

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO HIPOTENSOR E DIURÉTICO DE *Achillea
millefolium* L. (Asteraceae) EM RATOS**

CURITIBA

2010

PRISCILA DE SOUZA

**EFEITO HIPOTENSOR E DIURÉTICO DE *Achillea millefolium* L.
(Asteraceae) EM 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 Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

Co-Orientador: Prof^o Dr. José Eduardo da Silva-Santos

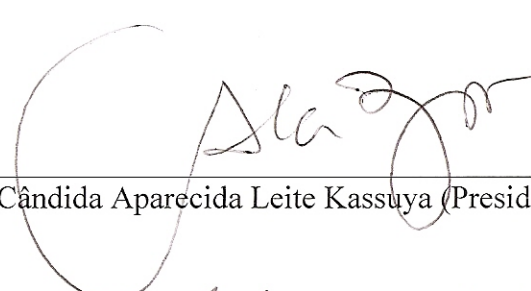
Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Consuelo Andrade Marques

Curitiba

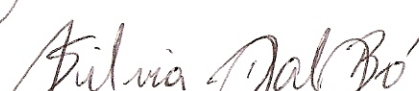
2010

1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**


2 Ao trigésimo dia do mês de agosto do ano de dois mil e dez, às quatorze horas, no
3 Anfiteatro nº 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
4 reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-
5 graduanda em Farmacologia **PRISCILA DE SOUZA** intitulada: “EFEITO HIPOTENSOR
6 E DIURÉTICO DE *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) EM RATOS, sob orientação da
7 Prof^a Dr^a Cândida Aparecida Leite Kassuya e composta pelos professores: Prof^a Dr^a
8 Cândida Aparecida Leite Kassuya (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof^a Dr^a Silvia
9 Dal Bó (UFSC); Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha (UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
10 trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
11 sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e
12 tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão
13 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o
14 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi
15 aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
16 conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por
17 encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e
18 pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 30 de agosto de 2010.

19
20
21


Prof^a Dr^a Cândida Aparecida Leite Kassuya (Presidente - Farmacologia - UFPR)



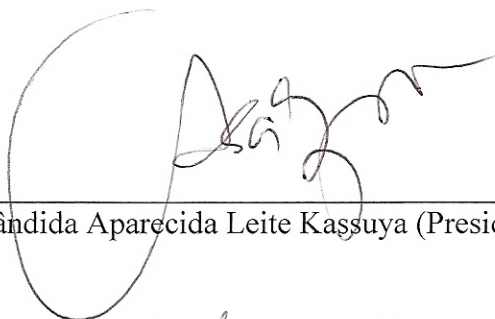
Prof^a Dr^a Silvia Dal Bó (Farmacologia - UFSC)



Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR)

PARECER

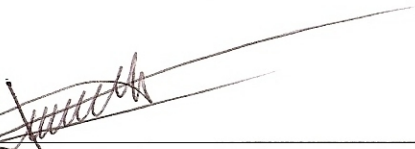
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “EFEITO HIPOTENSOR E DIURÉTICO DE *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) EM RATOS”, de autoria da pós-graduanda **PRISCILA DE SOUZA**, sob orientação da Profª Drª Cândida Aparecida Leite Kassuya e composta pelos professores: Profª Drª Silvia Dal Bó (Farmacologia - UFSC), Profª Drª Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 30 de agosto de 2010.



Profª Drª Cândida Aparecida Leite Kassuya (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Profª Drª Silvia Dal Bó (Farmacologia - UFSC)



Profª Drª Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR)

*Atos meus pais, cuja fé em mim me
ensinou a ter fé em mim mesmo e em
Deus.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho durante esta caminhada.

À minha família, em especial aos meus pais, Elizabeth e José, pelo amor e incentivo. Obrigada pela confiança depositada em mim.

A minha irmã, Thatiany, por todo carinho, amizade e apoio.

À minha orientadora, Cândida, pela confiança e tranquilidade transmitida. Obrigada pela sua amizade.

Ao meu co-orientador, José Eduardo, sempre muito paciente nos esclarecimentos. Obrigada por toda a ajuda prestada.

A professora Maria Consuelo, por ter aberto as portas de sua “casa” e ter proporcionado a execução deste trabalho.

