatos populares do seu uso para tratar hipertensão, porém estes não estão descritos na literatura. Neste trabalho, avaliamos a ação das frações semipurificadas, sobrenadante etanólico da infusão (SEI-dados não mostrados), sobrenadante etanólico da extração aquosa (SEEA), fração aquosa (FAQ-dados não mostrados), fração acetato de etila (FAE), obtidas a partir das folhas da *M. ilicifolia*, sobre a pressão arterial de ratos normotensos anestesiados. O SEEA, nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg (i.v.), reduziu a PAM de forma dependente da dose em $5,8 \pm 1,3$, $16,2 \pm 2,5$, $23,7 \pm 3,2$ e $52,6 \pm 5,5$ mmHg (PAM basal = $109,4 \pm 2,4$ mmHg; $n = 6$). O SEEA foi capaz de reduzir a PAM mesmo em animais com os níveis pressóricos elevados pela infusão contínua de fenilefrina (20 nmol/kg/min). A hipotensão causada pelo SEEA (5, 10 e 30 mg/kg nestes animais foi de $2,0 \pm 0,8$, $14,9 \pm 2,8$ e $30,0 \pm 2,6$ mmHg ($n = 6$). A queda na pressão arterial causada pelo SEEA não foi alterada pela secção bilateral do nervo vago, nem pelo pré-tratamento dos animais com propranolol (1,5 mg/kg, i.v., um bloqueador de receptores beta-adrenérgicos), ou atropina (1 mg/kg, i.v.; um antagonista de receptores muscarínicos). A hipotensão causada pelo SEEA (30 mg/kg, i.v.) foi reduzida em 82,3% em animais infundidos com L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase; 7 mg/kg/min) e 56,5% em animais infundidos com azul de metileno (150 nmol/kg/min). Nesses mesmos animais o efeito hipotensor gerado pela nitroglicerina (um doador de óxido nítrico 10, 30 e 90 µg/kg, i.v.), permaneceu inalterado (dados não mostrados). A administração prévia de tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canais de potássio; 360 µmol/kg, i.v.), 4-aminopiridina (bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de voltagem; 2 µmol/kg, i.v.), ou glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP; 40 µmol/kg; i.v.), reduziu a ação hipotensora do SEEA (30 mg/kg) em aproximadamente 80, 60 e 50%, respectivamente. As doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg da FAQ reduziram dos níveis pressóricos em $14,2 \pm 1,8$, $15,9 \pm 2,4$, $22,8 \pm 1,3$ e $28,9 \pm 7,2$ mmHg, respectivamente (PAM basal = $109,5 \pm 2,5$ mmHg). A FAE nas doses de 5, 10, 20

e 30 mg/kg foi capaz de causar hipotensão de $5,2 \pm 1,2$ e $16,6 \pm 4,1$ $40,8 \pm 5,7$ e $114,3 \pm 7,1$ mmHg. As duas maiores doses da FAE foram capazes de provocar uma hipotensão duas vezes maior do que as mesmas doses do SEEA. Assim como o SEEA, a FAE teve seus efeitos hipotensores inibidos pelo L-NAME, azul de metileno e bloqueadores de canais de potássio (TEA, 4-aminopiridina e glibenclamida). Este estudo mostra que a espécie vegetal *M. ilicifolia* têm um ou mais componentes capazes de reduzir a pressão arterial de ratos normotensos. Nossos resultados indicam que os mecanismos responsáveis pela ação hipotensora das frações semi-purificadas SEEA e FAE envolvem a ativação da enzima óxido nítrico sintase, a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel e a abertura de canais de potássio.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek known popularly as *Espinheira Santa*, is popularly used to treat several diseases, and among them gastric problems. There are popular reports of its use to treat hypertension, however these are not described in the literature. In this work, we evaluated the effects of the semi purified fractions of the extract of *M. ilicifolia*: ethanolic supernatant of the infusion (SEI), ethanolic supernatant from aqueous extraction (SEEA), aqueous fraction (FAQ) and fraction ethyl acetate (FAE) of *M. ilicifolia* on the blood pressure of anesthetized normotensive rats. The intravenous (i.v.) injection of SEI (5, 10, 20 and 30 mg/kg) reduced the mean blood pressure (MAP) in 5.9 ± 1.6 , 18.4 ± 1.4 , 21.5 ± 2.1 and 22.1 ± 2.8 mmHg, respectively, compared to basal MAP (110.0 ± 4.6 mmHg; $n = 6$). SEEA, in the doses of 5, 10, 20 and 30 mg/kg (i.v.) reduced MAP, compared to basal (109.4 ± 2.4 mmHg; $n = 6$) in a dose-dependent way, respectively 5.8 ± 1.3 , 16.2 ± 2.5 , 23.7 ± 3.2 and 52.6 ± 5.5 mmHg. SEEA was capable to reduce MAP in animals with high blood pressure levels due to the continuous infusion of phenylefrine (20 nmol/kg/min). Blood pressure reduction caused by SEEA (5, 10 and 30 mg/kg) in these animals was 2.0 ± 0.8 , 14.9 ± 2.8 and 30.0 ± 2.6 mmHg ($n = 6$), respectively. The fall in the blood pressure caused by SEEA was neither affected by bilateral section of the vagus nerve, nor by the pre-treatment of the animals with the β -receptor blocker propranolol (1.5 mg/kg, i.v.) or with the muscarinic receptor antagonist atropine (1 mg/kg, i.p.). The hypotension caused by SEEA (30 mg/kg, i.v.) was reduced in animals infused with L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor, 7 mg/kg/min) in 82.3% or methylene blue (an guanylate cyclase inhibitor, 150 nmol/kg/min) in 56.7%. In those animals, the hypotensive effect induced by the nitroglycerine (a nitric oxide donor, 10, 30 and 90 μ g/kg, i.v.), remained unaffected bay L-NAME infusion. The previous administration of tetraethylammonium (TEA, a non-selective potassium channel blocker, 360 μ mol/kg, i.v.), 4-aminopiridine (a selective voltage-sensitive potassium channel, 2 μ mol/kg, i.v.), or glibenclamide (a selective ATP-sensitive potassium channel, 40 μ mol/kg; i.v.), reduced the hypotensive effect of SEEA (30 mg/kg) approximately 80, 60 and 50%, respectively. The doses of 5, 10, 20 and 30 mg/kg of FAQ reduced of the levels pressóricos in $14,2 \pm 1.8$, 15.9 ± 2.4 , $22.8 \pm$

1.3 and 28.9 ± 7.2 mmHg, respectively (basal PAM = 109.5 ± 2.5 mmHg). FAE in the doses of 5, 10, 20 and 30 mg/kg was capable to cause hypotension of 5.2 ± 1.2 and 16.6 ± 4.1 40.8 ± 5.7 and 114.3 ± 7.1 mmHg. The two larger doses of FAE were capable to provoke a hypotension twice larger than the same doses of SEEA. As well as SEEA, FAE had their effects hypotensors inhibited by L-NAME, metileno blue and blocking of potassium channels (TEA, 4-aminopiridine and glibenclamide). This study shows that the vegetable species *M. ilicifolia* have an or more components capable to reduce the blood pressure of mice normotensos. Our results indicate that the responsible mechanisms for the action hypotensor of the semi-purified fractions SEEA and FAE involve the activation of the enzyme oxide nítric sintase, the stimulation of the enzyme soluble cyclase guanilato and the opening of potassium channels.

I. INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais para tratamento e cura de doenças remonta ao início da civilização. Essa prática milenar ultrapassou todos os obstáculos no processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recursos terapêuticos (DI STASI, 1996).

Registros comprovam que há mais de 2600 anos os chineses, os egípcios, os gregos e os romanos conheciam várias formas de preparações de medicamentos e elaboravam seus insumos por meio de extrações de diversas plantas. Ao longo do tempo, as plantas adquiriram grande importância na medicina popular devido as suas propriedades e passaram a ser utilizadas principalmente dentro de um contexto cultural, na medicina popular, muitas vezes como única opção pelas populações mais carentes, ou na Fitoterapia (seguindo prescrição médica), como opção alternativa nos países mais ricos e desenvolvidos (REIS *et al*, 2003).

Por volta de 1803, Seturner conseguiu isolar a morfina, o primeiro princípio ativo extraído de uma planta, a *Papaver somniferum*, popularmente conhecida como papoula. Até hoje é um potente analgésico opióide, amplamente utilizado na clínica. Desde essa época, as atividades farmacológicas foram se especializando cada vez mais e as plantas se tornaram importantes fontes de novas estruturas químicas a serem usadas pela indústria farmacêutica (CORDELL, 2000; REIS *et al*, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, utilizam

algum tipo de vegetal na atenção primária à saúde (MARTINS, 2000), sendo que destes, 30% são por indicação médica. Também se constatou que em torno de 25% das prescrições aviadas nas farmácias dos Estados Unidos, continham ao menos um ingrediente ativo derivado de planta (TRENTINI e YAMADA, 2001). O restante da população de todo mundo (cerca de 20%), habita principalmente os países desenvolvidos e, são responsáveis pelo consumo de 85% dos medicamentos industrializados disponíveis no mercado. No Brasil, 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

O uso de plantas no tratamento de doenças no Brasil apresenta influências da cultura indígena, africana e europeia. Essas influências formam a base da medicina popular brasileira. “Em geral o conhecimento popular é desenvolvido por grupamentos culturais que ainda convivem intimamente com a natureza, observando-a de perto no seu dia-a-dia e, explorando suas potencialidades, mantendo vivo e crescente esse patrimônio pela experimentação sistemática e constante” (ELISABETSKY, 1997). A ciência procura aproveitar essas práticas por meio de levantamentos das informações obtidas tanto pela etnobotânica, como pela etnofarmacologia. Entretanto, as plantas utilizadas só passam a ter um valor agregado e podem ser consideradas como plantas medicinais após a realização de pesquisas que validem o seu uso popular, pela demonstração científica da sua eficácia e a determinação da sua segurança (toxicidade tolerável).

De acordo com a OMS, o consumo de plantas medicinais é especialmente elevado em alguns países. Na China, do total de medicamentos consumidos, cerca de 30-50% é de origem vegetal. Na Europa e América do Norte, 50% da

população já fez uso de fitoterápicos. Na Alemanha, 90% das formulações farmacêuticas contém algum componente de origem vegetal (WHO, 2003).

Muitos dos fármacos utilizados atualmente na terapêutica são oriundos de compostos obtidos de plantas medicinais. Dentre eles podem ser citados: (i) ácido acetilsalicílico que foi sintetizado por Kolbe em 1897, a partir da salicina, substância ativa da *Salix alba* L (salgueiro), ainda hoje utilizada como analgésico, antipirético e antiinflamatório (ESPERIDIÃO *et al.*, 1998); (ii) a morfina, um dos analgésicos opióides mais potentes, isolado da *Papaver somniferum* por Seturner em 1803; (iii) a cocaína isolada da *Erytroxylon coca*, utilizada no passado como anestésico local e que continua tendo seu potencial terapêutico avaliado na atualidade, apesar de seu uso como droga de abuso (FERREIRA *et al.*, 2001); e (iv) a tubocurarina, isolada da *Chondodendron tomentosum*, usada como bloqueador neuromuscular (VIEGAS JR. *et al.*, 2006). Todas essas e outras descobertas permitiram a terapêutica atual, o conhecimento dos anestésicos locais, bloqueadores neuromusculares, e dos anticolinesterásicos, dentre outras categorias terapêuticas (SIMÕES, 2001).

A Fitoterapia é uma forma de terapia medicinal em notável crescimento, cujo mercado mundial movimenta cerca de 22 bilhões de dólares, do qual o Brasil participa com cerca de 23% (YUNES *et al.*, 2001). Os fitoterápicos têm sido o suporte da indústria farmacêutica nacional de pequeno e médio porte, com um crescimento do mercado de aproximadamente 15% ao ano (REIS *et al.*, 2003).

Considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais bioativos é muito superior àquela derivada dos processos de síntese. Além disso, como

produtos de organismos vivos, possuem similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais àquelas a eles associadas (NISBET & MOORE, 1997).

Segundo CALIXTO (2001), o uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece as seguintes vantagens: 1) existência de uma grande quantidade de estruturas químicas; 2) muitas classes de estruturas homólogas; 3) existência de estruturas químicas bi e tridimensionais; 4) possibilidade de utilização como banco de moléculas para *screenings* de alta capacidade; 5) economia e 6) fonte de novas moléculas para alvos moleculares complexos.

A imensa biodiversidade da flora brasileira, abrangendo cerca de 25% das espécies vegetais encontradas no mundo, faz do Brasil uma fonte em potencial de plantas medicinais e exóticas, criando um campo comercial a ser explorado (MALUENDAS e PEITZ, 2004).

Nos últimos anos o interesse por terapias naturais tem crescido espantosamente, tanto em países considerados de terceiro mundo como em países desenvolvidos. Porém, há uma falsa idéia de que fármacos oriundos de plantas não apresentam efeitos tóxicos ou colaterais e, portanto são extremamente seguros. Atualmente sabe-se que as plantas têm centenas de metabólitos secundários e alguns deles têm toxicidade elevada. Dentre esses temos muitas drogas antineoplásicas, os digitálicos, a efedrina, os ésteres de forbol, a estricnina, os curares e os heterosídeos cianogênicos. Um dos maiores problemas para se detectar a toxicidade em humanos é o número reduzido de relatos das ocorrências e a associação causa/efeito; isso faz com que os efeitos tóxicos dos produtos naturais sejam aparentemente menores em relação aos dos

alopáticos (D'ARCY, 1993; DREW & MYERS, 1997; BAGHERI *et al.*, 1998; CALIXTO, 2000). Portanto, a validação das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros não pode ser feita somente com base no conhecimento e usos populares. Por isso, a autorização oficial do uso de plantas medicinais como medicamento precisa ser fundamentada em dados experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que demonstrem que os benefícios obtidos a partir do uso de drogas de origem vegetal são superiores aos riscos que eles oferecem àqueles que os utilizam (BRASIL, 1995).

No departamento de Farmacologia da UFPR, o grupo de pesquisa “Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Naturais”, desenvolve estudos com o objetivo de validar plantas medicinais utilizadas popularmente com base em informações etnofarmacológicas e etnobotânicas, através da demonstração de sua eficácia e segurança, buscando desenvolver produtos alternativos nacionais que tenham qualidade e que possam beneficiar a população.

Uma das plantas que vem sendo estudada pelo grupo desde o ano 2002 é a Espinheira Santa. Já foi demonstrada a capacidade protetora gástrica do seu extrato bruto (SOUZA-FORMIGONI, 1991) e de várias frações, como a fração do sobrenadante etanólico da extração aquosa (SEEA) obtida da *M. ilicifolia* (FREITAS *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006; BAGGIO *et al.*, 2007a e 2007b). Também já foi descrito algumas das vias envolvidas no mecanismo de ação desta atividade protetora gástrica (ação em receptores H₂, citoproteção gástrica, NO e inibição da bomba H-K-ATPase. Há estudos sugerindo que frações semi-purificadas da *M. ilicifolia* são capazes de inibir a motilidade e a secreção ácida

gástrica (FREITAS *et al.*, 2005; BAGGIO *et al.*, 2007b). Como um dos efeitos que pode estar envolvido no mecanismo de ação da atividade protetora gástrica é a sua ação na circulação sanguínea gástrica, foi estudado a ação das frações semi-purificadas da Espinheira santa na reatividade vascular. Estudos *in vitro* demonstraram uma ação vasorrelaxante das frações da *M. ilicifolia* em aorta isolada de rato. Como os estudos *in vitro* mostraram efeitos específicos vasorrelaxante, estes resultados obtidos sugeriam a existência de um efeito hipotensor da fração sobrenadante etanólico da extração aquosa (SEEA) obtida a partir da *M. ilicifolia*. O resultados sugerem que esse efeito ocorre por estimulação da via L-arginina - óxido nítrico, em aorta isolada de rato. Em testes posteriores com as frações obtidas a partir do SEEA observou-se a existência de efeitos vasorrelaxantes em concentrações muito menores sugerindo proximidade do isolamento do composto, o qual indicou ser uma catequina (RATTMANN *et al.*, 2006). Como a hipertensão está entre as enfermidades que mais acometem a humanidade (KU, 2006), buscamos, dar continuidade a estas pesquisas estudando a presença do efeito hipotensor dessas frações *in vivo*.

1.1 Hipertensão arterial : dados epidemiológicos, tratamento e importância da descoberta de novas opções terapêuticas.

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países do mundo (YUSUF *et al.*, 2001). Um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares é a hipertensão arterial elevada (CARRETERO *et al.*, 2000). A hipertensão é uma das doenças mais comuns em humanos, sendo que de 90 a 95% dos hipertensos desconhece

a causa (KU, 2006). É considerada de origem multifatorial (JACOB, 1999), envolvendo predisposição genética e fatores ambientais (fisiológicos e psicológicos) como dieta, atividade física, obesidade e tabagismo (CRACKOWER, *et al.*, 2002; KAKAR, *et al.*, 2006). De acordo com KU (2006) a idéia mais aceita é que a hipertensão é causada por uma interação entre fatores gênicos, múltiplos fatores pressores patogênicos e um desequilíbrio de fatores depressores fisiológicos.

A pressão arterial é definida como a força que o sangue bombeado pelo coração exerce contra as paredes dos vasos. Em seres humanos, a pressão sangüínea varia constantemente, porém, raramente desvia do normal mais do que 10 a 15% durante o dia. Em um adulto normal os níveis pressóricos se mantêm entre 120 e 80 mmHg, geralmente próximo a 100 mmHg. Entretanto ela pode ser elevada a mais de 160 mmHg em indivíduos com hipertensão ou até mesmo chegar a 0 nas pessoas que se encontram em situações que comprometem a circulação sangüínea normal (hemorragias) (GUYTON, 1991). Porém, o organismo possui mecanismos de controle da pressão arterial que conseguem promover uma resposta adequada frente às ocasiões que a alteram.

De acordo com GUYTON (1991) os mecanismos de controle da pressão sangüínea podem ser classificados de acordo com o tempo necessário para produzir uma ação. Uma resposta rápida (podendo reagir em segundos) é feita pelos: i) barorreceptores que respondem a alterações estruturais nas paredes dos vasos sanguíneos (distensão ou constrição). Consistem na primeira linha de defesa à hipertensão ou hipotensão aguda; ii) quimiorreceptores cuja a ativação ocorre devido às concentrações elevadas de dióxido de carbono (CO₂) e às baixas concentrações de oxigênio (O₂) no sangue, assim um sinal é enviado aos

centros cerebrais de controle da pressão sangüínea, causando a redução da mesma;.iii) sistema nervoso central, ocorre principalmente em situações especiais como a isquemia. O controle dos níveis pressóricos que ocorre em horas ou dias é feito pelos rins. Quando há uma alteração da pressão arterial ocorre um aumento ou redução no balanço entre os fluídos que entram e saem, modificando as concentrações dos líquidos e eletrólitos corporais para tentar restabelecer os níveis pressóricos normais. Dentre os mecanismos intermediários destaca-se o sistema renina-angiotensina, que tem função vasoconstritora ativada quando a baixa pressão sangüínea faz com que o fluxo de sangue para os rins caia abaixo do normal (GUYTON, 1991; OPIE, 1998; CRACKOWER *et al.*, 2002). Outros sistemas hormonais participam do controle da pressão sangüínea como o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina e a aldosterona. O ADH está envolvido em vários processos fisiológicos, inclusive regulação dos fluídos corporais, do tônus vascular e da contratilidade cardiovascular. Sua ativação ocorre com o aumento da osmolaridade plasmática e redução da pressão intravascular (LEE *et al.*, 2003). Alguns mediadores peptídicos constituem sistemas importantes no auxílio ao controle da pressão arterial. Dentre eles destacamos o peptídeo natriurético atrial (PNA) e a endotelina (OPIE, 1998). Além dos sistemas descritos, a pressão arterial pode ter influência do controle local desempenhado pelas camadas de células endoteliais (SCHIFFRIN, 2001).