Aos mais que colegas de laboratório, Arquimedes, Rita, Sandra, Bruna e Yanna, obrigada pela amizade e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à professora Maria Élide Stefanello, pela grande contribuição no desenvolvimento deste trabalho, e por todo o carinho com que sempre teve comigo.

A todos os alunos do departamento de farmacologia que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos professores, Joice M. da Cunha, Cristiane H. Baggio, Silvia Dal Bó e Anderson Martino Andrade pelas excelentes sugestões e correções.

A todos os funcionários do departamento e do biotério, pelos inúmeros auxílios prestados.

A todos os professores do departamento.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Aos animais meu respeito e gratidão.

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

"A vida é curta, quebre regras, perdoe rapidamente, beije demoradamente, ame verdadeiramente, ria incontrolavelmente, e nunca deixe de sorrir, por mais estranho que seja o motivo.

A vida pode não ser a festa que esperávamos, mas enquanto estamos aqui, devemos dançar, seja qual for o ritmo que a vida tocar... "

Ana Maria

Schall

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| | Lista de Abreviaturas | i |
| | Lista de Tabelas | iii |
| | Lista de Figuras | iv |
| | Resumo | v |
| | Abstract | vii |
| I | Introdução | 1 |
| 1.1 | Pressão Arterial e seu controle fisiológico | 1 |
| 1.2 | Hipertensão Arterial | 8 |
| 1.3 | Plantas Medicinais | 10 |
| 1.4 | <i>Achillea millefolium</i> | 12 |
| II | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 19 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 19 |
| III | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 | Analises Fitoquímicas | 21 |
| 3.1.1 | Material Botânico | 21 |
| 3.1.2 | Preparação do extrato hidro-etanólico, frações, sub-fração e isolamento de artemetina | 21 |
| 3.2 | Analises Farmacológicas | 23 |
| 3.2.1 | Animais | 23 |
| 3.2.2 | Drogas | 24 |
| 3.2.3 | Procedimento para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados | 24 |
| 3.2.4 | Avaliação dos efeitos de HEAM, frações e artemetina na pressão arterial média (PAM) de ratos | 25 |
| 3.2.5 | Efeito da pré-administração de artemetina sobre a elevação da PAM induzida por angiotensina I e angiotensina II | 26 |
| 3.2.6 | Efeito da pré-administração de artemetina sobre o efeito hipotensor da bradicinina | 27 |
| 3.2.7 | Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática | 27 |
| 3.2.8 | Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) vascular | 28 |
| 3.2.9 | Avaliação dos efeitos da artemetina sobre a PAM de ratos expostos à infusão de L-NAME | 29 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.10 | Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) | 30 |
| 3.2.11 | Atividade diurética | 30 |
| 3.2.12 | Análise dos resultados e testes estatísticos | 31 |
| IV | RESULTADOS | 33 |
| 4.1 | Análise Fitoquímica | 33 |
| 4.2 | Efeito hipotensor do extrato hidro-etanólico de <i>A. millefolium</i> (HEAM) em ratos normotensos anestesiados | 36 |
| 4.3 | Efeito das frações obtidas de <i>A. millefolium</i> na pressão arterial média de ratos normotensos anestesiados | 37 |
| 4.4 | Efeito do tratamento oral e injeção intravenosa de artemetina sob a PAM de ratos normotensos anestesiados | 39 |
| 4.5 | Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina I | 40 |
| 4.6 | Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e vascular | 42 |
| 4.7 | Efeito da artemetina na resposta vascular a bradicinina | 44 |
| 4.8 | Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina II | 46 |
| 4.9 | Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito hipotensor da artemetina | 47 |
| 4.10 | Efeito da artemetina nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx) | 49 |
| 4.11 | Avaliação da atividade diurética do HEAM e sub-fração DCM-2 em ratos | 50 |
| V | DISCUSSÃO | 54 |
| VI | CONCLUSÕES | 64 |
| VII | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| AcE | - Fração acetato de etila |
| Ach | - Acetilcolina |
| ADH | - Hormônio Antidiurético |
| ALT | - Alanina aminotransferase |
| AST | - Aspartato aminotransferase |
| ATP | - Adenosina trifosfato |
| ANOVA | - Análise de Variância |
| Ang I | - Angiotensina I |
| Ang II | - Angiotensina II |
| AT1 | - Receptor para angiotensina II tipo AT1 |
| AT2 | - Receptor para angiotensina II tipo AT2 |
| B1 | - Receptor para bradicinina tipo B1 |
| B2 | - Receptor para bradicinina tipo B2 |
| BT | - Fração Butanólica |
| BuOH | - 1-butanol |
| BK | - Bradicinina |
| Ca ²⁺ | - Cálcio |
| cGMP | - Monofosfato cíclico de guanosina |
| CH ₂ Cl ₂ | - Diclorometano |
| cols | - Colaboradores |
| DAG | - Diacilglicerol |
| DCM | - Fração Diclorometano |
| ECA | - Enzima conversora de angiotensina |
| EDHF | - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio |
| EtOAc | - Acetato de etila |
| EtOH | - Etanol |
| FDA | - Food and Drug Administration |
| GCs | - Guanilato ciclase solúvel |
| GMPc | - Guanosina monofosfato cíclico |
| HAS | - Hipertensão Arterial Sistêmica |
| HCTZ | - Hidroclorotiazida |

| | |
|------------------|--|
| H ₂ O | - Água |
| IP ₃ | - Trifosfato de inositol |
| IP ₄ | - Inositol 1, 3, 4, 5-tetrafosfato |
| K ⁺ | - Potássio |
| L-NAME | - N- ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester |
| MeOH | - Metanol |
| MLCK | - Quinase de cadeia leve de miosina |
| Na ⁺ | - Sódio |
| NaCl | - Cloreto de sódio |
| NO | - Óxido nítrico |
| NOS | - Óxido nítrico sintase |
| OMS | - Organização Mundial de Saúde |
| PA | - Pressão Arterial |
| PAM | - Pressão Arterial Média |
| PGI ₂ | - Prostaciclina |
| PIP ₂ | - Fosfatidil-inositol-bifosfato |
| PKG | - Proteína quinase G |
| PLC | - Fosfolipase C |
| PNA | - Peptídeo Natriurético Atrial |
| RMN | - Ressonância Magnética Nuclear |
| SNA | - Sistema Nervoso Autônomo |
| SNC | - Sistema Nervoso Central |
| SRA | - Sistema Renina Angiotensina |
| TXA ₂ | - Tromboxano A ₂ |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Efeito da administração oral de HEAM e DCM-2 no volume urinário e excreção de eletrólitos | 52 |
| 2 | Efeito da administração oral de HEAM e DCM-2 na condutividade, pH e densidade | 53 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Representação simplificada do Sistema Renina Angiotensina | 3 |
| 2 | Exemplar de <i>Achillea millefolium</i> L. (Asteraceae) | 14 |
| 3 | Estrutura do flavonóide artemetina | 17 |
| 4 | Fluxograma do processo de fracionamento de <i>A. millefolium</i> | 23 |
| 5 | Análise RMN ¹ H | 36 |
| 6 | Efeito hipotensor de HEAM em ratos normotensos anestesiados | 37 |
| 7 | Efeito hipotensor das frações DCM e DCM-2 em ratos anestesiados | 38 |
| 8 | Efeito hipotensor de artemetina obtida de <i>A. millefolium</i> em ratos normotensos anestesiados | 40 |
| 9 | Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina I em ratos normotensos anestesiados | 42 |
| 10 | Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e vascular em ratos tratados com artemetina | 44 |
| 11 | Efeito hipotensor da bradicinina na presença da artemetina | 45 |
| 12 | Ausência de envolvimento dos receptores de angiotensina II no efeito hipotensor da artemetina em ratos normotensos anestesiados | 47 |
| 13 | Efeito hipotensor da artemetina na presença do L-NAME | 49 |
| 14 | Efeito da artemetina nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx) | 50 |