Entretanto, quando esses mecanismos fisiológicos de controle da pressão arterial não são eficientes em controlar os níveis pressóricos ocorrem os casos de hipertensão. Nessas situações a intervenção terapêutica para o tratamento da hipertensão se faz necessária para garantir a sobrevivência e a qualidade de vida do paciente (MAR *et al.*, 2001). Atualmente, o mais comum é a associação de

duas ou mais drogas para o sucesso do tratamento e, uma das combinações mais usadas é a associação de diuréticos e/ou beta-bloqueadores (JOHANNESSON *et al.*,1995). Porém, segundo recomendações do Comitê Nacional de Descoberta, Avaliação e Tratamento da Hipertensão, em seu sexto relatório, o ideal é fazer a individualização da droga, ou seja, um tratamento de acordo com as características de cada paciente.

Em relação à epidemiologia mundial da hipertensão arterial, a SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (2005) descreve uma das características mais marcantes desta doença que é chamada “Regra das metades”, uma expressão que significa que apenas a metade da população que sofre de hipertensão tem ciência disto; destes, apenas a metade segue algum tratamento; e, destes, apenas a metade consegue controlar o problema. Entretanto, um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (ouviu 2500 pessoas em 77 cidades) revelou que o Brasil é um país de hipertensos, que não obedece a regra das metades. Dos indivíduos que conhecem seu estado hipertensivo, 48,15 não procuram tratamento, confirmando a regra das metades. Ainda de acordo com essa regra, 50% dos pacientes em tratamento não conseguem manter a pressão arterial em níveis considerados seguros, porém no Brasil esse índice sobe para alarmantes 93,5%. Esse fato é atribuído, principalmente, a falta de informações de médicos e pacientes. Acredita-se que ao chegarem a uma média estabelecida, com o uso de medicamentos, ambos tendem a negligenciar o controle (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

A hipertensão arterial é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, como infarto, insuficiência cardíaca e acidentes vasculares cerebrais. É um dos fatores de risco cardiovascular mais preocupante porque, em

80% dos casos, não apresenta sintomas. Estima-se que entre 20% e 25% da população brasileira com mais de 20 anos seja hipertensa. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia/Funcor, além do tratamento medicamentoso, é necessário mudar o estilo de vida (reduzir a ingestão de sal e praticar exercícios físicos). Em termos numéricos, o medicamento reduz a pressão arterial em média 10 mmHg, mas quando associado à mudança nos hábitos, a ação do fármaco é potencializada e passa a reduzir aproximadamente 16 mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Atualmente os medicamentos existentes no mercado foram produzidos com base nos conhecimentos desses mecanismos de controle da pressão arterial. De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão em sua V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2006) normalmente o tratamento farmacológico se inicia com a monoterapia feita com diuréticos, β -bloqueadores, inibidores da ECA (Enzima conversora de angiotensina), bloqueadores dos canais de cálcio ou bloqueadores dos receptores AT₁. Quando esse tratamento não é eficaz é necessário fazer uso de associações medicamentosas. Dentre essas as mais comuns são: i) β -bloqueador + diurético; ii) inibidor adrenérgico + diurético; iii) inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) + diurético; iv) bloqueador dos receptores AT₁ + diurético; v) bloqueador dos canais de cálcio + diurético; vi) bloqueador dos canais de cálcio + inibidor da ECA.

Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante períodos longos está na adesão insuficiente do paciente ao tratamento. Esta adesão pode ser aumentada significativamente se forem ofertados produtos de origem vegetal, uma vez que estes conseguem reunir um enorme grupo de simpatizantes que acreditam na ação benéfica das plantas e na

menor ocorrência de efeitos colaterais. Isso pode ser benéfico para o tratamento dos pacientes e para a redução da morbidade/mortalidade. Além disto, a descoberta de novas substâncias com ação inédita a partir de produtos naturais pode aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Neste contexto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes que possam oferecer novas ações terapêuticas contra as doenças cardiovasculares e a hipertensão arterial. Enfermidades cuja etiologia é descrita como multifatorial (JACOB, 1999), entretanto em boa parte dos casos envolvem uma alteração vascular.

1.2.1 Endotélio vascular e o controle do tônus vascular

A parede vascular é constituída de três camadas: a camada íntima, a camada média e a camada adventícia. A camada íntima consiste em uma única camada de células delgadas, altamente ativas no controle da circulação. Elas produzem vários compostos vasoativos como o fator relaxante derivado do endotélio, a endotelina (vasoconstritor), a angiotensina I, prostaglandinas (PGs), mais especificamente a prostaciclina (PGI₂), e o tromboxano A₂ (TXA₂ - vasoconstritor). A camada média é composta principalmente de células musculares lisas, que com a estimulação apropriada contraem ou relaxam alterando o diâmetro da artéria, e pela matriz que une as células musculares mantendo a orientação correta da parede do vaso. A camada adventícia, que é a mais externa, é constituída de fibroblastos, colágeno e células. Nela também se

encontram os vasos linfáticos e nervos autônomos que controlam o tônus arteriolar (OPIE, 1998).

O endotélio produz uma variedade de substâncias que desempenham um papel importante na regulação da circulação sangüínea e homeostase vascular. São eles os vasoconstritores endotelina, tromboxano A₂ e a angiotensina II, e os vasodilatadores prostaciclina (PGI₂), o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF) e o Óxido Nítrico (NO) (FURCHGOTT & ZAWADZK, 1980).

Através destes mediadores, o endotélio exerce sua influência no fluxo sangüíneo e ainda sobre as células circulantes, como os leucócitos, as plaquetas e ainda sobre substâncias envolvidas na coagulação sangüínea. Todos estes efeitos contribuem para a modulação do tônus vascular na hipertensão e participam no desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares (SCHIFFRIN, 2001).

1.2.1.1 A participação do óxido nítrico no controle da pressão arterial

O óxido nítrico (NO) é uma das substâncias biológicas mais amplamente estudadas (GAMBOA, *et al.*, 2007). Está envolvido em uma série de atividades fisiológicas. No sistema nervoso central atua como neurotransmissor; na periferia existe uma rede de nervos conhecidos como não-adrenérgicos e não-colinérgicos que operam por mecanismos dependentes de NO; regula funções do sistema genitourinário, gastrointestinal e respiratório; participa da regulação da contratilidade cardíaca (MONCADA, *et al.*, 1993).

O NO também inibe a agregação plaquetária através de um mecanismo dependente de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e de sinergismo com a

prostaciclina (PGI_2), que inibe a agregação de plaquetas por aumentar a concentração de monofosfato cíclico de adenina (cAMP). Além disso, as plaquetas levam a geração de NO que atua como um mecanismo de feedback negativo para inibir a ativação plaquetária (RADOMSKI, *et al.*, 1991; SINZINGER *et al.*, 1992). PENNA, *et al.*, (2003) sugere que o NO atua na prevenção da formação de placas ateroscleróticas.

O NO é produzido em grandes quantidades durante as reações imunológicas. Tem propriedades citotóxicas e é produzido por macrófagos ativado, então de acordo com MONCADA, *et al.*, (1993) é provável que tenha um papel na imunidade não específica. Pode estar ainda, envolvido na inibição da ativação de leucócitos (KUBBES, *et al.*, 1991). Além disso, o NO inibe a proliferação de células do músculo liso (GARG, *et al.*, 1989). De acordo com MONCADA e colaboradores (1993), o NO participa do controle da homeostase da vasculatura.

O NO é produzido a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Atualmente existem três isoformas de NOS: a NOS induzida (iNOS) produzida principalmente pelos macrófagos; a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS), ambas produzidas constitutivamente (GAMBOA, *et al.*, 2007).

Nas células endoteliais a produção de NO ocorre em resposta ao aumento da concentração citoplasmática do cálcio (OPIE, 1998). Este processo é iniciado com a ligação de um agonista ao seu receptor específico (receptor do tipo acoplado a proteína G) que ativa uma fosfolipase C (PLC) a qual hidrolisa os fosfolípidios de membrana (fosfatidil-inositol-bifosfato – PIP_2) e os converte em trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (GRIFFITH *et al.*, 1984). O IP_3 promove a liberação do cálcio dos estoques intracelulares e este forma complexo

com a calmodulina (MONCADA *et al.*, 1989). Este complexo ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que converte a L-arginina em NO (OPIE, 1998).

O NO, por ser um gás, consegue se difundir para as células da camada muscular lisa, onde se liga a um grupamento heme de ferro da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e, assim a estimula a converção (WALDMANN, *et al.*, 1988; STONE *et al.*, 1995) GTP em GMPc que pode causar uma vasodilatação periférica (OPIE;1998). Além disso, o GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) a qual induz a uma hiperpolarização da membrana e fechamento dos canais de cálcio ligados a voltagem, dessa forma inibe a mobilização intracelular de cálcio (RASTALDO, *et al.*, 2007). A PKG também ativa a miosina fosfatase, promovendo o relaxamento vascular (TANG, *et al.*, 2003).

De acordo com FEELISCH (1991), alguns compostos como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio, conseguem mimetizar a ação do NO endógeno, porém por serem doadores de NO, não necessitam da enzima (NOS) para desencadear sua ação.

NAKAYA e colaboradores (2007) sugerem que alguns compostos fitoquímicos, como o ginsenosideo (composto do ginseng) provocam o aumento na produção de NO e este ativa os canais de potássio como por exemplo canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}).

1.2.1.2 Participação dos canais de Potássio (K^+) no controle da pressão arterial

O potássio (K^+) é o íon intracelular mais abundante. O gradiente transmembrana de Na^+ e K^+ é mantido graças a um sistema de transporte ativo

conhecido como bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Este gradiente provê energia para várias funções celulares essenciais como controle de potencial de membrana, manutenção da célula e pH. Está presente em todas as células animais como por exemplo células dos vasos sanguíneos (endoteliais, musculares lisas e dos nervos adrenérgicos) bem como dos tecidos que os cercam (músculo do miocárdio, músculo esquelético e cérebro) (HADDY *et al.*, 2006).

Os canais de K^+ ajudam a determinar o potencial de membrana e a regular o volume celular. As células mantêm uma concentração intracelular elevada de K^+ , quando comparada à concentração do meio extracelular. A abertura dos canais de K^+ induz uma alteração no potencial de membrana para valores mais negativos causando hiperpolarização. Essa mudança tem papel fundamental em muitos eventos de sinalização celular, inclusive a regulação do tônus do músculo liso e fluxo sanguíneo (SHIEH *et al.*, 2000). O bloqueio desses canais leva a despolarização da membrana e, a ativação dos mesmos causa hiperpolarização e redução da força de contração dos vasos sanguíneos. Isso ocorre, em parte, devido à diminuição da concentração de cálcio intracelular (OKADA *et al.*, 1993; BRAYDEN, 1996).

Com a conclusão do mapeamento do genoma humano foi possível uma reavaliação acerca da classificação dos canais de potássio e o desenvolvimento de uma nomenclatura uniforme e racional para todos os canais de potássio. Dessa forma os canais de potássio são classificados em quatro principais subgrupos: voltagem dependentes (K_v), canais ativados por cálcio (K_{Ca}), domínio de dois poros (K_{2p}) e canais de potássio de influxo retificante (K_{IR}), todos amplamente distribuídos pelo organismo, podendo ser encontrados em estruturas como cérebro, coração, rins, pulmões e músculos (SHIEH *et al.*, 2000 ; KOROVKINA *et*

al., 2002; GUTMAN, 2003). Os canais de potássio ativados por cálcio podem ainda ser divididos em de alta condutância, de condutância intermediária e de baixa condutância (SHIEH *et al.*, 2000)

Dados revelam a presença de vários tipos de canais de potássio identificados no músculo liso vascular e endotélio. Os mais abundantes incluem os canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância e os canais de potássio ligados à voltagem. Também estão presentes os canais de potássio ativados por cálcio de intermediária e de baixa condutância, K_{ATP} , e os K_{IR} . Essa variedade de canais de potássio que participam do relaxamento vascular reflete a multiplicidade e a complexidade do mecanismo envolvido na regulação do tônus vascular (BRAYDEN, 1996; VERGARA *et al.*, 1998; NEYLON *et al.*, 1999).

Segundo NAKAYA e colaboradores (2007) os canais K_{ATP} , juntamente com os canais K_{Ca} são de suma importância pois são abundantes nas membranas celulares e controlam efetivamente o potencial de membrana e por conseguinte o tônus vascular. De acordo com BRAYDEN (1996) os canais de potássio são proteínas efetoras importantes que tem múltiplas funções no músculo liso vascular como remodelamento da vasculatura, regulação da migração de células do músculo liso, proliferação e apoptose.

Em 1996, WONDERLIN e STROBL publicaram uma revisão exaustiva, que se tornou uma referência clássica, onde sugerem que os canais de potássio participam da proliferação de uma série de células como linfócitos, células de Schwann, melanoma, carcinoma, neuroblastoma, células pequenas de câncer de pulmão e de bexiga. Desde então, muitas pesquisas têm comprovado que os canais de potássio participam do processo de proliferação de muitas outras células, inclusive células endoteliais e células musculares lisas (NEYLON, *et al.*,

2002). WONDERLIN *et al.*, (1996), FRASER *et al.*, (2002) e SCHLICHTER *et al.*, (2002) sugerem que as células precisam dos canais de potássio para prosseguir seu ciclo, mais especificamente, para iniciar a fase G₁, é necessária a ativação desses canais.

A apoptose é uma ação fisiológica que pode ser ativada por sinais internos ou externos. Algumas deficiências orgânicas no processo apoptótico podem desencadear patologias como câncer, aterosclerose e doenças vasculares pulmonares (RABINOVITCH, 1998; HAUNSTETTER, *et al.*, 1998; DURMOWICZ, *et al.*, 1999). Sendo assim a apoptose constitui um processo fisiológico importante. De acordo com KRICK e colaboradores (2002), o NO induz apoptose celular por ativar canais de potássio nas células do músculo liso vascular pulmonar. O NO pode ser usado com fins terapêuticos para tratar hipertensão pulmonar pois seu mecanismo envolve vasodilatação, devido a hiperpolarização da membrana pela ativação dos canais de potássio e inibição do remodelamento vascular devido a apoptose.

Como já mencionado o NO causa o relaxamento do músculo liso vascular. Esse vasorrelaxamento pode ocorrer através de várias vias, uma delas é através da ativação dos canais de potássio. Evidências indicam que os K_{Ca} são os primeiros canais envolvidos, mas a ativação dos K_{ATP} pelo NO pode ter papel importante (MURPHY *et al.*, 1995). De acordo com BRAYDEN (2002), a via celular de sinalização provavelmente envolve GMP, que ativa uma proteína quinase G (PKG), mas que pode também fazer uma ativação cruzada da proteína quinase A (PKA) como um possível mecanismo de ativação dos canais K_{ATP}. O NO, ao ativar a guanilato ciclase solúvel, pode influenciar vários processos celulares inclusive a ativação dos canais de potássio através da proteína quinase

dependente do GMPc (LINCON, *et al.*, 1991, LINCON *et al.*, 1993; ROBERTSON, *et al.*, 1993; TANIGUCHI, *et al.*, 1993).

BOLOTINA e colaboradores (1994), sugerem a ativação de canais K_{Ca} pelo No e EDHF de forma independente da via GMPc. Conforme JACKSON *et al.*, (1993) e MURPHY *et al* (1995), as prostaciclina também contribuem para o relaxamento do músculo liso vascular e essa ação pode ser por ativação dos canais K_{ATP} .

1.3 *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek é um arbusto perene, pertencente à família Celastraceae, de crescimento lento que pode atingir cinco metros de altura. Apresenta folhas inteiras e simples, com filotaxia alternada e que apresentam dentes espinhosos nas bordas (DUARTE e DEBUR, 2005) (Ver figura 1).



Figura 1: Exemplar da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae). Em destaque suas folhas, flores, frutos e sementes. Foto: Sônia M. Vela, Curitiba- PR., 2004.

A *M. ilicifolia* ocorre no Paraguai, Uruguai, norte da Argentina e sul do Brasil (SCHULTES, *et al.*, 1990; BRUNETON, 1995; CORDEIRO, 2006), é conhecida popularmente como espinheira-santa, cancerosa, cangorosa, maiteno e espinheira divina (CORDEIRO, 2006).

Na medicina popular brasileira, é usada principalmente para o tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e dispepsias (BALBACH, 1980; CRUZ, 1982; BORN, 2000; FREITAS *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006; BAGGIO *et al.*, 2007a e 2007b). Em 1991, SOUZA-FORMIGONI e colaboradores evidenciaram a ação protetora gástrica, em ratos, do chá da *M. ilicifolia*, preparado a partir de folhas secas ou frescas, quando administrados por via oral ou intraperitoneal. Tal proteção foi comparada à ação da cimetidina, um protetor gástrico conhecido. CIPRIANI e colaboradores (2006) descreveram a ação antiulcerogênica de um polissacarídeo presente no chá (infusão) das folhas da *M. ilicifolia*. Esse mesmo grupo de pesquisadores confirmou que flavonóides da *M. ilicifolia* tem ação protetora sobre a mucosa gástrica de roedores através da inibição da atividade da Hidrogênio Potássio ATPase (H^+-K^+ -ATPase) e da formação de NO (BAGGIO *et al.*, 2007a).

O chá das folhas da *M. ilicifolia* também é aplicado topicamente em feridas e erupções cutâneas e anticancerígeno (MARTINEZ-CROVETTO, 1987; SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991; TAYLOR, 1996). A infusão das folhas é utilizada como contraceptivo, abortivo e emenagogo, principalmente, entre as populações rurais e indígenas (ARENAS *et al.*, 1977; MARTINEZ-CROVETTO, 1987). Dentre outras atividades biológicas atribuídas a *M. ilicifolia* também são descritas atividades citotóxica (SHIRODA *et al.*, 1994), antioxidante (MELO *et al.*, 2001), antimutagenica (HORN *et al.*, 2003), atividade antiulcerogênica (JORGE *et al.*, 2004; CIPRIANI *et al.*, 2006; BAGGIO *et al.*, 2007), antioxidante (VELLOSA *et al.*, 2006), vasorrelaxante (RATTMANN *et al.*, 2006) e antiinflamatória (JORGE *et al.*, 2004).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de muitos constituintes químicos na *M. ilicifolia*, como flavonóides glicosídeos (LEITE *et al.*, 2001), triterpenóides (PEREIRA *et al.*, 1991; CORDEIRO *et al.*, 1999), taninos (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991) e polissacarídeos como a arabinogalactana (CIPRIANI *et al.*, 2006). Os triterpenóides e a arabinogalactana foram sugeridos como importantes para o efeito anti-ulcerogênico da *M. ilicifolia* (CORDEIRO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2006). Os flavonóides têm sido relacionados com uma redução na morte por doenças que atingem as artérias coronárias (HERTOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1991). De acordo com vários autores esses compostos têm potencial vasodilatador (HERRERA *et al.*, 1996) tanto na presença (LEMOS *et al.*, 1999) quanto na ausência de endotélio vascular (HERRERA *et al.*, 1996). Dentre os flavonóides, encontrados na *M. ilicifolia* constatou-se a presença de catequina e epicatequina (SOARES DE MOURA *et al.*, 2002; RATTMANN *et al.*, 2006; BAGGIO *et al.*, 2007).

Neste trabalho, investigamos os efeitos (*in vivo*), na pressão arterial de ratos, das frações do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *Maytenus ilicifolia* (SEEA) rica em catequina, que apresentou efeitos vasorrelaxantes em estudos *in vitro* (aorta isolada de rato RATTMANN *et al.*, 2006, CIPRIANI *et al.*, 2006).

II OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Investigar a ação hipotensora das frações semi-purificadas da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastrácea) e identificar as vias envolvidas no mecanismo de ação *in vivo*.

2.2 - Objetivos específicos

- Verificar ação hipotensora das frações (SEI, SEEA, FAQ e FAE) semi-purificadas da *M. ilicifolia*.
- Identificar as doses destas frações semi-purificadas da *M. ilicifolia* capazes de promoverem efeito hipotensor em ratos normotensos.
- Avaliar a ação hipotensora das frações da *M. ilicifolia* na presença da fenilefrina (agonista α_1).
- Investigar o envolvimento da transmissão vagal na redução dos níveis pressóricos provocados pelas frações da *M. ilicifolia* Mart. ex Reissek.
- Avaliar a participação de receptores muscarínicos na hipotensão produzida pelas frações semi-purificadas da *M. ilicifolia*.

- Investigar a participação dos receptores β -adrenérgicos na ação hipotensora das frações da *M. ilicifolia*.
- Avaliar o envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na ação hipotensora das frações da *M. ilicifolia*.
- Determinar o envolvimento dos canais de K^+ na ação hipotensora das frações da *M. ilicifolia*.

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

As folhas da *M. ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) foram coletadas em Campo Magro - PR e fornecidas pela Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná Ltda. O material foi identificado pelo Professor Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e exemplares da mesma espécie estão depositados no herbário do mesmo departamento sob números 30842 e 43795.

3.2 Frações semi-purificadas da *M. ilicifolia* Mart. ex Reissek

As frações obtidas a partir da *M. ilicifolia*, que estão sendo utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Sua obtenção integrou o trabalho de dissertação de mestrado – Extração, purificação e caracterização estrutural de polissacarídeos da *M. ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2003). Portanto, os métodos de extração foram orientados principalmente para a obtenção de polissacarídeos, não excluindo a obtenção de outros metabólitos vegetais farmacologicamente ativos.

3.3 Obtenção das frações semi-purificadas da *M. ilicifolia*

A obtenção das frações utilizadas nesse estudo obedeceu aos seguintes passos:

1) Folhas secas e moídas (332 g) foram submetidas ao processo de extração por infusão com 3,3 L de água fervente. A extração foi realizada até que o meio de extração atingisse temperatura ambiente (~ 6h). O resíduo foi separado por filtração e o extrato tratado com etanol 3 volumes para a precipitação das proteínas e polissacarídeos (SEI – sobrenadante etanólico da infusão, fração solúvel em etanol é rica em metabólitos secundários);

2) o resíduo da infusão (269 g) foi deslipidificado com Clorofórmio :metanol ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$) (2:1 v/v; 1 L), à 60 °C por 2 h (3 x). O resíduo deslipidificado foi extraído com água (1L) sob refluxo por 3 h (3x). O extrato aquoso obtido foi tratado com etanol 3 volumes para promover a precipitação de proteínas e polissacarídeos (SEEA – sobrenadante etanólico da extração aquosa é rico em metabólitos secundários).

3) o SEEA foi solubilizado em água :metanol ($\text{H}_2\text{O:MeOH}$) (2:1 v/v – 60 mL) e particionado com acetato de etila (30 mL, 3 x cada).

Os passos das frações obtidas estão esquematizadas na figura 2.

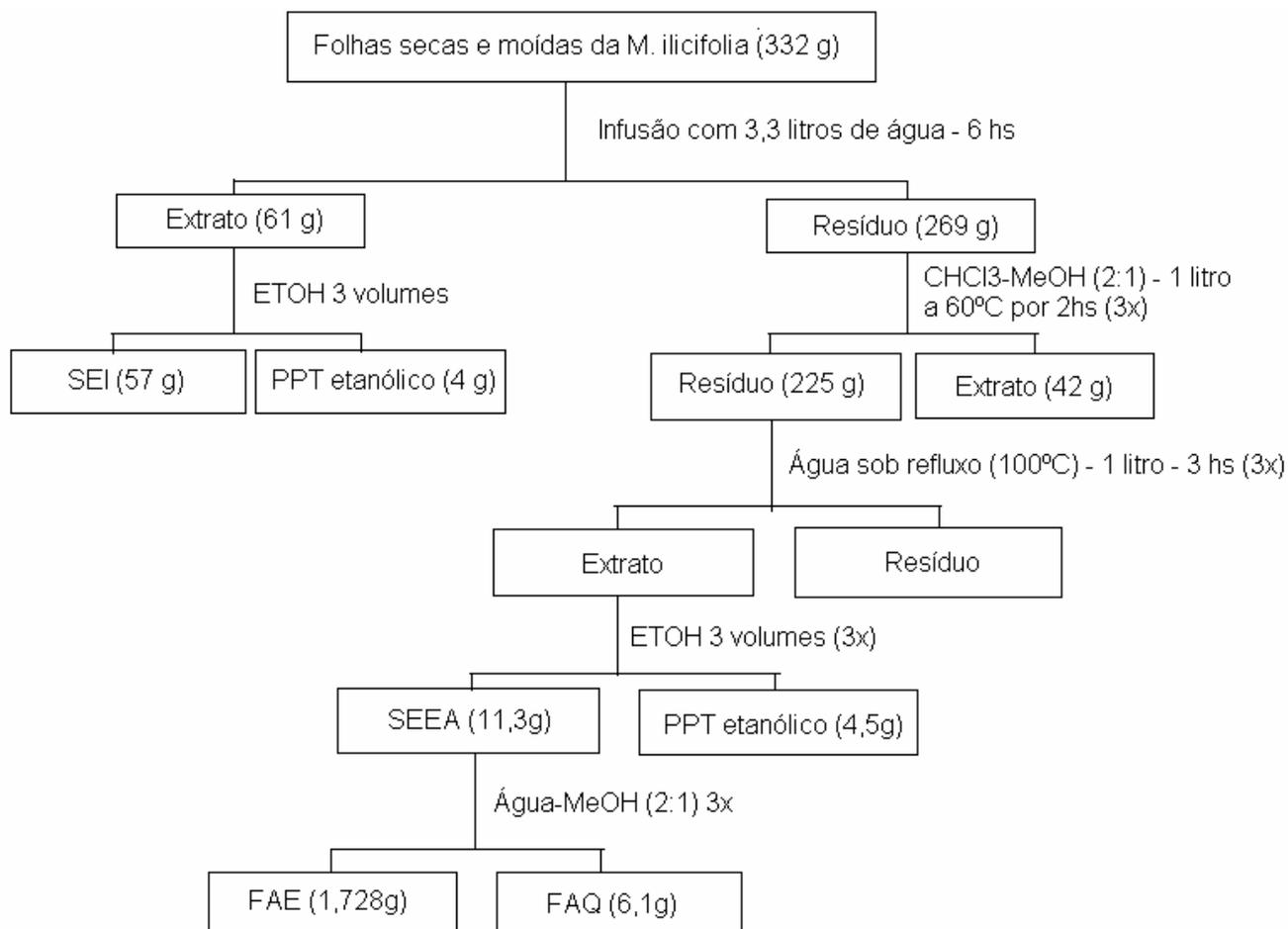


Figura 2: Fluxograma do processo de obtenção das frações da *Maytenus ilicifolia*. SEI – Sobrenadante etanólico da infusão; SEEA – Sobrenadante etanólico da extração aquosa ; Fração acetato de etila (FAE) ; Fração aquosa (FAQ). Fonte: CIPRIANI, *et al*, 2003.

3.4 Drogas e sais

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: cloreto de sódio (NaCl), acetilcolina (ambos da Merck; Alemanha); fenilefrina, N^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), Nitroglicerina, atropina, 4-aminopiridina (4-AP), glibenclamina, tetraetilamônio (TEA), azul de

metileno, isoproterenol (todos da Sigma Chemical, EUA); propranolol (DEG Importação de produtos químicos LTDA) ; xilazina e cetamina (Bayer).

As diluições das drogas, a partir das soluções estoques, foram preparadas com salina (0,9%). A glibenclamida foi preparada em solução de dimetilsulfóxido (DMSO).

3.5 Animais

Foram utilizados ratos *Ratus norvegicus*, variedade Wistar albinos, com idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Aproximadamente 2-3 horas antes da realização dos experimentos, os animais foram transportados até o laboratório (mantidos sob condições controladas) para que passem por um período de ambientação e sua pressão arterial média não sofra alterações em virtude da mudança de local. A metodologia experimental descrita neste estudo vem sendo muito utilizada em estudos acerca da fisiopatologia da hipertensão. Todos os protocolos, foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFPR sob número 211.

3.6 Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados.

Os animais 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 10), destinado à administração de drogas e soluções. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina, diluída em solução salina, foi administrada para prevenir coágulos e obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos a traqueostomia e mantidos sob respiração espontânea. A artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um catéter de polietileno (PE 10), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial média (PAM). 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 v4, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, Austrália).

3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.7.1 Efeito das frações semi-purificadas da *M. ilicifolia* sobre os níveis pressóricos de ratos normotensos.

Após o manuseio cirúrgico dos animais (item 3.6), a artéria ter sido conectada ao transdutor, foi respeitado um período de aproximadamente quinze minutos para a estabilização da PAM. Em seguida realizou-se a administração do SEI (sobrenadante etanólico da infusão) em diferentes doses (5, 10, 20 e 30 mg/Kg) e em seqüências alternadas, através da veia femoral. As frações semi-purificadas da *M. ilicifolia* foram administradas em diferentes seqüências para verificar se o efeito hipotensor observado não ocorre em virtude do acúmulo das doses e, ainda para fazer um aproveitamento adequado dos animais.

O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da curva dose-resposta das frações SEEA (sobrenadante etanólico da extração aquosa), fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE). Os valores inseridos no gráfico são a diferença entre a pressão arterial média registrada antes e após a aplicação de cada dose das respectivas frações. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais normotensos que receberam acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg) por via endovenosa.

3.7.2 Avaliação dos efeitos do SEEA sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de fenilefrina.

Nesse experimento os animais foram preparados para o registro da PAM como descrito no item 3.6 e a veia femoral contra-lateral àquela utilizada para a administração em bolus foi igualmente canulada e conectada a uma bomba de infusão contínua (modelo EFF 311, Insight[®], Ribeirão Preto, SP). Após o período de estabilização da PAM os animais receberam por infusão contínua, durante 80 minutos fenilefrina (20 nmol/kg/min). Durante os primeiros 20 minutos, foi infundido apenas fenilefrina. Após esse período foi administrado, pela outra veia femoral, SEEA nas doses 5, 10 e 30 mg/kg com um intervalo de 10 minutos entre cada administração. Os últimos 30 minutos mantiveram-se apenas a infusão de fenilefrina. Sendo assim o tempo total de infusão de fenilefrina (20 nmol/kg/min) foi de 80 minutos. O mesmo procedimento foi repetido com outro grupo de animais, porém não foi administrado SEEA em *bolus* e sim ACh na doses de 3, 10 e 30 nmol/kg para verificação da responsividade vascular.

3.7.3 Estudo do envolvimento do nervo vago no efeito do SEEA da *M. ilicifolia* sobre a pressão arterial média de ratos normotensos.

Foi feito o procedimento cirúrgico, conforme descrito no item 3.6 e isolamento bilateral do nervo vago. Decorrido o período de estabilização foi administrado SEEA (30 mg/kg) e ACh (30 nmol/kg), ambos pela via endovenosa, para a observação de seus efeitos. Após o retorno da pressão arterial aos níveis normais (aproximadamente 15 minutos) foi feita a secção bilateral do nervo vago, previamente dissecado. Aguardados mais 15 minutos, após a bivaotomia, foram

administradas as mesmas doses de SEEA ou ACh para a análise dos efeitos. Nesse protocolo observamos a ação do SEEA antes e depois da vagotomia para avaliarmos a participação da condução vagal na hipotensão gerada pela fração do extrato.

3.7.4 Estudo do envolvimento dos receptores muscarínicos e β -adrenérgicos no efeito hipotensor da *M. ilicifolia* em ratos normotensos.

Após a cirurgia e período de estabilização, o SEEA (30 mg/Kg) foi injetado pela via intravenosa e o seu efeito hipotensor foi observado. Aguardou-se o retorno da pressão aos níveis normais e, em seguida, os animais receberam atropina (1 mg/Kg, i.p.) ou propranolol (1,5 mg/kg, i.v.). Após quinze minutos o SEEA foi novamente administrado na mesma dose. Como a atropina é um antagonista muscarínico e o propranolol é um bloqueador dos receptores β -adrenérgicos, para confirmar a presença de efeito dessas drogas, foram obtidos registros (controles positivos) na presença e ausência da acetilcolina (30 nmol/kg) e do isoproterenol (1,2 μ g/kg).

3.7.5 Avaliação dos efeitos do SEEA ou FAE sobre a PAM de ratos expostos à infusão contínua de L-NAME ou azul de metileno.

Nesse conjunto de experimentos os animais foram preparados para o registro da PAM como descrito no item 3.6 e a veia femoral contra-lateral àquela utilizada para a administração em *bolus* foi igualmente canulada e conectada a uma bomba de infusão contínua (modelo EFF 311, Insight[®], Ribeirão Preto, SP).

Após o período de estabilização da PAM os animais foram infundidos continuamente, durante 90 minutos com N-^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) (7 mg/kg/min) ou azul de metileno (150 nmol/kg/min). Durante os primeiros 30 minutos, foi infundido apenas L-NAME ou azul de metileno. Após esse período foi administrado, pela outra veia femoral, SEEA nas doses de 10 e 30 mg/kg com um intervalo de 10 minutos entre cada administração, ou FAE na dose de 10 mg/kg. Os últimos 30 minutos mantiveram-se apenas a infusão de L-NAME ou azul de metileno. Sendo assim o tempo total de infusão de L-NAME (7 mg/kg/min) ou azul de metileno (150 nmol/kg/min) foi de 90 minutos. Um grupo de animais que foi infundido com L-NAME recebeu, pela outra veia femoral, nitroglicerina (10, 30 e 90 µg/kg) com um intervalo de 10 minutos entre cada administração. O mesmo procedimento foi repetido com outro grupo de animais, porém não foi administrado SEEA ou FAE em *bolus* e sim ACh na doses de 3, 10 e 30 nmol/kg para verificação da responsividade vascular.

3.7.6 Investigação do envolvimento dos canais de Potássio na hipotensão causada pela fração SEEA e fração acetato de etila (FAE).

Após a cirurgia e período de estabilização, o SEEA (30 mg/Kg) ou a FAE (10 mg/Kg) foram injetados pela via intravenosa e o seu efeito hipotensor foi observado. Aguardou-se o retorno da pressão aos níveis normais e, em seguida, TEA (360 µmol/Kg) foi administrada por via endovenosa de forma lenta (aproximadamente 5 minutos), para que não houvesse morte dos animais. Após um período de aproximadamente cinco minutos o SEEA ou a FAE foram administrados novamente. Nesse protocolo comparou-se o efeito hipotensor do

SEEA ou a FAE antes da administração do TEA (bloqueador de canais de K^+ não seletivo) com o seu efeito após a administração deste. O mesmo procedimento foi repetido com outros grupos de animais, porém, o SEEA ou a fração FAE foram testados na presença da 4-aminopiridina (bloqueador de canais de K^+ voltagem-dependentes) e da glibenclamida (bloqueador de canais de K^+ sensíveis a ATP).

3.8 Análise dos resultados e testes estatísticos.

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

IV RESULTADOS

4.1 Efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da infusão de *M. ilicifolia* em ratos anestesiados.

Os animais utilizados apresentaram pressão arterial média (PAM) basal de $110 \pm 4,6$ mmHg. A administração do sobrenadante etanólico da infusão (SEI) por via intravenosa nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/Kg reduziu a pressão arterial média (PAM) em $5,9 \pm 1,6$; $18,4 \pm 1,4$; $21,5 \pm 2,1$ e $22,1 \pm 2,8$ mmHg. Os efeitos produzidos pela administração das doses de 10 e 20 e 30 mg/kg foram semelhantes (não diferiram entre si). A dose de 5 mg/kg não alterou os níveis pressóricos quando comparado ao controle salina (0,9%) (Fig 3A e 3B).

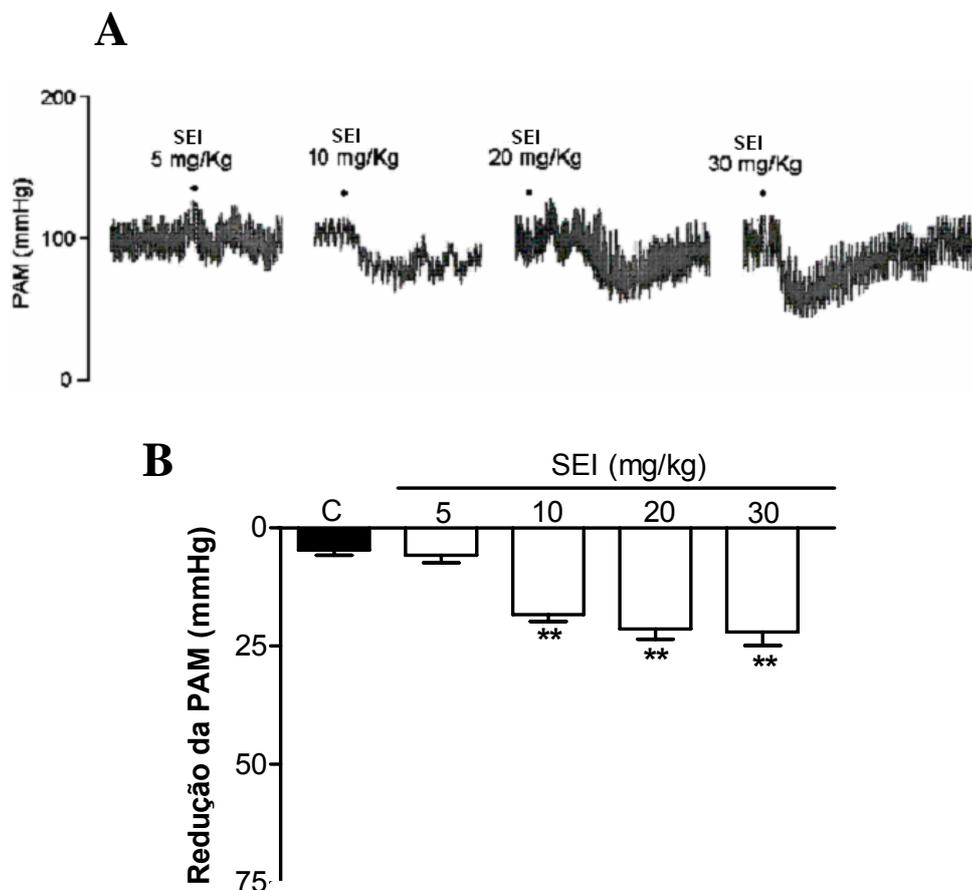


Figura 3: Efeito hipotensor da fração sobrenadante etanólico da infusão em ratos anestesiados. A – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da infusão da *M. ilicifolia* (SEI), nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/Kg; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. A letra “C” indica a alteração da PAM induzida pela administração de salina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C).

4.2 Efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* em ratos anestesiados.

O sobrenadante etanólico da extração aquosa (SEEA) administrado pela via intravenosa, nas doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg promoveu um efeito hipotensor dependente da dose, cujos valores corresponderam respectivamente a $5,8 \pm 1,3$; $16,2 \pm 2,5$; $23,7 \pm 3,2$ e $52,6 \pm 5,5$ mmHg em relação a PAM basal que foi de $109,4 \pm 2,4$ mmHg (Fig 4A e 4B).