RESUMO

Achillea millefolium L. (Asteraceae), popularmente conhecida como “mil-folhas”, é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças cardiovasculares. No presente estudo, avaliamos o efeito hipotensor e diurético de extrato, frações e artemetina obtidos de *A. millefolium* em ratos. As partes aéreas da planta foram extraídas com etanol 90%, gerando o HEAM. Este foi ressuspendido em EtOH-H₂O (1:1) e então extraído com diclorometano (DCM), acetato de etila (AcE) e 1-butanol (BT), sucessivamente. A fração DCM foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel eluída com solventes de polaridade crescente, obtendo a sub-fração DCM-2. Através do fracionamento biomonitorado, caracterizamos que a fração mais ativa apresentou como constituinte majoritário o flavonóide artemetina. A importância biológica destas substâncias tem sido evidenciada em vários estudos devido suas ações benéficas em diferentes condições patológicas, sendo reportadas diversas atividades no sistema cardiovascular. Todas as frações foram analisadas por RMN ¹H e a artemetina foi isolada a partir de técnicas cromatográficas e identificada através de ¹H e ¹³C RMN (200 MHz, CDCl₃). Ratos *Wistar* machos receberam o tratamento oral com HEAM, frações, artemetina ou veículo (além do tratamento intravenoso com artemetina) e tiveram a pressão arterial mensurada através de um sistema de pressão conectado a um transdutor de força acoplado a artéria carótida do animal anestesiado. A atividade diurética foi determinada em animais, que receberam o tratamento via oral com HEAM e DCM-2, mantidos em gaiolas metabólicas. A urina foi coletada em intervalos de 2h por 8h. Foram mensuradas as concentrações de eletrólitos (Na⁺ e K⁺), pH, densidade e condutividade de cada amostra de urina no final do experimento. A administração oral, 3 horas antes, de HEAM (100-300 mg/kg), DCM (20 mg/kg), DCM-2 (10-30 mg/kg), mais não AcE (10 mg/kg) e BT (50 mg/kg), reduziram significativamente a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos anestesiados, com reduções de 13 ± 1 mm Hg para HEAM (100 mg/kg), 11 ± 1 mm Hg para DCM (20 mg/kg) e 10 ± 1 mm Hg para DCM-2 (10 mg/kg). Além disso, a administração oral de HEAM (300 mg/kg) e DCM-2 (30 mg/kg) aumentou significativamente a excreção urinária, em cerca de 37 ± 4 % para HEAM e 90 ± 6 % para DCM-2. A excreção de eletrólitos também foi aumentada para ambas os tratamentos, 33 ± 7 a 51 ± 7 % para Na⁺ e 36 ± 7 a 49 ± 7 % para K⁺. Não houve alteração na condutividade, pH e densidade. O composto isolado, artemetina, foi capaz de reduzir a PAM de ratos quando administrado tanto por via oral (1,5 mg/kg) quanto por via intravenosa (0,35 - 1,5 mg/kg), com reduções de 8 ± 3 mm Hg com o tratamento oral e de 5,6 ± 0,91 a 11,47 ± 1,5 mmHg com o tratamento intravenoso. Em relação ao mecanismo de ação, a injeção intravenosa de uma única dose de artemetina (0,75 mg/kg) reduziu a resposta hipertensiva induzida pela angiotensina I em 37 ± 9 a 51 ± 7

%). O tempo do efeito constritor também foi reduzido (25 ± 3 a 35 ± 9 %). Em relação à atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e vascular, a artemetina foi capaz de reduzir a atividade desta enzima em ambos os ensaios, com redução de cerca de 37 % para a atividade da ECA plasmática, e de 63 a 89 % para a atividade da ECA vascular. Ainda, a artemetina foi capaz de causar grande aumento no tempo da resposta hipotensora induzida pela bradicinina (120 ± 29 %), sem alterar o pico do efeito vasodilatador. Avaliamos também o envolvimento de receptores da angiotensina II, porém a artemetina parece não interferir com o antagonismo deste tipo de receptor. Outro mecanismo investigado foi o envolvimento do óxido nítrico, porém o efeito hipotensor da artemetina parece ser independente da síntese deste mediador. Os resultados do presente estudo mostram que o extrato e frações semi-purificadas obtidas de *A. millefolium* exibem efeitos hipotensores e diuréticos quando administrados por via oral, e a artemetina parece ser um dos compostos responsáveis por esta ação anti-hipertensiva popularmente atribuída a planta, um efeito, pelo menos em parte, mediado através da inibição da enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

Traditional uses of the *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), popularly known as “mil-folhas”, include the treatment of cardiovascular diseases. In the present study, we assessed the hypotensive effect of extracts, fractions and artemetin from *A. millefolium* in rats. Aerial parts of *A. millefolium* were extracted with ethanol 90%, concentrated, filtered and the solution lyophilized to give the HEAM. It was suspended in EtOH-H₂O (1:1) and then extracted with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AcE) and 1-butanol (BT), successively. DCM fraction was submitted to vacuum column chromatography on silica gel, eluted with solvents of crescent polarity, to give DCM-2 sub-fraction. Using a bio-guided approach we have characterized that the most active fraction obtained from *A. millefolium* presented as its main constituent the methoxylated flavonoid artemetin. The biological importance of these substances has been evidenced by their beneficial actions in several pathological conditions, being reported to have several activities in the cardiovascular system. All these fractions were analyzed by NMR ¹H and artemetin was isolated by chromatography techniques and it was identified by ¹H and ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃). Male *Wistar* rats received the oral treatment with extract, fractions, artemetin or vehicle (further on intravenous treatment with artemetin) and had the direct blood pressure measurement, where the anesthetized rats had the left carotid artery cannulated and connected to a pressure transducer. Diuretic activity was determined in animals kept in metabolic cages. Urine was collected from animals treated per oral route with extract and DCM-2 sub-fraction in a graduated cylinder and its volume was recorded at 2h intervals for 8h. Electrolytes (Na⁺ and K⁺) concentrations, pH, density and conductivity were estimated from a pooled urine sample of each pair of rats at the end of the experiment. The oral administration, 3 hours prior, of the HEAM (100-300 mg/kg), DCM (20 mg/kg), DCM-2 (10-30 mg/kg), but not AcE (10 mg/kg) and BT (50 mg/kg) fraction, reduced significantly the mean arterial pressure (MAP) of anesthetized normotensive rats, with changes around 13 ± 1 mm Hg for HEAM (100 mg/kg), 11 ± 1 mm Hg for DCM (20 mg/kg) and 10 ± 1 mm Hg for DCM-2 (10 mg/kg). Moreover, the single oral administration of HEAM (300 mg/kg) and DCM-2 (30 mg/kg) caused a significant increase in urinary excretion, about 37 ± 4 % for HEAM and 90 ± 6 % for DCM-2. The urinary excretion of electrolytes was also increased for both treatments, about 33 ± 7 to 51 ± 7 % for Na⁺ and 36 ± 7 to 49 ± 7 % for K⁺ excretion. There was no change in conductivity, density and pH of samples analyzed. Artemetin reduced the MAP of rats both orally and intravenously administered, with changes about 8 ± 3 mm Hg after oral administration, and 5.6 ± 0.91 to 11.47 ± 1.5 mm Hg after intravenous injection. The intravenous treatment of a single dose of artemetin (0.75 mg/kg) reduced the hypertensive response induced by Ang I in 37 ± 9 to 51 ± 7 %. The length of the

hypertensive effect induced by Ang I was also reduced by artemetin (25 ± 3 to 35 ± 9 %). In tests of angiotensin converting enzyme (ACE) activity plasma and vascular, artemetin caused a reduction in enzyme activity of both trials, with changes about 37 % for ACE plasma activity and 63 a 89% for vascular ACE activity. Artemetin wasn't able to increase significantly the hypotensive effect of BK, but the length of the hypotensive effect induced by it was significantly increased in 120 ± 29 %. Still, artemetin did not interfere in angiotensin II-induced hypertension in rats and its hypotensive effect may be independently of nitric oxide synthesis. The results of the present study show that the extract and semi-purified fractions obtained from *A. millefolium* exhibit hypotensive and diuretic actions when orally administered, and that artemetin may also be responsible for this anti-hypertensive action, an effect, at least in part, mediated by angiotensin-converting enzyme inhibition.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Pressão Arterial e seu controle fisiológico

Pressão arterial é a força com a qual o coração bombeia o sangue através dos vasos, sendo determinada pelo volume de sangue que sai do coração (débito cardíaco) e a resistência que ele encontra para circular na periferia (resistência vascular periférica). Ela pode ser modificada pela variação do volume de sangue ou viscosidade (espessura) do sangue, da frequência cardíaca (batimentos cardíacos por minutos) e da elasticidade dos vasos. Os estímulos hormonais e nervosos que regulam a resistência sanguínea sofrem influência individual e ambiental (ZAGO e ZANESCO, 2006).