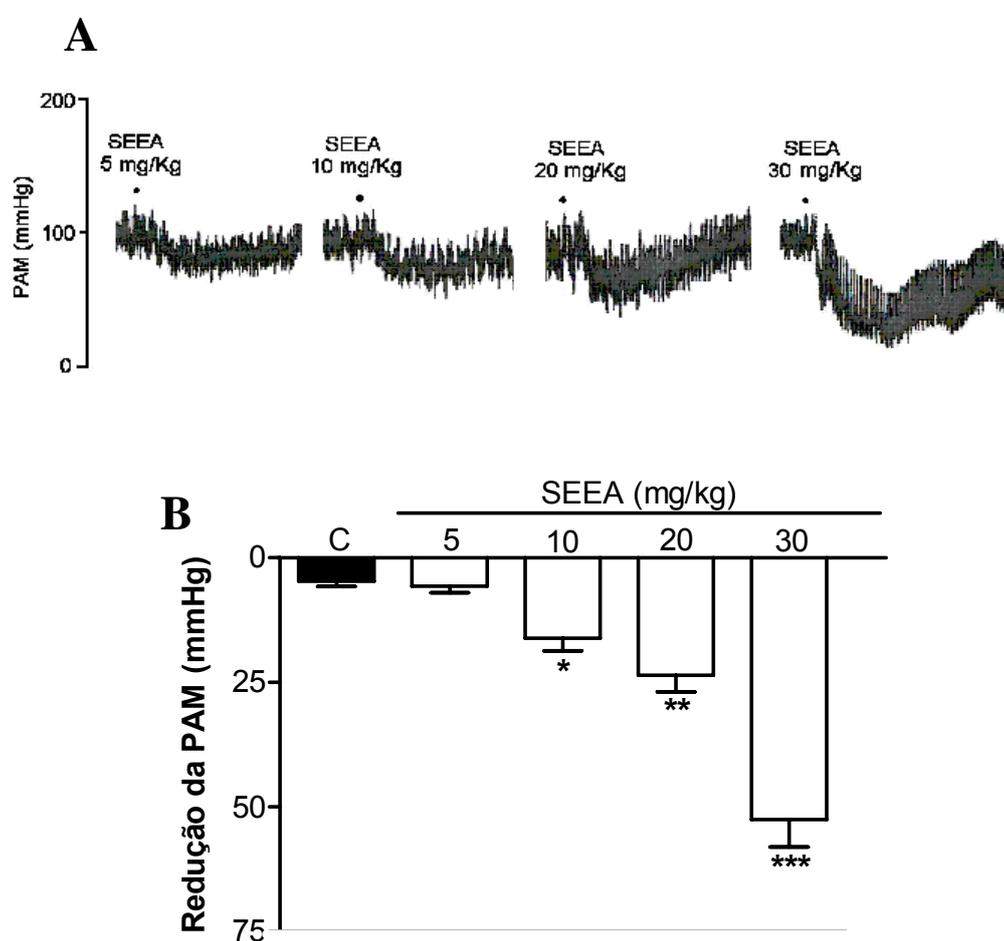


Figura 4: Efeito hipotensor da fração SEEA sobre os níveis pressóricos de ratos anestesiados. A – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da infusão da *M. ilicifolia* (SEI), nas doses de 5, 10, 20 e 30

mg/Kg; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. A letra “C” indica a alteração da PAM induzida pela administração de salina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.3 Ação hipotensora do SEEA em ratos infundidos com fenilefrina

A infusão contínua de fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico; 20 nmol/kg/min) induziu um aumento sustentado de 60 mmHg na PAM que foi de $108,4 \pm 2,0$ mmHg para $168,1 \pm 2,6$ mmHg. Durante a hipertensão aguda induzida pela fenilefrina, a administração em *bolus* do SEEA, nas doses de 5, 10 e 30 mg/Kg (i.v.) reduziu a PAM em $2,0 \pm 0,8$; $14,9 \pm 2,8$ e $30,0 \pm 2,6$ mmHg em relação a PAM basal (Fig. 5, barras fechadas).

No grupo controle (sem infusão de fenilefrina), essas doses de SEEA reduziram a PAM correspondente em $5,8 \pm 1,3$; $16,2 \pm 2,5$ e $43,7 \pm 3,5$ mmHg, respectivamente, em relação à PAM basal ($109,4 \pm 2,4$ mmHg) (Fig. 5).

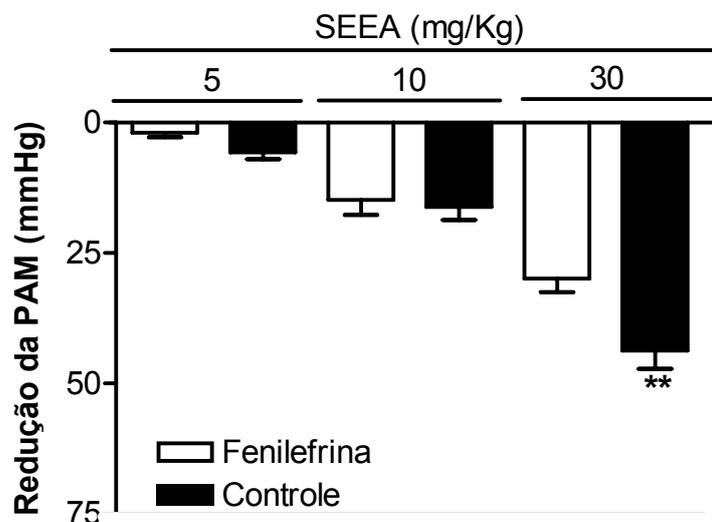


Figura 5: Efeito hipotensor do SEEA na presença da fenilefrina (agonista α_1). Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA e a infusão contínua de fenilefrina (20 nmol/kg/min). Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.4 Efeito da transmissão vagal na ação hipotensora do SEEA em ratos anestesiados.

A PAM dos animais que foram submetidos ao procedimento de vagotomia bilateral é $116,3 \pm 2,1$ mmHg, ou seja, a secção do nervo vago não alterou a PAM de forma significativa nos ratos anestesiados. Antes da bivagotomia, a ACh (30 nmol/kg) e a dose mais efetiva do SEEA (30 mg/kg), ambas via i.v., reduziram a PAM em $43,0 \pm 5,7$ e $33,0 \pm 4,0$ mmHg, respectivamente. Esse efeito hipotensor não foi alterado significativamente após a vagotomia bilateral. Os valores de

redução da PAM da ACh (30 nmol/kg) e do SEEA (30 mg/kg) após a vagotomia foram $42,5 \pm 5,3$ e $36,4 \pm 3,5$ mmHg, respectivamente (Fig. 6). Todos os valores foram obtidos em relação a PAM basal do grupo.

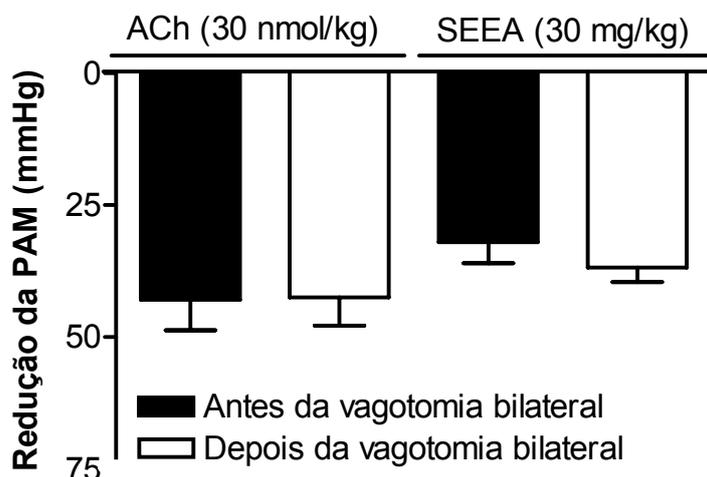


Figura 6: Ação hipotensora do SEEA antes e após a secção bilateral do nervo vago em ratos normotensos anestesiados. Os animais receberam SEEA (30 mg/kg) ou ACh (30 nmol/kg), após o retorno da PAM aos níveis basais (aproximadamente 15 minutos) foi feita secção bilateral do nevo vago, previamente dissecado. Após cerca de 15 minutos foram administradas as mesmas doses de SEEA e ACh para observação da resposta. Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

4.5 O efeito hipotensor do SEEA em ratos anestesiados não envolve os receptores β -adrenérgicos e os receptores muscarínicos.

O tratamento dos animais com propranolol (1,5 mg/kg, i.v.) não interferiu na resposta ao SEEA (30 mg/Kg, i.v.). A queda da PAM induzida pelo SEEA antes e depois do tratamento com este antagonista de receptores β -adrenérgicos

corresponde a $31,6 \pm 3$ mmHg e $32,41 \pm 2,2$ mmHg, respectivamente. O isoproterenol ($1,2 \mu\text{g}/\text{kg}$), utilizado como controle positivo, reduziu os níveis pressóricos em $44,3 \pm 2,4$ mmHg antes do tratamento com o propranolol. Entretanto, na presença do propranolol, houve um bloqueio acentuado do efeito hipotensor deste agonista β -adrenérgico. A redução da PAM correspondeu a $2,63 \pm 1,7$ mmHg quando comparada à PAM basal ($103,3 \pm 2,9$ mmHg) (Fig. 7A).

A presença da atropina ($1 \text{ mg}/\text{kg}$) por via intraperitoneal não alterou o efeito hipotensor do SEEA ($30 \text{ mg}/\text{kg}$). A queda da PAM induzida pelo SEEA antes e depois do tratamento deste antagonista muscarínico correspondem a $26,3 \pm 4,9$ mmHg e $23,0 \pm 5,7$ mmHg, respectivamente. A ACh, na dose de $30 \text{ nmol}/\text{kg}$, provocou uma redução da PAM de $44,5 \pm 6,5$ mmHg em ratos não tratados com atropina. No grupo tratado com esse antagonista, a ACh produziu uma alteração dos níveis pressóricos de $7,0 \pm 3,4$ mmHg. (Fig 7B). Todas as reduções foram comparadas com a PAM basal do grupo, $108,6 \pm 2,1$ mmHg.

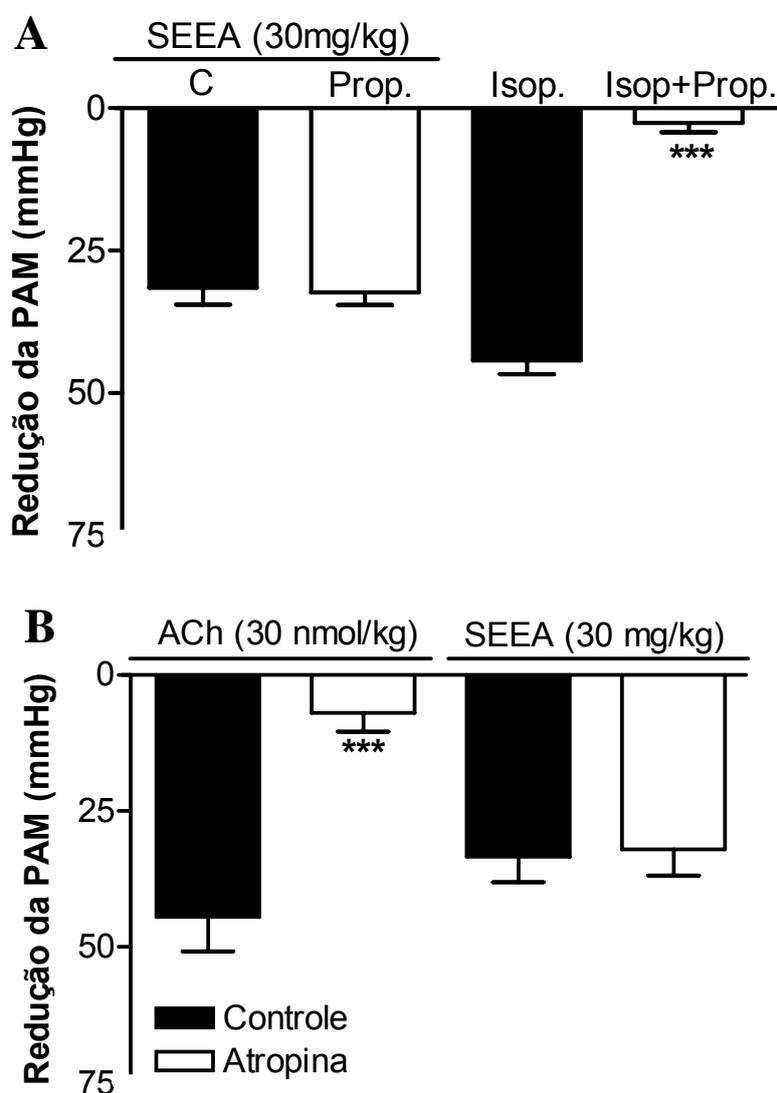


Figura 7: Efeito hipotensor do SEEA na presença e na ausência de antagonista β -adrenérgico e antagonista muscarínico. A - Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais, em resposta ao SEEA (30 mg/kg), antes e depois da administração do propranolol (1,5 mg/kg). Como controle positivo foi administrado isoproterenol (1,2 μ g/kg) também pela via intravenosa. **B** - Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais, em resposta ao SEEA (30 mg/kg), antes e depois da administração de atropina (1 mg/kg – i.p.). Como controle positivo foi administrado ACh (30 nmol/kg) pela via intravenosa. A letra “C” indica o grupo de animais

que não recebeu propranolol ou atropina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

*** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.6 Participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase na hipotensão causada pelo SEEA.

A PAM dos animais pertencentes ao grupo controle foi de $110,0 \pm 1,0$ mmHg. Os animais tratados continuamente com L-NAME (7 mg/kg/min) tiveram a sua PAM alterada para $172,5 \pm 1,0$ mmHg. Ou seja, o L-NAME tem a capacidade de promover um estado de hipertensão aguda nos animais.

No grupo controle, a dose de 30 mg/kg do SEEA induziu uma redução da PAM correspondente a $52,6 \pm 5,5$ mmHg. Nos animais infundidos com o L-NAME (7mg/kg/min), um inibidor da NO sintase, ocorreu uma forte inibição (aproximadamente 82,3 %) da resposta hipotensora do SEEA, a qual correspondeu a $9,2 \pm 3,6$ mmHg (Fig 8A e 8B).

A ACh (30 nmol/Kg) foi utilizada como controle e gerou uma hipotensão de $58,5 \pm 7,7$ e $66,8 \pm 1,8$ mmHg, respectivamente na ausência e na presença do L-NAME (Fig 8A e 8B).

A nitroglicerina (doador de NO) foi utilizada como um controle negativo. Na ausência do L-NAME, as doses de 10, 30 e 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ reduziram a PAM em $25,4 \pm 0,9$; $36,0 \pm 2,4$ e $50,6 \pm 3,5$ mmHg, respectivamente. Quando a nitroglicerina foi administrada nas mesmas doses nos animais infundidos com L-NAME não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Houve redução da PAM em $32,6 \pm 4$; $43,9 \pm 4,9$ e $60,6 \pm 2,6$ mmHg (Fig. 8C). Os dados na ausência do L-NAME foram obtidos em comparação a PAM basal do grupo controle ($112,1 \pm$

2,0mmHg) e os valores referentes ao grupo tratado com L-NAME foram comparados em relação a PAM deste grupo ($171,5 \pm 3,9$ mmHg).

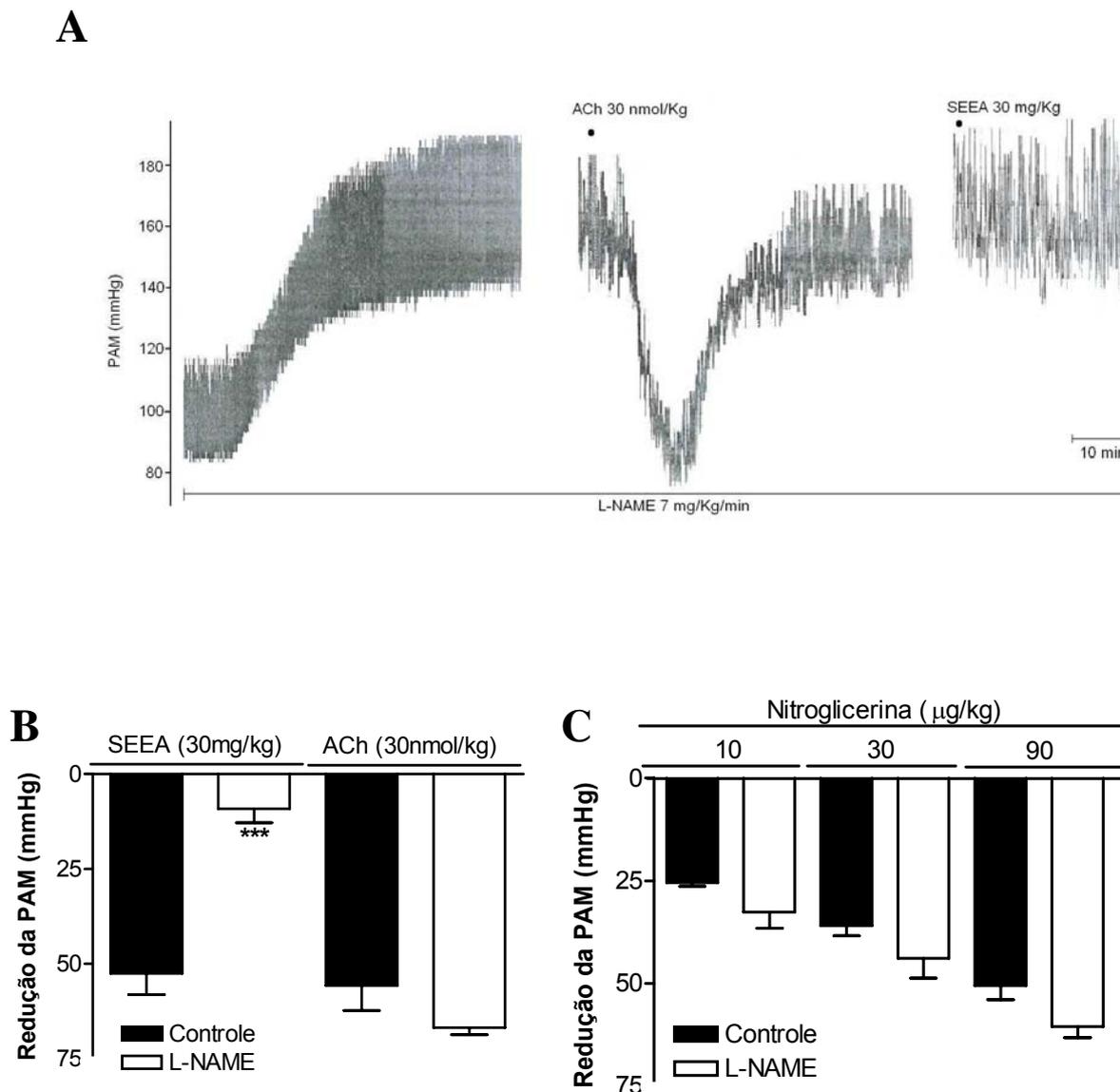


Figura 8: Efeito hipotensor do SEEA na presença do L-NAME (inibidor da NO sintase). Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA (30mg/kg) ou nitroglicerina (10, 30 e 90 µg/kg) ou ACh (30nmol/kg) e a infusão contínua de L-NAME (7 mg/kg/min). **A** – Registro da elevação da PAM na presença do L-NAME e resposta da ACh (30 nmol/kg) e SEEA. **B** - Resposta ao SEEA (30mg/kg) e a ACh (30 nmol/kg) na ausência e presença

de L-NAME. **C** – Resposta da nitroglicerina na ausência e na presença do L-NAME. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

*** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

O SEEA nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg (i.v.) provocou uma alteração da PAM de $5,8 \pm 1,3$; $18,4 \pm 1,4$ e $52,6 \pm 5,5$ mmHg nos animais controle (na ausência de azul de metileno – inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel). Nos animais infundidos com azul de metileno (150 nmol/kg/min) a redução dos níveis pressóricos foi de $0,9 \pm 0,9$; $6,6 \pm 1,7$ e $22,8 \pm 3,3$ mmHg. A queda da PAM gerada pela ACh foi de $55,7 \pm 6,6$ e $51,3 \pm 4,5$ mmHg, respectivamente na ausência e na presença do azul de metileno (Fig 9A e 9B). Os dados foram analisados em comparação à PAM basal do grupo que foi de $123,7 \pm 2,1$ mmHg.

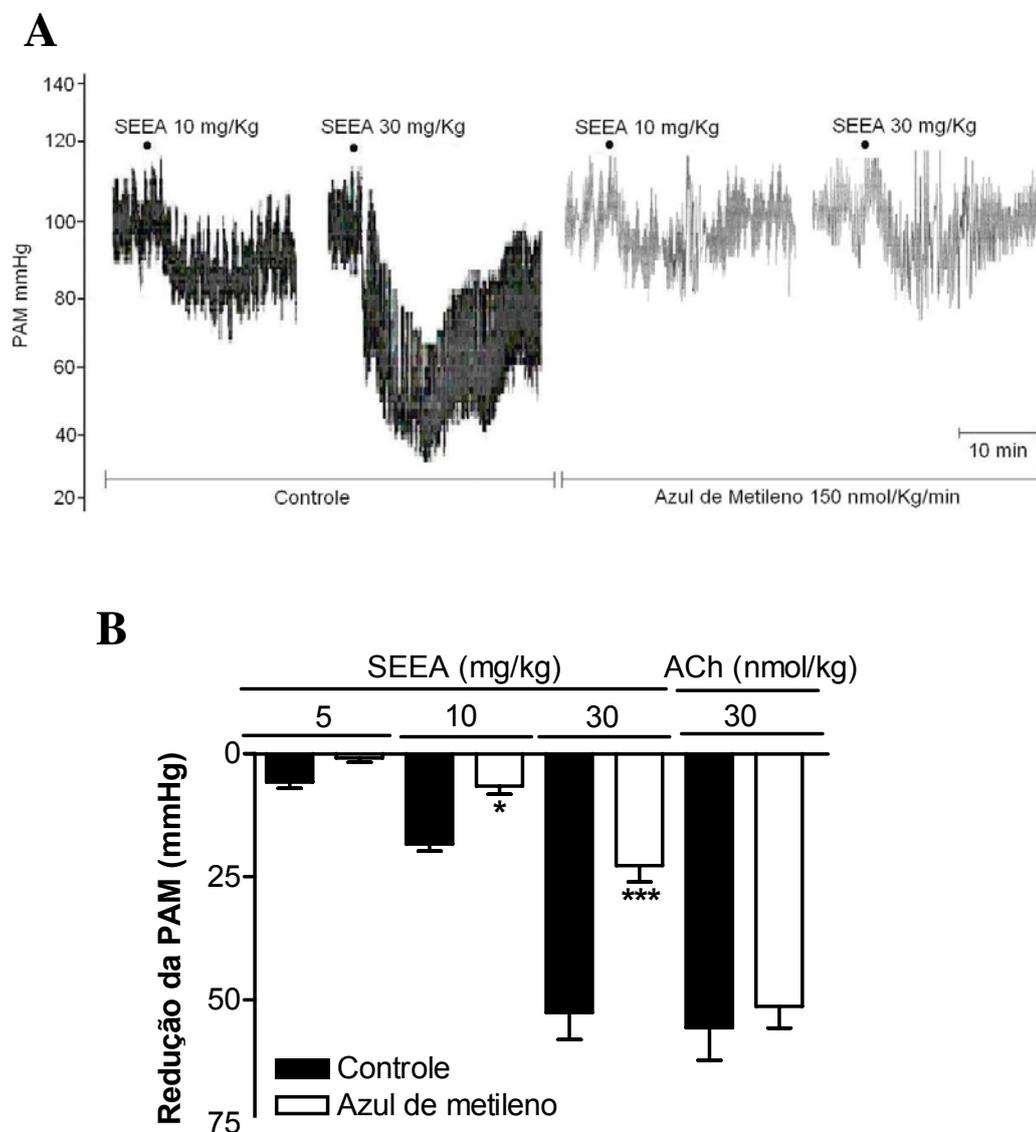


Figura 9: Efeito hipotensor do SEEA na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA (5, 10 e 30mg/kg) ou ACh (30 nmol/kg) e a infusão contínua de azul de metileno (150 nmol/kg/min). **A** – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* (SEEA), nas doses de 10 e 30 mg/Kg na ausência e na presença do azul de metileno; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. A letra “C” indica o grupo sem tratamento com azul de metileno. A comparação estatística entre os grupos foi

realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.7 Envolvimento dos canais de potássio na hipotensão causada pelo SEEA.

Neste conjunto de experimentos os animais tratados com SEEA nas doses de 10 e 30 mg/kg (i.v.) apresentaram redução da PAM de $24,7 \pm 4,1$ e $34,7 \pm 2,1$ mmHg, respectivamente. Na presença do TEA (360 μ mol/kg, i.v.), um bloqueador não seletivo de canais de potássio, houve redução significativa do efeito hipotensor do SEEA, que foi de $3,6 \pm 0,5$ e $12,7 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente (tabela 1). A ACh (30 nmol/kg) causou uma hipotensão de $43,3 \pm 3,7$ e $33,3 \pm 4,3$ mmHg, respectivamente, na ausência e na presença do TEA (Fig. 10A e 10B).

Tabela 1: Efeito do SEEA na ausência e na presença do TEA (360 μ mol/kg)

Redução da PAM (mmHg)					
SEEA (10 mg/kg)		SEEA (30 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	TEA	Controle	TEA	Controle	TEA
$24,7 \pm 4,1$	$3,6 \pm 0,5^{***}$	$34,7 \pm 2,1$	$12,7 \pm 3,2^{***}$	$43,3 \pm 3,7$	$33,3 \pm 4,3$

*** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

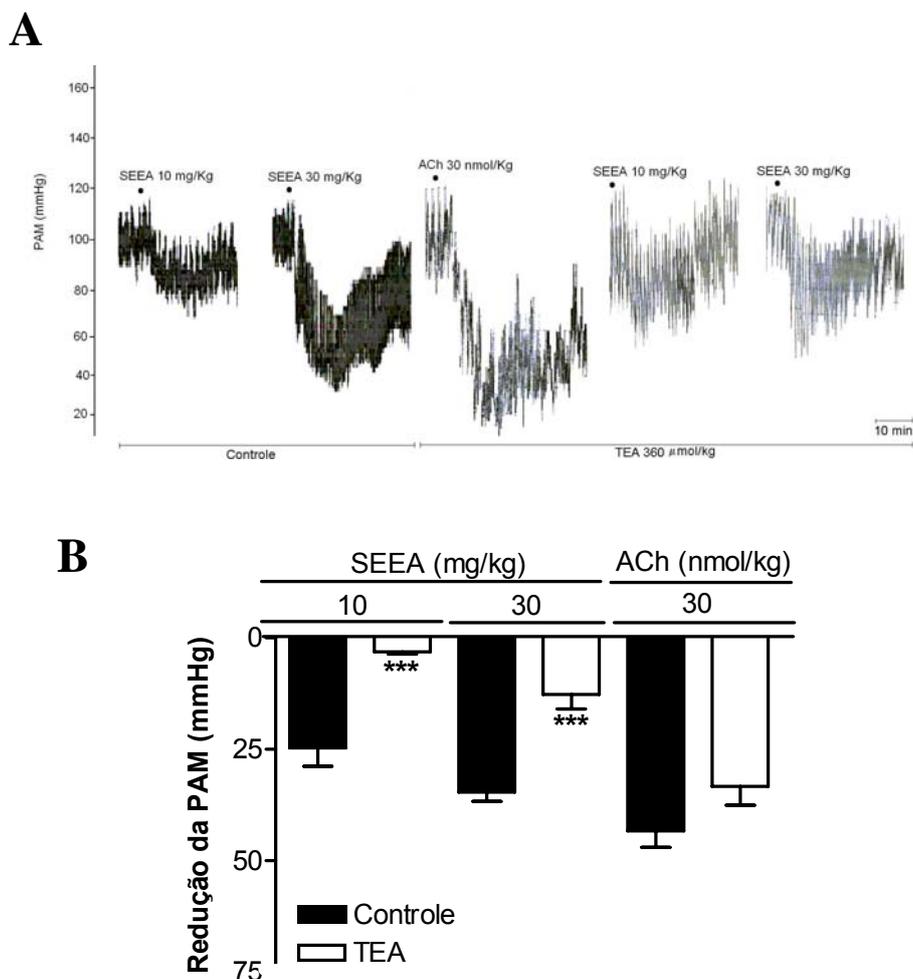


Figura 10: Efeito hipotensor do SEEA na presença do bloqueador, não seletivo, de canais de potássio. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA (10 e 30mg/kg) ou ACh (30 nmol/kg). **A** – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* (SEEA), nas doses de 10 e 30 mg/Kg na ausência e na presença do bloqueador não seletivo de canais de potássio; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. Controle indica o grupo sem tratamento com TEA. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

*** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

O envolvimento dos canais de potássio operados por voltagem no mecanismo de ação do SEEA também foi avaliado. No grupo controle, o SEEA (10 e 30 mg/kg) promoveu, respectivamente, queda de $28,9 \pm 1,6$ e $44,7 \pm 3,5$ mmHg, quando comparadas à PAM basal ($104,0 \pm 2,9$ mmHg). As mesmas doses do SEEA, nos animais tratados com a 4-aminopiridina (bloqueador seletivo de canais K_v), na dose de $2 \mu\text{mol/kg}$, gerou uma redução da PAM em $4,8 \pm 1,6$ e $20,1 \pm 2,1$ mmHg, valores significativamente menores do que os obtidos no grupo controle (tabela 2). A ACh na dose de 30 nmol/kg alterou a pressão arterial em $49,1 \pm 6,4$ ($47,2 \pm 6,1\%$) e $58,9 \pm 5,0$ mmHg ($56,6 \pm 4,8\%$), na ausência e presença da 4-aminopiridina, respectivamente (Fig. 11A e 11B).

Tabela 2: Efeito do SEEA na ausência e na presença de 4-aminopiridina ($2 \mu\text{mol/kg}$).

Redução da PAM (mmHg)					
SEEA (10 mg/kg)		SEEA (30 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	4-AP	Controle	4-AP	Controle	4-AP
$28,9 \pm 1,6$	$4,8 \pm 1,6^{**}$	$44,7 \pm 3,5$	$20,1 \pm 2,1^{***}$	$49,1 \pm 6,4$	$58,9 \pm 5,0$

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

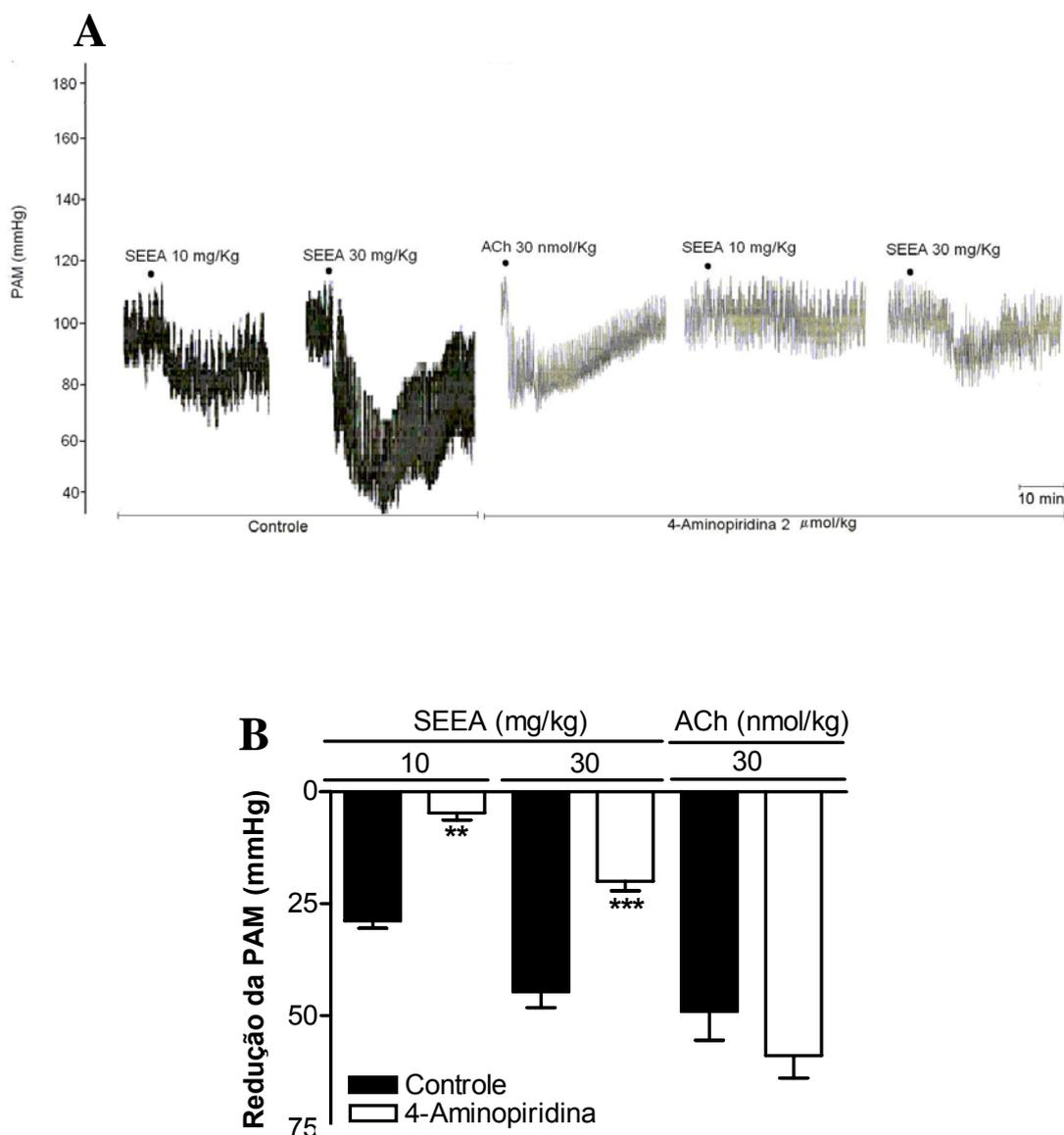


Figura 11: Efeito hipotensor do SEEA na presença do bloqueador de canais de potássio operados por voltagem. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA (10 e 30mg/kg) ou ACh (30 nmol/kg). **A** – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* (SEEA), nas doses de 10 e 30 mg/Kg na ausência e na presença do bloqueador seletivo de canais de potássio operados por voltagem; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. Controle indica o

grupo sem tratamento com 4-aminopiridina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

***p* < 0,01 e *** *p* < 0,001 em relação ao grupo controle.

Na investigação do envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, as doses de 10 e 30 mg/kg do SEEA foram capazes de reduzir a PAM em $26,7 \pm 1,6$ e $39,9 \pm 2,3$ mmHg, respectivamente. Após o tratamento com a glibenclamida 40 $\mu\text{mol/kg}$ (inibidor seletivo dos canais de K_{ATP}) houve redução da ação hipotensora do SEEA. A dose de 10 e 30 mg/Kg do SEEA, reduziu os níveis pressóricos, respectivamente, em $10,5 \pm 3,9$ e $26,7 \pm 2,5$ mmHg (tabela 3).

A redução da PAM causada pela ACh na ausência e na presença da glibenclamida foi, respectivamente, de $44,7 \pm 1,2$ e $48,8 \pm 3,0$ mmHg (Fig 12A e 12B). Os dados foram analisados em comparação à PAM basal do grupo que foi de $104,8 \pm 1,9$ mmHg.

Tabela 3: Efeito do SEEA na ausência e na presença de glibenclamida (40 $\mu\text{mol/kg}$).

Redução da PAM (mmHg)					
SEEA (10 mg/kg)		SEEA (30 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	glib.	Controle	glib.	Controle	glib.
$26,7 \pm 1,6$	$10,5 \pm 3,9^{**}$	$39,9 \pm 2,3$	$26,7 \pm 2,5^*$	$44,7 \pm 1,2$	$48,8 \pm 3,0$

* *p* < 0,05 ; ***p* < 0,01 e *** *p* < 0,001 em relação ao controle.

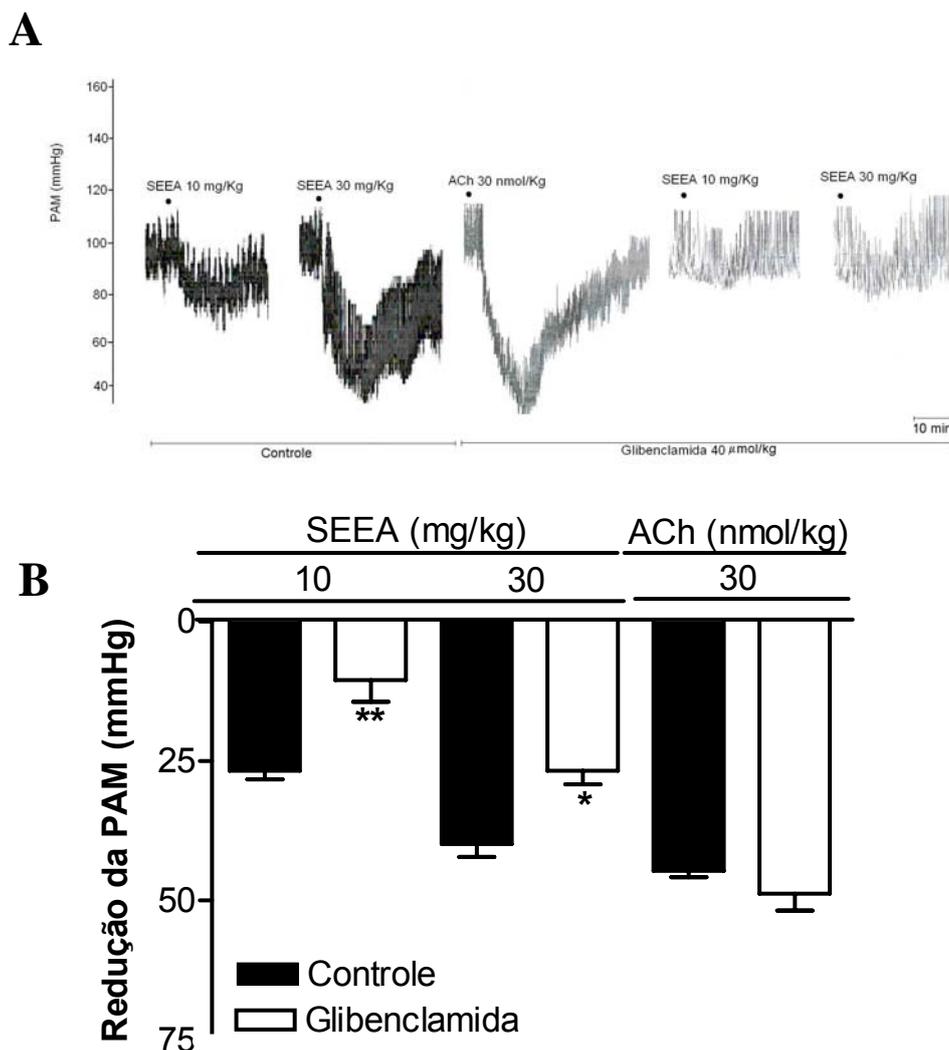


Figura 12: Ação do SEEA na presença de bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), passaram pelo procedimento cirúrgico para implantação das cânulas, através das quais foi realizada a administração da fração SEEA (10 e 30mg/kg) ou ACh (30 nmol/kg). **A** – Registro típico da PAM mostrando o efeito hipotensor do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* (SEEA), nas doses de 10 e 30 mg/Kg na ausência e na presença do bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP; **B** – Redução da PAM (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais submetidos ao mesmo protocolo mostrado no registro típico. Controle indica o grupo sem tratamento com glibenclamida. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.8 Efeito hipotensor da fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE) derivadas do SEEA.

As doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg da FAQ causaram uma redução dos níveis pressóricos de $14,2 \pm 1,8$; $15,9 \pm 2,4$; $22,8 \pm 1,3$ e $28,9 \pm 7,2$ mmHg respectivamente, em relação a PAM basal que foi de $109,5 \pm 2,5$ mmHg (Fig 13A). A salina (0,3 ml) quando administrada por via i.v., promoveu uma alteração da PAM de $4,8 \pm 0,8$ mmHg.

A FAE, nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziu a PAM em $5,2 \pm 1,2$ e $16,6 \pm 4,1$ mmHg. As doses de 20 e 30 mg/kg, da FAE, foram capazes de promover uma hipotensão de $40,8 \pm 5,7$ e $114,3 \pm 7,1$ mmHg respectivamente, em relação a PAM basal dos animais que foi de $110,8 \pm 4,7$ mmHg (Fig 13B). Nos experimentos realizados com esta fração, a dose de 30 mg/kg provocou a morte por hipotensão de quatro dos cinco animais testados (aproximadamente 80% dos animais).