Os mecanismos de regulação da pressão arterial podem ser responsivos em curto, médio e longo prazo. Em curto prazo (resposta em segundos), esse controle é desempenhado pelos barorreceptores, quimiorreceptores e sistema nervoso central (SNC). Os rins exercem o controle da pressão arterial a longo prazo (horas ou dias). E em médio prazo (minutos), a regulação ou modulação ocorrem principalmente por ação dos sistemas hormonais (sistema renina-angiotensina, sistema calicreína-cinina, vasopressina e mediadores endoteliais) (COGOLLUDO *et al.*, 2005; GUYTON, 1991).

O sistema nervoso autônomo (SNA) possui neurônios aferentes e eferentes que ligam o SNC com efetores viscerais. O controle neural da circulação opera via neurônios parassimpáticos que inervam o coração e via eferentes simpáticos que inervam vasos sanguíneos, o coração, os rins e a adrenal. Estruturas límbicas, corticais e do cérebro são responsáveis pelas

rápidas mudanças no tônus simpático relacionados ao comportamento (GUYENET, 2006).

O controle a longo prazo é feito principalmente pelos rins. Quando a pressão é aumentada acima de valores normais (sistólica > 140 mm Hg e diastólica > 90 mm Hg; MS, 2010), os rins passam a excretar mais água e sal, isso reduz a volemia e faz com que o coração bombeie menos sangue levando à queda da pressão arterial. Reciprocamente quando a pressão diminui abaixo do valor normal (sistólica < 120 mm Hg e diastólica < 80 mm Hg; MS, 2010) há um aumento no balanço entre fluídos que entram e saem, aumentando assim as concentrações dos líquidos e eletrólitos corporais e a pressão sangüínea (GUYTON, 1991).

Um dos principais mecanismos intermediários é o sistema renina-angiotensina (SRA), que tem função vasoconstritora ativada quando a baixa pressão sangüínea faz com que o fluxo de sangue para os rins caia abaixo do normal, levando a secreção de renina pelas células justaglomerulares dos rins. A renina é uma enzima glicoprotéica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II é o principal peptídeo efetor do SRA, sendo conhecido pelas suas ações sobre o controle da pressão sangüínea e equilíbrio de eletrólitos e água (Ver figura 1). A angiotensina II atua sobre dois subtipos de receptores AT_1 e AT_2 (GASPARO *et al.*, 2000; DUKE *et al.*, 2005). A ativação dos receptores AT_2 induz efeitos vasodilatadores em oposição aos efeitos vasoconstritores desencadeados pela ativação dos receptores AT_1 (DUKE *et al.*, 2005). A angiotensina II causa vasoconstrição nos vasos sangüíneos e

conseqüentemente restabelece os níveis pressóricos normais (GUYTON, 1991; OPIE, 1998; CRACKOWER *et al.*, 2002).

OPIE (1998) propõe que a liberação de renina pelas células justaglomerulares ocorre em resposta a três estímulos principais: aumento da estimulação dos receptores β 1-adrenérgicos; redução da pressão arterial renal e diminuição na reabsorção tubular de sódio (Na^+). A liberação de renina é inibida pela angiotensina II através de um mecanismo de *feedback* negativo. Ela também estimula a liberação do hormônio aldosterona do córtex da adrenal, que aumenta a reabsorção de sódio (Na^+) nos rins e diminui a liberação de renina.