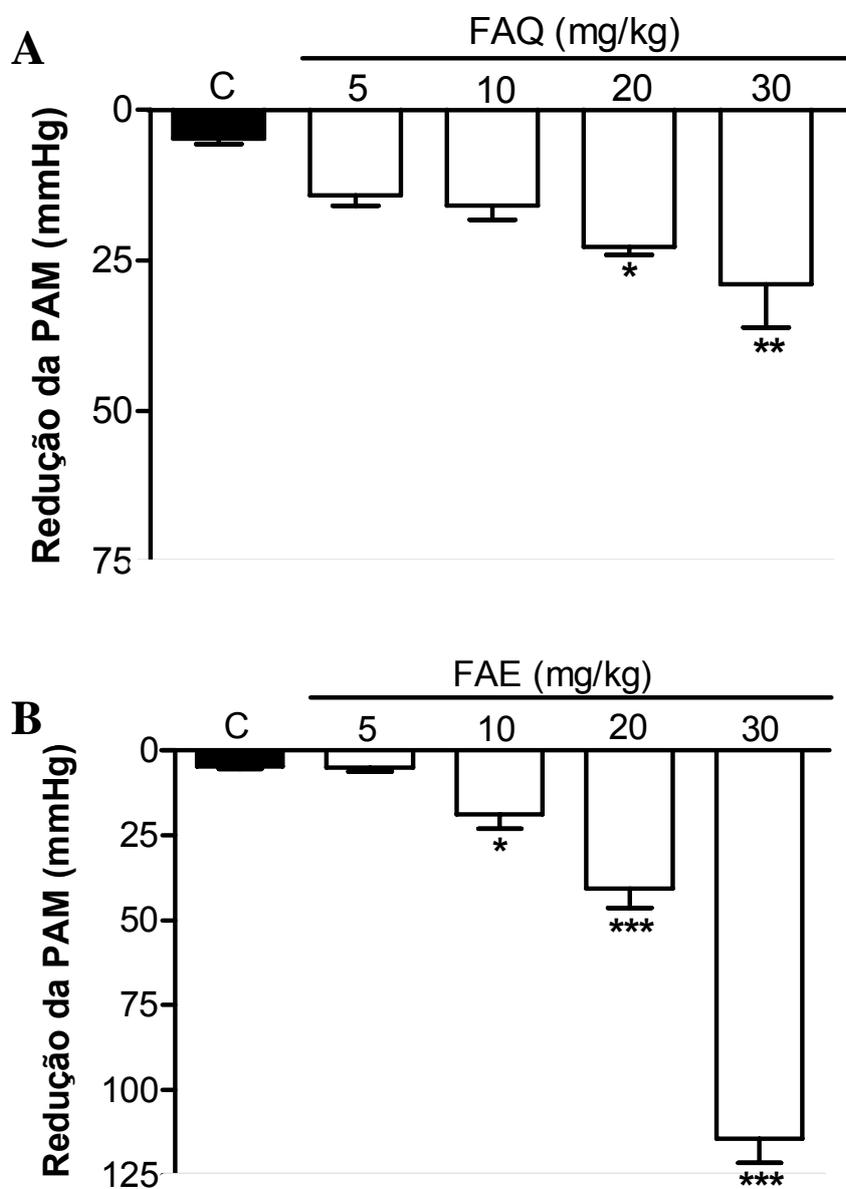


Figura 13: Efeito hipotensor da fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE) derivadas do SEEA em ratos anestesiados. A - Redução da PAM do grupo tratado com FAQ (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais. **B** - Redução da PAM do grupo tratado com FAE (média \pm erro padrão da média) obtida em seis animais. A letra “C” indica a alteração da PAM induzida pela administração de salina. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.9 Participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase no efeito hipotensor da fração acetato de etila.

Na dose de 10 mg/kg, a FAE causou uma hipotensão de $39,0 \pm 4,3$ mmHg. Durante a infusão contínua de L-NAME (7 mg/kg/min), este efeito da FAE foi abolido (houve um bloqueio absoluto da hipotensão causada por esta fração na mesma dose, 10 mg/kg). Não houve alteração da PAM ($0,0 \pm 0,0$ mmHg). A redução da PAM causada pela ACh na ausência e na presença do L-NAME foi a mesma (não foi alterada pelo L-NAME). Os registros mostraram respectivamente $64,9 \pm 3,2$ e $67,8 \pm 1,0$ mmHg (Fig 14A). Os dados na ausência do L-NAME foram analisados em comparação a PAM basal do grupo controle ($110,0 \pm 2,5$ mmHg) e os valores referentes ao grupo tratado com L-NAME foram comparados em relação à PAM deste grupo ($172,5 \pm 1,0$ mmHg).

Na dose de 10 mg/kg, a FAE causou uma hipotensão de $39,0 \pm 4,3$ mmHg. Durante a infusão contínua de azul de metileno (150 nmol/kg/min) este efeito hipotensor da fração foi abolido. O azul de metileno impediu a resposta hipotensora da FAE. A alteração da PAM foi de $1,3 \pm 0,9$ mmHg. A hipotensão causada pela ACh na ausência e na presença do azul de metileno foi semelhante, respectivamente, de $49,5 \pm 8,2$ e $51,3 \pm 4,5$ mmHg (Fig 14B). Os dados foram analisados em comparação com a PAM basal do grupo ($123,7 \pm 2,1$ mmHg).

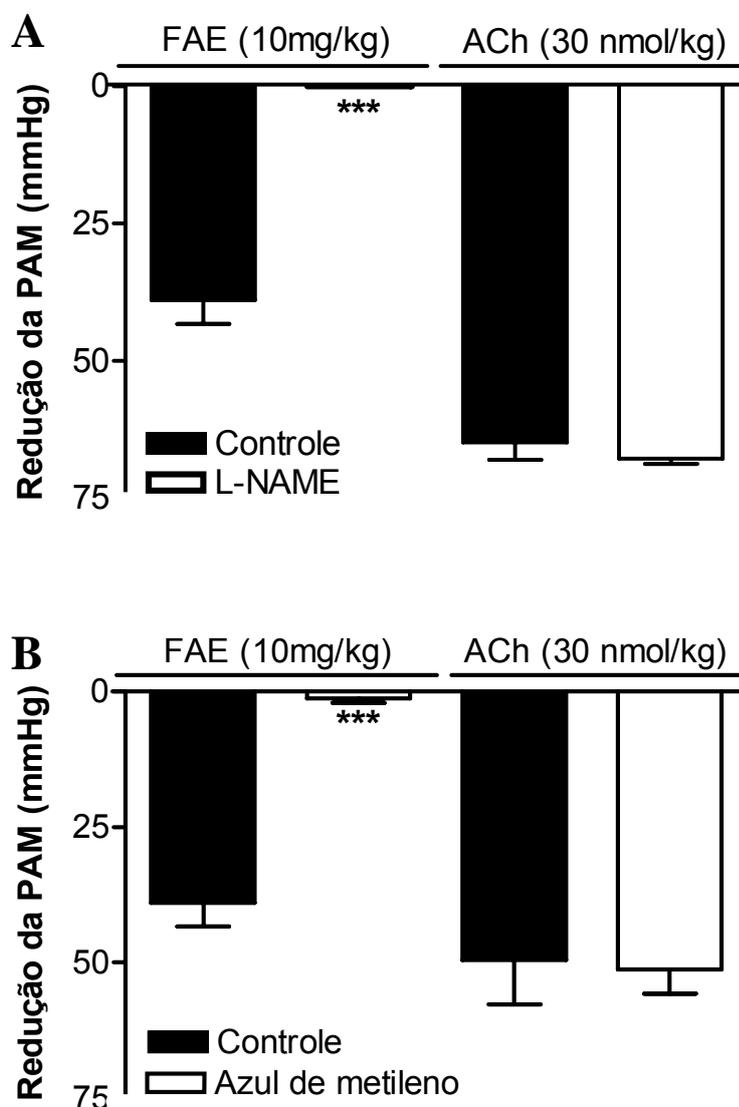


Figura 14: Efeito hipotensor da fração acetato de etila (FAE) na presença do L-NAME ou azul de metileno. A - Resposta ao FAE (10mg/kg) e a ACh (30 nmol/kg) na ausência e presença de L-NAME. **B** – Resposta ao FAE (10mg/kg) e a ACh (30 nmol/kg) na ausência e presença de L-NAME. Controle indica os animais que não receberam azul de metileno. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

*** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

4.10 Participação dos canais de Potássio na hipotensão causada pela FAE.

A FAE na dose de 10 mg/kg promoveu uma redução da PAM de $39,0 \pm 4,3$ mmHg. Na presença do TEA ($360 \mu\text{mol/kg}$) a hipotensão gerada foi de $8,3 \pm 2,8$ mmHg. Na ausência e na presença do TEA a ACh alterou a PAM de forma semelhante, em $55,8 \pm 6,1$ e $65,4 \pm 4,7$ mmHg, respectivamente (Fig. 15A e tabela 4). Os dados foram avaliados em comparação a PAM basal do grupo todo que foi de $103,8 \pm 3,9$ mmHg.

Após a administração da FAE (10mg/kg – i.v.), a PAM do grupo controle (sem a 4-aminopiridina) e dos animais que receberam a 4-aminopiridina ($2 \mu\text{mol/kg}$) foi respectivamente de $39,0 \pm 4,3$ e $1,8 \pm 0,5$ mmHg. A ACh (30 nmol/kg) causou uma hipotensão (semelhante) de $52,6 \pm 6,6$ e $58,9 \pm 5,1$ mmHg, respectivamente, na ausência e na presença da 4-aminopiridina (Fig. 15B e tabela 5). A redução da PAM foi analisada em comparação com os níveis pressóricos basais do grupo, $102,6 \pm 1,0$ mmHg.

A administração da glibenclamida ($40 \mu\text{mol/kg}$, i.v.) também foi capaz de reduzir a hipotensão causada pela FAE. Na ausência e na presença da glibenclamida, a FAE a 10 mg/kg causou uma hipotensão de $39,0 \pm 4,3$ e de $20,5 \pm 5,4$ mmHg, respectivamente. A redução da PAM causada pela ACh na ausência e na presença da glibenclamida foi semelhante, respectivamente, de $44,7 \pm 1,2$ e $48,8 \pm 3,0$ mmHg (Fig 15C e tabela 6). Os dados foram avaliados em comparação a PAM basal do grupo ($105,1 \pm 2,7$ mmHg).

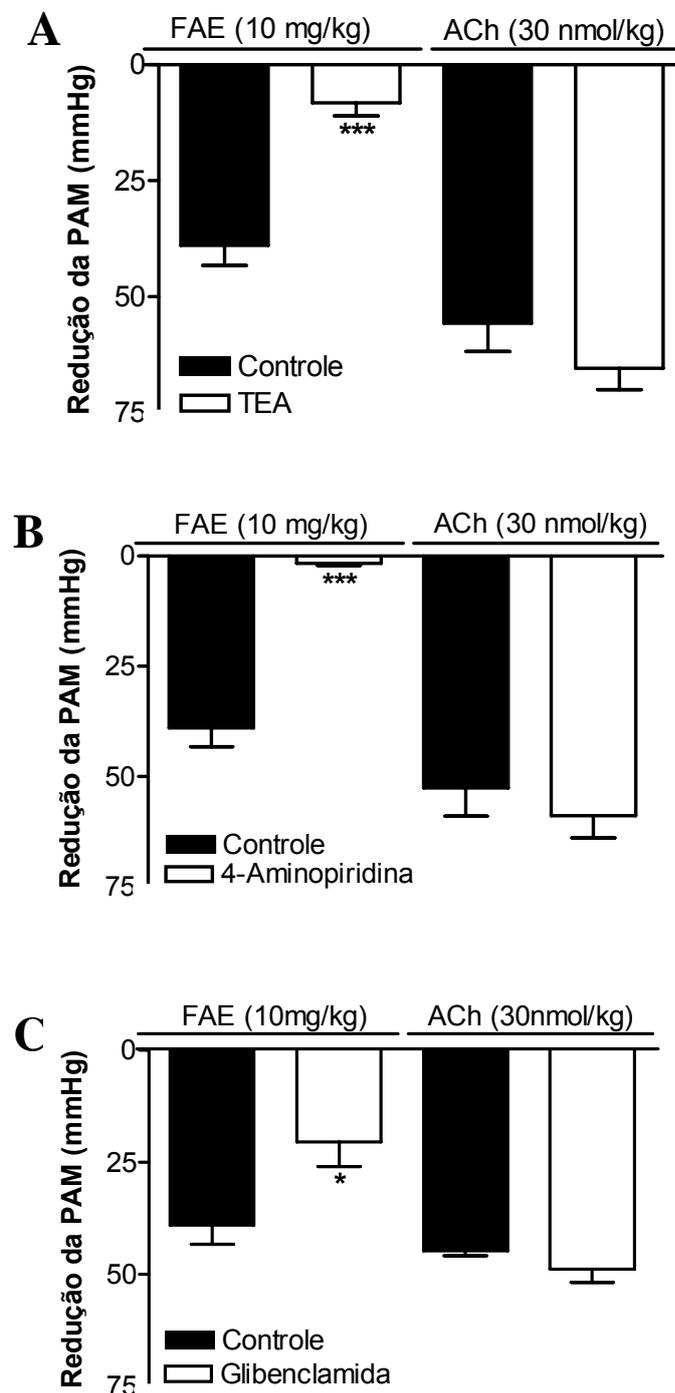


Figura 15: Ação do FAE na presença de bloqueadores de canais de potássio. A - resposta ao FAE (10 mg/kg) e da ACh (30 nmol/kg) na ausência e presença do TEA (360 μ mol/kg). **B** - resposta da ACh e FAE na presença desse bloqueador de canais de potássio ativados por voltagem (4-aminopiridina – 2 μ mol/kg). **C** - resposta do FAE e da

ACh na presença desse bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP (glibenclamida – 40 $\mu\text{mol/kg}$). Controle indica os animais que não receberam tratamento com os bloqueadores de canais de potássio. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* de Bonferroni.

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

Tabela 4: Efeito do FAE na ausência e na presença do TEA (360 $\mu\text{mol/kg}$).

Redução da PAM (mmHg)			
FAE (10 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	TEA	Controle	TEA
37,6 \pm 4,1	8,3 \pm 2,8***	55,8 \pm 6,1	65,4 \pm 4,7

Tabela 5: Efeito do FAE na ausência e na presença da 4-Aminopiridina (2 $\mu\text{mol/kg}$).

Redução da PAM (mmHg)			
FAE (10 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	4-Aminopiridina	Controle	4-Aminopiridina
39,0 \pm 4,3	1,8 \pm 0,5***	52,6 \pm 6,6	58,9 \pm 5,1

Tabela 6: Efeito do FAE na ausência e na presença da glibenclamida (40 $\mu\text{mol/kg}$).

Redução da PAM (mmHg)			
FAE (10 mg/kg)		ACh (30 nmol/kg)	
Controle	Glibenclamida	Controle	Glibenclamida
39,0 \pm 4,3	20,5 \pm 5,4*	44,7 \pm 1,2	48,8 \pm 3,0

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

V DISCUSSÃO

A *M. ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira santa, é uma planta amplamente utilizada na medicina popular tanto no Brasil, como em muitos outros países como Paraguai, Uruguai e Argentina (ARENAS *et al.*, 1977; MARTINEZ-CROVETTO, 1987; SCHULTES, *et al.*, 1990; BRUNETON, 1995; CORDEIRO, 2006) apesar de ampla utilização poucos estudos científicos foram desenvolvidos para validar o uso popular desta planta.

O interesse medicinal mais comumente associado a *M. ilicifolia* é o tratamento de gastrites e úlceras gástricas e duodenais (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991). Essas indicações do uso popular do chá preparado com as folhas da *M. ilicifolia* foram comprovadas cientificamente por vários autores (CARLINI *et al.*, 1988; FALEIROS *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2006) Recentemente, CIPRIANI *et al.* (2006) mostrou a ação antiulcerogênica de um polissacarídeo (arabinogalactana) oriundo do chá (infusão) das folhas da *M. ilicifolia*, em roedores. Além disso, BAGGIO *et al.* (2007a) confirmou que flavonóides da *M. ilicifolia* tem ação protetora sobre a mucosa gástrica de roedores através da inibição da atividade da bomba hidrogênio potássio ATPase (H^+K^+ -ATPase) e da formação de óxido nítrico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluiu a *M. ilicifolia* na lista de registro simplificado de fitoterápicos, liberando a comercialização sem prescrição médica das folhas desta planta no tratamento das dispepsias e como coadjuvante no tratamento de úlcera gástrica (Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004). ITOKAWA *et al.* (1991), isolou os compostos triterpênicos friedelina e friedelanol a partir da fração hexânica das folhas da *M. ilicifolia*. Mais tarde, FALEIROS *et al.*, (1992) comprovou que esses compostos são responsáveis por 50% do efeito

antiulcerogênico da *M. ilicifolia*. OLIVEIRA *et al.* (1994) observou que as substâncias 4-O-metil - epigallocatequina e seu epímero 4'-O-metil-ent-galocatequina, isoladas do extrato aquoso de *M. ilicifolia*, reduziram a secreção gástrica de ácido.

Sabidamente, dentre os mecanismos de proteção da mucosa gástrica, destaca-se o aporte sangüíneo para a região, responsável principalmente pelo transporte de fatores de proteção e retirada de fatores agressivos do local. Considerando os resultados de proteção gástrica efetiva deste extrato através de múltiplos fatores, o grupo passou a estudar a ação destas frações sobre o sistema vascular. RATTMANN *et al.* (2006) demonstraram uma potente ação relaxante do sobrenadante etanólico da extração aquosa da *M. ilicifolia* (SEEA) em aorta isolada de rato. Ao estudar o mecanismo de ação farmacológico foi observado que o efeito vasorrelaxante ocorre por estimulação da via L-arginina-óxido nítrico e subsequente ativação de canais de potássio. Em testes posteriores com aorta isolada de rato, a fração insolúvel em acetato de etila, obtida a partir do SEEA apresentou um efeito vasorrelaxante consideravelmente maior, em concentrações menores, o que sugeriu proximidade do isolamento do composto, possivelmente um polifenol, um flavonóide do tipo catequina.

Como o efeito vasorrelaxante observado *in vitro* pode ser neutrazilado ou minimizado por mecanismos fisiológicos *in vivo* resultando em pouco ou nenhum efeito hipotensor, passamos a estudar as frações de *M. ilicifolia* no modelo de pressão arterial em ratos normotensos que permite avaliar inclusive a participação de outros mecanismos na ação envolvidos no efeito vasorrelaxante.

Os resultados deste estudo demonstram que a administração endovenosa das frações sobrenadante etanólico da infusão (SEI), sobrenadante etanólico da

extração aquosa (SEEA), fração aquosa (FAQ) ou fração acetato de etila (FAE) obtidas de *M. ilicifolia* reduzem significativamente a pressão arterial média de animais normotensos anestesiados. Este estudo demonstrou também que a ação hipotensora das frações SEEA e FAE da *M. ilicifolia* parecem envolver a produção de óxido nítrico e a abertura de canais de potássio. Os resultados do presente estudo são relevantes tendo em vista a grande utilização dessa planta pela população.

Os resultados deste trabalho mostram que todas as frações purificadas da *M. ilicifolia* (SEI e SEEA) quando administradas intravenosamente nas doses que variam de 10 - 30 mg/kg, apresentaram atividade hipotensora, *in vivo* (Figuras 3 e 4). Entretanto, a administração por via intravenosa do SEEA, apresentou melhor eficácia em causar hipotensão do que o SEI. Além disso a ação do SEEA foi dependente da dose, sugerindo que algum composto da planta provavelmente age em um alvo farmacológico, seja ele um receptor, uma enzima, um canal iônico ou outro alvo. (Figura 4). Apesar de ser uma fração semi-purificada, o SEEA, quando administrado por via intravenosa, apresentou ação hipotensora, consideravelmente potente, em baixas doses sugerindo a presença de compostos com potência elevada quando comparados a compostos químicos isolados de plantas. A exemplo disso, o rotundifolone, o maior constituinte do óleo essencial da *Mentha villosa* foi capaz de promover redução da pressão arterial de ratos normotensos anestesiados com doses de 1, 5, 10, 20 e 30 mg/kg (GUEDES, *et al.*, 2002).

Observou-se que o tempo necessário para o retorno da PAM para os valores basais após a administração endovenosa de cada fração foi relativamente curto, mas diretamente relacionada à hipotensão produzida por cada dose (dados

não mostrados). Este retorno a PAM basal em curto (de 2 à 15 minutos, de acordo com a dose) prazo demonstra que o efeito hipotensor é reversível (dado farmacologicamente importante porque o efeito hipotensor não vai inativar o alvo para sempre) e/ou pode estar relacionado a uma biotransformação rápida do SEEA. Além disso, a reversão rápida do efeito sugere a ausência de lesão tissular. A manutenção da hipotensão característica de cada dose mesmo quando o SEEA foi administrado em seqüências alternadas nos mesmos animais também nos sugere um efeito específico e não lesivo.

Uma variedade de efeitos fisiológicos das catecolaminas são mediados pelos receptores α_1 -adrenérgicos. Dentre esses efeitos destacam-se glicogenólise, a contratilidade do trato urinário e a pressão arterial (CAVALLI, *et al.*, 1997). Assim, além de testarmos o SEEA em ratos normotensos, buscamos analisar a ação dessa fração em ratos com a PAM média elevada, o que poderia se assemelhar a uma condição de hipertensão transitória ou aguda. Para isso utilizamos a infusão contínua de fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico) que determina um aumento na PAM e uma bradicardia reflexa (PARATI *et al.*, 1995). De acordo com a literatura, esse modelo de infusão contínua é utilizado para administrar drogas em pequenas quantidades e de uma forma lenta e permanente. SILVA-SANTOS e colaboradores (1999) usaram a técnica para infundir outras drogas (doadores de NO) e na presença destas administrar fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg). A dose de fenilefrina que usamos (20 nmol/kg/min) foi escolhida por promover elevação da PAM sustentada por um período de tempo suficiente para realizar a administração do SEEA em intervalos determinados.

Como a administração endovenosa do SEEA obtida da *M. ilicifolia* teve maior potência e maior eficácia do que o SEI resolvemos testar o SEEA no

aumento da pressão arterial induzido pela fenilefrina em ratos. A administração intravenosa de 5 ou 10 mg/kg do SEEA obtida de *M. ilicifolia*, promoveu efeito semelhante na presença e na ausência da fenilefrina, indicando que estas concentrações de princípios ativos presentes no SEEA são insuficientes para alterar a hipertensão induzida pela fenilefrina em ratos. (Figura 5). Entretanto, o SEEA na dose de 30 mg/kg causou hipotensão nos animais com pressão arterial aumentada pela presença da fenilefrina. Este efeito foi menor do que o obtido no grupo controle (sem fenilefrina), porém foi semelhante àquela causada pela ACh na presença da fenilefrina (dados não mostrados). Estes dados mostram que a ACh e o SEEA apresentaram intensidade de ação semelhante na presença da fenilefrina.

O sistema nervoso central é conhecido por influenciar diretamente a pressão arterial, em grande parte, por ações do sistema nervoso simpático e parassimpático - nervo vago (COLOMBARI, *et al.*, 2001). A ação central ou reflexa de nervos simpáticos periféricos causa vasoconstrição que pode aumentar a resistência vascular periférica mantendo ou elevando a pressão arterial. Esse processo garante ao organismo a perfusão adequada dos tecidos em diversas situações cotidianas (GIANNATTASIO, *et al.*, 2007). MCQUEEN *et al.*, (2007), através da técnica da vagotomia (secção bilateral do nervo vago) investigaram a participação do nervo vago nas alterações respiratórias, migração de neutrófilos para os pulmões e pressão arterial. MEDEIROS *et al* (2006) utilizaram a mesma técnica para avaliar o efeito do extrato de folhas de *Sida cordifolia* no sistema cardiovascular e, observaram que ratos vagotomizados tinham uma redução da resposta hipotensora. Assim através da secção bilateral do nervo vago buscamos investigar a participação da transmissão vagal no efeito do SEEA na PAM.

Nossos resultados indicam que a hipotensão causada por esta fração parece ocorrer de forma independente da transmissão vagal, pois o SEEA não foi capaz de alterar a resposta pressórica dos animais que sofreram secção bilateral do nevo vago (Figura 6).

De acordo com MEDEIROS e colaboradores (2006) um extrato pode estimular o nervo vago e este ativar outros mecanismos como, por exemplo, os receptores muscarínicos. Ou ainda, um extrato vegetal ou fração pode atuar diretamente sobre esses receptores levando a uma hipotensão. O extrato de folhas de *Sida cordifolia* parece estar agindo dessa forma, sobre o nervo vago ou diretamente sobre os receptores muscarínicos endoteliais (MEDEIROS, *et al.*, 2006). Para avaliar a participação desses receptores na hipotensão gerada pelo SEEA utilizamos a atropina (antagonista de receptores muscarínicos) e observamos que na presença desse antagonista não houve mudança significativa da resposta ao SEEA (Figura 7B). Esse dado nos sugere que a fração SEEA promove ação hipotensora sem a participação dos receptores muscarínicos, de forma significativa.

Outro fator importante no controle da PAM são os receptores β -adrenérgicos, que tem um papel fisiológico importante na regulação do tônus vascular. A ativação de receptores β -adrenérgicos periféricos conduz a um relaxamento do músculo liso vascular, participando assim do controle da resistência vascular periférica e a distribuição de sangue para os diferentes órgãos (GUIMARÃES *et al.*, 2001). A participação desses receptores, na hipotensão causada pelo SEEA, foi avaliada por meio da utilização do propranolol (bloqueador de receptores β -adrenérgicos). Quando administrado na presença

dessa droga não houve modificação da PAM (Figura 7A) indicando que a ação do SEEA não envolve de forma significativa a participação desses receptores.

Como RATTMANN, *et al.*, (2006) já haviam investigado a participação de outros receptores situados na membrana das células endoteliais, como receptores bradicinérgicos e histaminérgicos e verificaram que estes não interferem na resposta vasorrelaxante do SEEA, optamos por não investigar a participação desses receptores neste estudo, porém, caso haja necessidade, outros receptores poderão ser estudados posteriormente.

Mediadores endoteliais, como o NO, contribuem ativamente para o controle da homeostase vascular. O NO foi denominado, inicialmente como fator relaxante derivado do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). O NO é conhecido por participar de várias funções fisiológicas como neurotransmissão, imunomodulação, vasodilatação, dentre outras várias atividades (MONCADA *et al.*, 1991; BREDT *et al.* 1992). Alguns receptores quando estimulados por ligantes específicos ativam a fosfolipase C (PLC) através de uma proteína G. A PLC, promove a hidrólise dos fosfolipídios de membrana (fosfatidil-inositol-bifosfato – PIP₂) e os converte em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (Griffith *et al.*, 1984). O IP₃ libera o cálcio dos estoques intracelulares, o qual forma um complexo com a calmodulina (MONCADA *et al.*, 1989). Nas células endoteliais, este complexo cálcio-calmodulina ativa a enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e esta cataliza a reação de produção do NO a partir do substrato L-arginina (OPIE, 1998). De acordo com ARCHER *et al.*, (1994), ao se difundir para a musculatura lisa vascular, o NO parece promover modificações na interação dos filamentos de actina e miosina, e ainda, modular a função de canais iônicos da membrana das células musculares lisas.

Para analisarmos a participação do óxido nítrico no efeito hipotensor induzido pelo SEEA utilizamos o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME). Na presença desta substância houve uma redução da hipotensão causada pelo SEEA (Figura 8A e 8B) sugerindo que o NO tem importante participação na redução da PAM gerada pelo SEEA. RATTMANN e colaboradores (2006) já haviam observado, através de testes *in vitro*, algumas vias envolvidas no mecanismo de ação dos SEEA e sugerido uma importante participação através da liberação de óxido nítrico. Esses dados corroboram com os nossos resultados indicando que o NO tem papel fundamental também na ação hipotensora promovida pelo SEEA, *in vivo*.

Existem algumas drogas como o nitroprussiato de sódio e a nitroglicerina que não estimulam a produção do NO através da NOS e sim, tem a capacidade de doar NO ao organismo (IGNARRO, 2002). Sendo assim, buscamos investigar a possibilidade do SEEA estar agindo através deste mecanismo. Para isso utilizamos um protocolo em que administramos nitroglicerina na presença do L-NAME e observamos que não houve diferença na resposta hipotensora desse doador de NO na presença do inibidor da NOS. A ACh, utilizada como controle, também não apresentou alteração de resposta na presença do L-NAME. Entretanto o SEEA teve sua resposta inibida quando administrado em animais tratados com L-NAME (Figura 8C) sugerindo que o SEEA não se comporta como um doador de NO, mas que precisa da NOS para produzir os seus efeitos hipotensores.

O mecanismo de ação pelo qual o NO causa vasodilatação, tem o envolvimento e ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (STONE *et al.*, 1995). Essa enzima converte o nucleotídeo GTP em GMPc (IGNARRO *et al.*,

1987). O GMPc causa vasorrelaxamento periférico por ativar a proteína quinase dependente do GMPc (PKG). A PKG ativada fosforila várias proteínas alvo importantes, como canais iônicos, receptores e enzimas, conduzindo a diminuição de cálcio intracelular e relaxamento das células musculares lisas (FRIEBE *et al.*, 2003). A PKG também é descrita por inibir a MLCK que, da mesma forma, causa relaxamento do músculo liso e conseqüente, vasodilatação (VAN RIPER *et al.*, 1997). A participação da GC na ação hipotensora do SEEA foi também avaliada através do azul de metileno, um inibidor da dessa enzima. O azul de metileno foi capaz de inibir de forma considerável a ação hipotensora causada pelo SEEA (Figura 9) sugerindo que o SEEA estimula a produção de NO e este ativa a guanilato ciclase solúvel, dando início a vasodilatação.

O NO pode participar da modulação de canais de potássio através do GMPc, da PKG (STANDEN *et al.*, 1998), ou ainda por ação direta do óxido nítrico sobre os canais iônicos, incluindo canais de potássio (BOLOTINA *et al.*, 1994). Os canais de K⁺ são bem conhecidos por relaxar a musculatura dos vasos sanguíneos através da hiperpolarização da membrana, que causa uma diminuição na probabilidade dos canais de cálcio dependentes de voltagem estarem no estado aberto e, dessa forma, reduz os níveis de Ca⁺² intracelular (TANAKA *et al.*, 2000; WELLMANN, 2006). O influxo de Ca⁺² extracelular tem papel importante na contração do músculo liso vascular (WANG, *et al.*, 2008), pois a MCLK fosforila diretamente a miosina de cadeia leve (MCL) em resposta ao aumento nas concentrações de Ca⁺² (GALLAGHER *et al.*, 1997; KAMM *et al.*, 2001). Dessa forma a diminuição das concentrações de Ca⁺² intracelular reduz a atividade da MCLK. Sem a fosforilação da MCL pela MCLK, não há interação com os filamentos de actina, resultando no relaxamento do músculo liso vascular.

Por esse motivo, avaliou-se a participação dos canais de K^+ no efeito do SEEA e da FAE. Para isso foram utilizados três diferentes bloqueadores de canais iônicos: o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo de canais de K^+ ; 4-aminopiridina, um bloqueador seletivo de canais de K^+ ativados por voltagem e a glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de K^+ sensíveis ao ATP. Na presença do TEA ou da 4-aminopiridina a hipotensão causada pelo SEEA foi inibida de forma considerável, confirmando o envolvimento dos canais de K^+ no mecanismo de ação das substâncias presentes no SEEA e, ainda a participação dos canais de K^+ ativados por voltagem na ação hipotensora dessas frações (Figura 10 e 11; tabela 1 e 2). Quando essas mesmas frações foram administradas em presença da glibenclamida, tiveram sua ação hipotensora inibida (Figura 12; tabela 3). Porém essa inibição foi menor do que aquela causada pelos demais bloqueadores. Esse dado nos indica que existe o envolvimento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP na hipotensão causada pelo SEEA. De acordo com ZYGMUNT *et al.*, (1996) resultados como estes podem indicar que vários tipos de canais de K^+ estão envolvidos na hiperpolarização e no relaxamento dependente de endotélio. RATTMANN *et al.*, (2006) já haviam descrito o envolvimento dos canais de potássio no relaxamento de aorta isolada de rato promovido pelo SEEA, corroborando nossos resultados e reforçando a hipótese da importante participação desses canais iônicos na hipotensão causada pelo SEEA. Reforçando ainda mais esta hipótese, STANDEN e colaboradores (1998) sugerem que, substâncias que, de algum modo, ativem a guanilato ciclase podem hiperpolarizar o músculo liso através da ativação dos canais de K^+ .

Também testamos a FAE (fração obtida a partir do SEEA) para verificar sua ação sobre os níveis pressóricos dos animais e comparar seus efeitos com

aqueles do SEEA. Observamos que esta fração causa uma hipotensão maior quando comparada com o SEEA. Também testamos a fração FAQ, entretanto essa fração produziu uma hipotensão menor que o SEEA, enquanto a FAE apresentou a maior redução dos níveis pressóricos dos animais normotensos (Figura 13). Essa potencialização do efeito fica mais evidente à medida que as doses são aumentadas. Ainda em relação à FAE, a dose de 30 mg/kg gera uma hipotensão acentuada e persistente, que causa a morte de 80% dos animais utilizados neste experimento. Esses dados nos sugerem que compostos biologicamente ativos na PAM podem estar em maior concentração na FAE do que nas demais frações testadas. No entanto, não podemos descartar a hipótese de que esta fração contenha compostos/produtos utilizados no seu isolamento, fracionamento e que sejam responsáveis pela morte dos animais. Ao investigarmos o mecanismo de ação envolvido no efeito hipotensor da FAE observamos que essa fração parece agir pelas mesmas vias da fração SEEA, ou seja, NO/GMPc/canais de K^+ (Figuras 14 e 15; tabela 4).

Vários metabólitos com potenciais propriedades biológicas estão presentes no chá das folhas da *M. ilicifolia*, incluindo flavonóides, triterpenos como friedelina e friedelanol (ALBERTON, *et al.*, 2002; CARVALHO, 2006) e sesquiterpenos. Algumas das descrições que destacam as ações destes compostos são as de MAHATO, *et al.*, (1988) que sugerem que os triterpenos têm atividades antimicrobiana, antiinflamatória, citotóxica e ainda sobre o sistema cardiovascular. Outros pesquisadores também evidenciaram a ação hipotensora do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. Tal efeito foi atribuído ao terpeno-4-ol, maior constituinte desse óleo essencial (LAHLOU, *et al.*, 2002). JIAO, *et al.*, (2007) sugerem que o composto isolado friedelina promove uma resposta vasodilatadora

em aorta torácica de rato. Alguns estudos mostraram a presença de diversos tipos de flavonol-3-O-glicosídeo como a rutina, quercetina, hiperosídeo, isoquercitina e kaempferol. De acordo com ERLUND, *et al.*, (2000) a quercetina e a rutina são usados em muitos países como vasoprotetores e são ingredientes de muitas preparações vitamínicas e remédios fitoterápicos. FORMICA, *et al.*, (1995) sugerem que a quercetina tem ação antiinflamatória, além de prevenir a formação de placas ateroscleróticas e a agregação plaquetária. Também promove relaxamento do músculo liso vascular. Ainda parece ter ação antiviral e propriedades carcinostáticas.

Em investigações mais recentes DE SOUZA *et al.*, (2008) demonstraram que a fração SEEA possui afzelequina, epiafzelequina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e taninos condensados. LORENZ *et al.*, (2004) descreveram efeito vasorrelaxante para epigalocatequina-3-galato, obtida do chá verde. Essa atividade foi relacionada à ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial. Destacamos aqui que a ação vasorrelaxante, *in vitro*, provocada pelo SEEA também é dependente de óxido nítrico (RATTMANN, *et al.*, 2006).

Diversas classes de metabólitos secundários com atividade hipotensora poderiam estar presentes nestas frações da espinheira santa estudadas por nós. Dentre estas classes, os compostos fenólicos são especialmente importantes em função das várias atividades biológicas a eles atribuídas e também por inibirem parâmetros importantes para o sistema cardiovascular. Alguns autores sugerem que a presença de polifenóis em plantas está relacionada a efeitos cardiovasculares benéficos (HERTOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1996).

Existem estudos sugerindo que polifenóis oriundos do vinho tinto reduzem o desenvolvimento de aterosclerose em modelos experimentais (VINSON, *et al.*,

2001; BENTZON, *et al.*, 2001; AUGER, *et al.*, 2002). Esses polifenóis do vinho ou de extrato de suco de uva reduzem a pressão arterial em modelos de ratos hipertensos através do tratamento com L-NAME e acetato desoxicorticosterona (DOCA-salt) sal (SOARES DE MOURA, *et al.*, 2002; BERNATOVA, *et al.*, 2002). SARR e colaboradores (2006) sugerem que os polifenóis do vinho reduzem a hipertensão e a disfunção endotelial induzida pela infusão de angiotensina II (Ang II) em ratos. Esses pesquisadores atribuem tal ação à habilidade desses compostos polifenólicos em prevenir o estresse oxidativo vascular pela inibição da expressão da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase.

ZDUNCZYK *et al.* (2002) verificaram que extratos de catequina, obtidos do chá verde, adicionados à dieta de ratos tiveram efeitos benéficos em reduzir o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Outro estudo sugere que a administração oral de flavonóides da planta *Spergularia purpúrea* exibe atividade diurética e antihipertensiva (JOUAD *et al.*, 2001). De acordo com MARON (2007) os polifenóis inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, reduzem trombose, melhoram a função endotelial e reduzem a inflamação. Em estudos realizados por LORENZ *et al.*, (2004) ficou sugerido que a catequina é capaz de estimular óxido nítrico sintase endotelial.

Com estas informações e os nossos resultados podemos sugerir que a catequina e seus derivados presentes na fração SEEA podem estar em maior concentração na FAE e, desta maneira promovem a hipotensão de forma dependente de óxido nítrico.

Nossos estudos nos permitem sugerir que o SEEA e a FAE, através de um mecanismo ainda não esclarecido, estimula a liberação de NO sintetizado pela eNOS. O NO se difunde pelas membranas celulares e ativa diretamente a enzima

guanilato ciclase solúvel a qual converte GTP em GMPc, dando início a uma cascata de eventos que pode envolver a ativação da PKG e conseqüentemente a inibição da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) promovendo o relaxamento da vasculatura lisa vascular e ocasionando a hipotensão. Também confirmamos a participação dos canais de potássio da membrana das células musculares lisas, os quais podem ser ativados diretamente pelo NO, bem como pelo GMPc e pela PKG, levando a uma hiperpolarização e conseqüentemente vasodilatação e hipotensão.

VI CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

- As frações da *M. ilicifolia* possuem um ou mais componentes químicos (princípios ativos) capazes de promover redução da pressão arterial média;
- A administração via intravenosa da fração SEEA produz hipotensão dependente da dose;
- A resposta hipotensora induzida pelo SEEA não envolve, de forma significativa, a transmissão vagal;
- A redução da pressão arterial causada pelo SEEA não envolve, de forma significativa, a participação dos receptores muscarínicos e dos receptores β -adrenérgicos;
- A fração acetato de etila (FAE) é mais eficiente em promover hipotensão quando comparada ao SEEA;
- A fração aquosa (FAQ) foi capaz de promover hipotensão menor do que a fração acetato de etila;

- A ação hipotensora induzida pelo SEEA e pela FAE é dependente da produção do óxido nítrico pela NOS, bem como da estimulação da enzima guanilato ciclase;

- Canais de potássio estão envolvidos no efeito hipotensor produzido pelo SEEA e FAE.

VII – REFERÊNCIAS

ALBERTON, M. D.; SOUZA, E. S.; FALKENBERG, D. B.; FALKENBERG, M. B. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, supl., v.12, p.11-13, 2002.

ARENAS, P., AZORERO, R.M. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. **Economic Botany**, v.31, p.298–301, 1977.

ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by dGMP-dependent protein kinase. **Proc. Nati. Acad. Sci (PNAS)**, v.91, n.16, p.7583-7587, 1994.

AUGER, C.; CAPORICCIO, B.; LANDRAULT, N.; TEISSEDRE, P. L.; LAURENT C.; CROS, G. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **The Journal of Nutrition**, v.132, p.1207–1213, 2002.

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

BAGGIO, C. H. ; FREITAS, C. S. ; OTOFUJI, G.M. ; CIPRIANI, T. R. ; SOUZA, L. M. ; SASSAKI, G. L. ; IACOMINI, M. ; MARQUES, M. C. A. ; VELA, S. M. Flavonoids of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss protect the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺,K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p.433-440, 2007a.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. C.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M. C. A. Inibição da motilidade gastrintestinal por frações da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex

Reiss. obtidas por fracionamento biomonitorado. In: **39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2007, Ribeirão Preto. 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007b. p. 48-48.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**, 11ª ed. A edificação do lar, São Paulo, p. 885, 1980.

BENTZON, J. F.; SKOVENBORG, E.; HANSEN, C.; MOLLER, J.; GAULEJAC, S. N.; PROCH, J. Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v.103, p.1681–1687, 2001

BERNATOVA, I.; PECHANOVA, O.; BABAL, P.; KYSELA, S.; STVRTINA, S.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. **American Journal of Physiology and Heart Circulatory Physiology**, v.282, p.H942–H948, 2002.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in valcular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

BORN, G.C.C. **Plantas medicinais da Mata Atlântica** (Vale do Ribeira-SP), Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 289, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria n. 19/92 de 30.1.92. **Diário Oficial da União**, 197 (seção I), 1995.

BRAYDEN, J. E.; Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.23, p.1069-1076, 1996.

BRAYDEN, J. E. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle – Experimental biology 2001 symposium Potassium Channels that Regulate

Vascular Tone: Which are the Important Players? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.29, p. 312-316, 2002.

BRETT, D. S.; FERRIS, C. D. SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **Journal of Biological Chemistry**. v.267, n.16, p.10976-10981, 1992.

BRUNETON, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. **Intercept, UK**, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33 n.2, p.179-189, 2000.

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

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus Sp* (espinheira-santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. In: **Central de Medicamentos** (Brasil). Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*maytevírus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras). s.l, Central de Medicamentos (Brasil), p.21-35, 1988.

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

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Multiciência: construindo a história de produtos naturais**, v.7, 2006.

CAVALLI, A.; LATTION, A.; HUMMLER, E.; NENNIGER, M.; PEDRAZZINI T.; AUBERT, J. F.; MICHEL, M. C.; YANG, M.; LEMBO, G.; VECCHIONE, C.; MOSTARDINI, M.; SCHMIDT, A.; BEERMANN, F.; COTECCHIA, S. Decreased blood pressure response in mice deficient of the $\alpha 1\beta$ -adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)**, v.94, p.11589-11594, 1997.

CIPRIANI, T.R.: **Extração, purificação e caracterização estrutural de polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná – Curitiba – PR., 2003.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v.69 n.71, p.18-21, 2006.

COLOMBARI, E.; SATO, M. A.; CRAVO, S. L.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS JÚNIOR, R. R.; LOPES, O. U. Role of the Medulla Oblongata in Hypertension. **Hypertension, Journal of the American Heart Association**, v. 38, p.549-554, 2001.

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

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa") **Journal Braz. Chem. Soc.** v.10 n.6, 1999.

CORDEIRO, D.S.; RAGHAVAN, G.S.V.; OLIVEIRA, W.P. Equilibrium Moisture Content Models for *Maytenus ilicifolia* Leaves. **Biosystems Engineering**, v.94, n.2, p.221–228, 2006.

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

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 2ª ed. Civilização Brasileira, São Paulo, pp. 335–336, 1982.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2- drug interactions. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v.12, n.3, p.147-162, 1993.

DE SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2008. Artigo submetido.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais : Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: ed. UNESP, 1996, p.9-21.

DREW, A. K. MYERS, S. P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **The Medical Journal of Australia**, v.166 n.10, p.538-541, 1997.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p.41-49, 2005.

DURMOWICZ, A. G.; STENMARK, K. R. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. **Pediatrics in Reviews**. v.20 p.91–102, 1999.

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

ERLUND, I.; KOSONEN, T.; ALFTHAN, G.; MAENPAA, J.; PERTTUNEN, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEN, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.56, n.8, p.545-553, 2000.

ESPERIDIÃO, S.; AJEJE, R.; KOPELMAN, B. I.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO-NETO, J.; JÚNIOR, L. K. Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid on Pregnant Rats. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia (RBGO)**, v.20, n.5, p.245-249, 1998.

FALEIROS, I.; C.; F. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa). XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Curitiba, PR, 15-17 set. 1992. **Anais 042. XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Curitiba, PR, 15-17, 1992.

FEELISCH, M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.17, Suppl 3, p.S25-S33, 1991.

FERREIRA, P. M. Envolvimento da histamina no mecanismo de ação do extrato bruto das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) sobre a secreção gástrica de ácido. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, 17-20 set, 1996. Anais F-094. **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, 17-20 set, 1996**.

FERREIRA, P. E. M.; MARTINIB, R. K. Cocaine: myths, history and abuse. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.23, n.3, p.96-99, 2001.

FRASER, S. P.; KOYUTÜRK, M.; DJAMGOZ, M. B. A. Ion channel activity and cancer cell proliferation: a short review with particular reference to prostate cancer. In: ROUZAIRE-DUBOIS, B.; BENOIT, E.; DUBOIS, J. M. Ion Channels and Physiopathologies of Nerve Conduction and Cell Proliferation. **Trivandrum: Research Signpost**, p.153–172, 2002.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; OTOFUJI, G. M.; MENDES, D.A.G.B. ; MARQUES, M. C. A. Inibição da secreção ácida gástrica pelo sobrenadante etanólico da extração aquosa da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss - Celastraceae (SEEA). In: **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2005, Águas de Lindóia. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2005. p. 89-89.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Research**, v.93, p.96–105, 2003.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W.; Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**. v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI J. V.. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** v.288 n.5789): 373-376, 1980.

GALLAGHER, P. J.; HERRING, B. P.; STULL, J. T. Myosin light chain kinases. **Journal of Muscle Research and Cell Motilit**. v.18, n.1, p.1-16, 1997.

GAMBOA, A.; SHIBAO, C.; DIEDRICH, A.; CHOI, L.; POHAR, B.; JORDAN, J.; PARANJAPE, S.; FARLEY, G.; BIAGGIONI, I. Contribution of Endothelial Nitric Oxide to Blood Pressure in Humans. **Hypertension**, v.49, p.170-177, 2007.

GARG, U. C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.83, p.1774-1777, 1989.

GIANNATTASIO, C.; MAESTRONI, S.; FANTINI, E.; AMIGONI, M.; RIGOLDI, M.; ZERBINI, F.; CAPRA, A.; FAILLA, M.; SIRONI, S.; MANCIA, G. Aortic Distensibility by Nuclear Magnetic Resonance in Essential Hypertension. **Artery Research**, v.1,n.2, p.66, 2007.

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

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Muscarinic Agonist Properties Involved in the Hypotensive and Vasorelaxant Responses of Rotundifolone in Rats. *Planta med.*, v.68, p.700-704, 2002.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D. Vascular Adrenoceptors: An Update. **Pharmacological Reviews**, v.53, n.2, p.319–356, 2001.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G.; ADELMAN, J. P.; AIYAR, J.; BAYLISS, D. A.; CLAPHAM, D. E.; COVARRIUBIAS, M.; DESIR, G. V.; FURUICHI, K.; GANETZKY, B.; GARCIA, M. L.; GRISSMER, S.; JAN, L. Y.; KARSCHIN, A.; KIM, D.; KUPERSCHMIDT, S.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; LESAGE, F.; LESTER, H. A.; MCKINNON, D.; NICHOLS, C. G.; O'KELLY, I.; ROBBINS, J.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M.; SEINO, S.; STUEHMER, W.; TAMKUN, M. M.; VANDENBERG, C. A.; WEI, A.; WULFF, H.; WYMORE, R. S. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v.55, n.4, p.583-586, 2003.

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

HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.290 p.546-552, 2006.

HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation Research**, v.82, p.1111–1129, 1998.

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

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

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

IGNARRO, L.J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Nati. Acad. Sci (PNAS)**, v.84, n.24, p.9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. **Proc. Nati. Acad. Sci (PNAS)**, v.99, n. 2, p.7816–7817, 2002.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v.30, n.11, p.3713-3716, 1991.

JACOB, H. J. Physiological genetics: Application to hypertension research. **Clin. Experimental Pharmacology Physiology**, v.26, p.530–535, 1999.

JACKSON, W. F.; KONIG, A.; DAMBACHER, T.; BUSSE, R. Prostacyclin-induced vasodilatation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. **American Journal of Physiology**, v.264, p.238-243, 1993.

JIAO, J.; ZHANG, Y.; LOU, D.; WU, X.; ZHANG, Y. Antihyperlipidemic and antihypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilator effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. **Phytotherapy Research**. v.21, p.1135-1141, 2007.

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

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.93-100, 2004.

JOUAD, H.; LACAILLE-DUBOIS, M. A.; LYOUSSI, B.; EDDOUKS, M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.2, p.159-163, 2001.

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

KAMM, K. E.; STULL, J. T. Dedicated Myosin Light Chain Kinases with Diverse Cellular Functions. **The Journal of Biology Chemistry**. V.276, n.7, p.4527-4530, 2001.

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

KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Molecular Diversity Of Vascular Potassium Channel Isoforms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, n.4, p.317–323, 2002.

KRICK, S.; PLATOSHYN, O.; SWEENEY, M.; MCDANIEL, S. S.; ZHANG, S.; RUBIN, L. J.; YUAN, J. J. Nitric oxide induces apoptosis by activating K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. **American Journal Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v.282, p.H184-H193, 2002.

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

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A, B.; CARDOSO, J. H. L.; FONTELES, M. C.; DUARTE, G. P. Cardiovascular Effects of the Essential Oil of *Alpinia zerumbet* Leaves and its Main Constituent, Terpinen-4-ol, in Rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Planta médica**, v.68, p.1097-1102, 2002.

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

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.8, p.3796 -3801, 2001.

LEMONS, V. S.; FREITAS, M. R.; MULLER, B.; LINO, Y. D.; QUEIROGA, C. E.; CORTES, S. F. Dioclein, a new nitric oxide-and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **European journal Pharmacology**, v.386, n.1, p.41-46, 1999.

LINCON, T. M.; CORNWELL, T. L. Blood Vessels, v. 28, p. 129-137, 1991 **In:** BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

LINCON, T. M.; CORNWELL, T. L. FASEB J. v. 7, p. 328-338, 1993 **In:** BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A.

Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in valcular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

LORENZ, M.; WESSLER, S.; FOLLMANN, E.; MICHAELIS, W.; DUSTERHOFT, T.; BAUMANN, G.; STANGL, K.; STANGL, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.6190–6195, 2004.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.27, n.10, p.3037-3067, 1988.

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

MCQUEEN, D. S.; DONALDSON, K.; BOND, S. M.; MCNEILLY, J. D.; NEWMAN, S.; BARTON, N. J.; DUFFIN, R. Bilateral vagotomy or atropine pre-treatment reduces experimental diesel-soot induced lung inflammation. **Toxicology and applied pharmacology**, v.219, v.1, p.73-78, 2007.

MARON, D. J. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. **Current Atherosclerosis Reports**, v.6, n.1, p.73-78, 2007.

MEDEIROS, I. A.; SANTOS, M. R. V.; NASCIMENTO, N. M. S.; DUARTE, J. C. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extract in rats. **Fitoterapia**, v.77, n.1, p.19-27, 2006.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable

substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v.263, n.5579, p.663-665, 1976.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.** v.38, n.11, p.1709-1715, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. A Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n.2, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **The New England Journal of Medicine**. v.329, n.27, p.2002-2012, 1993.

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

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

MARTINEZ-CROVETTO, Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino. **América Indígena**, v.472, p.79-93, 1987.

MELO, S.F., SOARES, S.F., DA COSTA, R.F., DA SILVA, C.R., DE OLIVEIRA, M.B., BEZERRA, R.J., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A., BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citrates*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.496, p.33-38, 2001.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **The Journal of Physiology**, v.486, p.47-58, 1995.

NAKAYA, Y.; MAWATARI, K.; TAKAHASHI, A.; HARADA, N.; HATA, A.; YASUI, S. The phytoestrogen ginsenoside Re activates potassium channels of vascular smooth muscle cells through PI3K/Akt and nitric oxide pathway. **The Journal of Medical Investigation**, v. 54, p.381-384, 2007.

NEYLON CB, LANG RJ, FU Y, BOBIK A, REINHART PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle: Relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. **Circulation Research**, v.85 p.33–43, 1999.

NEYLON, C. B. Potassium channels and vascular proliferation. **Vascular Pharmacology**, v.38, n.1, p.35-41, 2002.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, n.6, p.708-712, 1997.

OLIVEIRA, P. M. Efeito da 4-O-Metil Epigallocatequina extraída das folhas de espinheira santa sobre a secreção gástrica de ácido induzida pela histamina. XIII Simpósio de Plantas Mediciniais, Fortaleza, CE, 20-23 set, 1994. **Anais 077. XIII Simpósio de Plantas Mediciniais, Fortaleza, CE**, 20-23 set, 1994.

OKADA, Y.; YANAGISAWA, T.; YAMAGISCHI, T.; TAIRA, N. K^{+} channel-opening action and KRN2391-induced reduction of Ca^{+} sensitivity of arterial smooth muscle. **Archives Internationales de Pharmacodinamie et de Thérapie**, v. 326, p.35-51, 1993.

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

PARATI, G.; SAUL, J. P.; RIENZO, M. MANCIA, G. Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate Variability in Evaluating Cardiovascular Regulation. **Hypertension**, v.25, p.1276-1286, 1995.

PENNA, C.; PAGLIARO, P.; RASTALDO, R.; MANCARDI, D.; CAPPELLO, C.; GATTULLO, D.; LOSANO, G. Coronary vasculature in ischemic preconditioning. **Recent Research Developent in Life Sciences**, v.1, n.1, p.13-26, 2003.

PEREIRA, A.M.S., RODRIGUES, D.C., CERDEIRA, R.M. DE M., FRANÇA, S. DE C. In *XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, **Anais**. UFPr, Curitiba, resumo 072, 1991

RADOMSKI M. W.; MONCADA, S.; Biological role of nitric oxide in platelet function. In: MONCADA, S.; HIGGS, E. A.; BERRAZUETA, J. R. eds. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*. Madrid: EDICOMPLET, p.45-56, 1991.

RABINOVITCH, M. Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. **Chest Suppl.**, v.114, p.213-224, 1998.

RASTALDO, R.; PAGLIARO, A. P.; CAPPELLO, B. S.; PENNA, A. C.; MANCARDI, B. D.; WESTERHOF, B. N.; LOSANO, C. G. a Nitric oxide and cardiac function. **Life Sciences**, v.81, p. 779–793, 2007.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A; SILVA-SANTOS J. E. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.328–335, 2006.

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

ROBERTSON, B. E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M, T. Am. J. Physiol, v. 185, p. 299-303, 1993 In: BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.

J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in valcular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

SARR, M.; CHATAIGNEAU, M.; MARTINS, S.; SCHOTT, C.; EL BEDOUI, J.; OAK, M. H.; MULLER, B.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH. V. B. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, v.71, n.4, p.794-802, 2006.

SCHIFFRIN, E. L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, 38 suppl 2,p.S3-6,2001.

SCHLICHTER, L. C.; KHANNA, R. Potassium channels and proliferation of neuroimmune cells. In: ROUZAIRE-DUBOIS, B.; BENOIT, E.; DUBOIS, J. M. TRIVANDRUM. Ion Channels and Physiopathologies of Nerve Conduction and Cell Proliferation. **Research Signpost.**, p.121-151, 2002.

SCHULTES, R.E., RAFFAUF, R.F. The Healing Forest Medicinal and toxic plants of the North West Amazonia. **Discorides Press**. p.107-303,1990.

SHIEH, C. C; COGHLAN, M.; SULLIVAN. J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.557–593, 2000.

SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Long-Lasting Changes of Rat Blood Pressure to Vasoconstrictors and Vasodilators Induced by Nitric Oxide Donor Infusion: Involvement of Potassium Channels. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.290, n.1, p.380-387, 1999.

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

SINZINGER, H.; RAUSCHA, F.; O'GRADY, J.; FITSCHA, P. Prostaglandin I₂ and the nitric oxide donor molsidomine have synergistic effects on thromboresistance in man. **Br. J. Clin. Pharmac.**, v.33, p.289-292, 1992.

SOARES DE MOURA, R.; COSTA VIANA, F. S.; SOUZA, M. A. V.; KOVARY, K. GUEDES, D. C.; OLIVIERA, E. P. B. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, p.1515-1520, 2002.

SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.1, p.21-27, 1991.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Pesquisa publicada no jornal **Folha de São Paulo** p.C6, em abril de 2005.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.164, p.549-557, 1998.

STONE, J. R.; MARLETT, M. A. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. **Biochemistry**, v.34, n.45, p.14668-14678, 1995.

TANG, M.; WANG, G.; LU, P.; KARAS, R. H.; ARONOVITZ, M; HEXIMER, S. P.; KALTENBRONN, K. M.; BLUMER, K. J.; SIDEROVSKI, D. P.; ZHU, Y.; MENDELSON, M. E. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. **Nature medicine**, v.9, n. 12, p.1506-1513, 2003.

TANAKA, Y.; IGARASHI, T.; KANEKO, H.; YAMAKI, F.; MOCHIZUKI, Y.; AIDA, M.; TANIGUCHI, H.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. NO-mediated MaxiK (Ca) channel activation produces relaxation of guinea pig aorta independently of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels. **General Pharmacology**, v.34, p.159–165, 2000.

TANIGUCHI, J.; FURUKAWA, K. I. SHIGEKAWA, M. Pflugers Arch. V. 423, p.167-172, 1993 In: BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in valcular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

TAYLOR L. Wealth of the Rainforest, Pharmacy to the World, 1996. Copyrighted 1996–2000 by Raintree Nutrition, Inc., Austin, TX. Online at: /http://www.rain-tree.comS. Accessed in 20 July 2004.

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

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. 2006. Disponível em www.sbh.org.br>acesso em setembro de 2007.

VAN RIPER, D.A.; MCDANIEL, N. L.; REMBOLD, C. M. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1355, n.3, p.323-330, 1997.

VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; FORMENTON, V.A.F.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M.; FURLAN, M. BRNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Antioxidant activity of Maytenus ilicifolia root bark. **Fitoterapia**, v.77, p.243-244, 2006.

VERGARA C, LATORRE R, MARRION NV, ADELMAN JP. Calcium-activated potassium channels. **Current Opinion in Neurobiology**, v.8, p.321–329, 1998

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

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v.156, p.67-72, 2001.

ZDUNCZYK Z.; FREJNAGEL S.; WRÓBLEWSKA, M.; JUŚKIEWICZ, J.; OSZMIASKI, J.; ESTRELLA, I. Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.183-186, 2002.

ZYGMUNT, P. M.; HOGESTATT, E. D. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p.1600-1606, 1996.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. **J. Cardiovascular Pharmacology.**, v.12, Suppl 5, p.S115-S118, 1988.

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

WELLMANN, G.C. Ion channels and calcium signaling in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage. **Neurological Research**, v.28, p.690–702, 2006.

WHO Media Centre 2003. Traditional medicine. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>, Consulta em: 02 jan. 2008.

WONDERLIN, W. F.; STROBL, J. S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. **Journal of Membrane Biology**. v.154, p.91–107, 1996.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 2001.

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