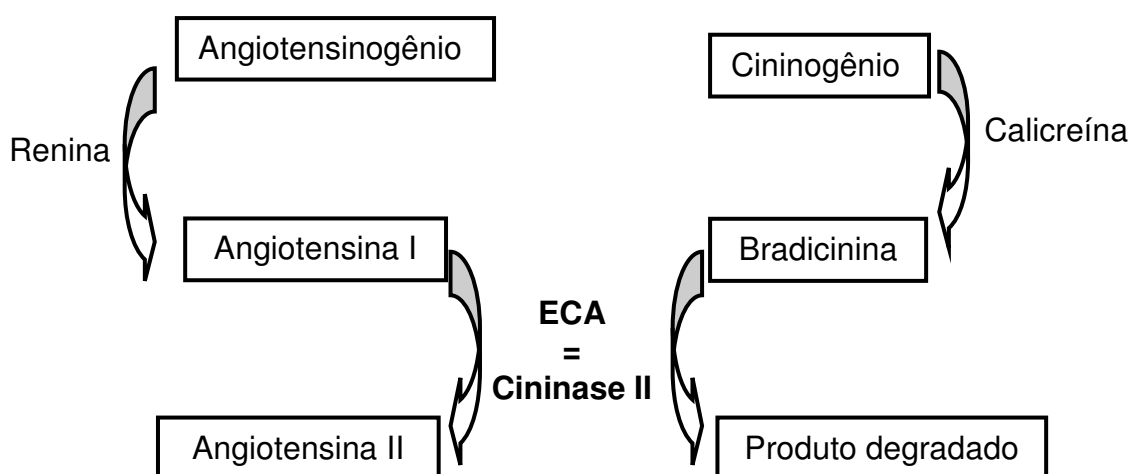


Figura 1. Representação simplificada do Sistema Renina Angiotensina.

ECA – Enzima conversora de angiotensina.

Outros sistemas hormonais participam do controle da pressão sangüínea como o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina. O ADH é um hormônio neurohipofisário envolvido em vários processos fisiológicos, inclusive regulação

dos fluídos corporais, do tônus vascular e da contratilidade cardiovascular. Sua ativação ocorre com o aumento da osmolaridade plasmática, principalmente ao Na^+ , e redução da pressão intravascular. Atua aumentando a reabsorção de água, pelos túbulos renais, sem interferir na eliminação de Na^+ , isso contribui para a elevação da sobrecarga sangüínea e conseqüentemente da pressão arterial (LEE *et al.*, 2003).

O endotélio vascular tem papel importante na regulação da fisiologia circulatória principalmente na microcirculação (BRUNNER *et al.*, 2005; DEANFIELD *et al.*, 2005; VIRDIS *et al.*, 2010), relacionando-se com a manutenção do controle do tônus vascular através da liberação de substâncias vasodilatadoras e de fatores constritores (FELIZZOLA *et al.*, 1996). A liberação de mediadores vasorrelaxantes pode ser estimulada por substâncias endógenas, por exemplo, a acetilcolina (Ach) e a bradicinina (BK), ou ainda por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento (“*shear stress*”), havendo então a liberação de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FRANGOS *et al.*, 1985; CAMPBELL e GAUTHIER, 2002; BOO e JO, 2003), os quais atuam sobre a camada muscular e relaxam os vasos. Esse aumento no diâmetro dos vasos provoca a redução proporcional da resistência periférica total e da pressão arterial.

O principal mediador vasorrelaxante é o NO. O mecanismo de síntese deste gás inicia-se com a ligação de um agonista a um receptor específico localizado na membrana das células endoteliais (VIRDIS, 2010). Esse estímulo provoca ativação da fosfolipase C (PLC), por intermédio de uma proteína G. A PLC, uma vez ativada, promove a hidrólise dos fosfolipídeos fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP_2) presentes na membrana celular, originando o inositol 1, 4, 5,

trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG) (GRIFFITH *et al.*, 1984). O IP_3 age nos estoques intracelulares de Ca^{+2} induzindo a liberação deste íon, o qual, ligado à calmodulina, estimula a óxido nítrico sintase (NOS), dando início à síntese do NO (MONCADA *et al.*, 1989). É relatada a existência de canais de cálcio sensíveis ao IP_4 (inositol 1, 3, 4, 5-tetrafosfato) e insensíveis ao IP_3 , localizados nas células endoteliais. Estes canais podem estar envolvidos no influxo transmembrana do Ca^{+2} para as células endoteliais (LUCKHOFF e CLAPHAM, 1992) ou ainda, no relaxamento vascular pelo estresse de cisalhamento e na interação agonista–receptor nas células endoteliais (BASSENGE *et al.*, 1987).

O NO, após sintetizado, difunde-se para a camada muscular lisa do vaso causando a estimulação da guanilato ciclase solúvel ou citosólica (GCs), provavelmente por se ligar ao grupo heme dessa enzima (STONE e MARLETTA, 1995). A ativação da GCs gera um aumento da concentração citosólica do guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Este nucleotídeo ativa a proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções, parece fosforilar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) tornando-a inativa e provocando um relaxamento (RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT e MURAD, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de K^+ , ocasionando hiperpolarização e conseqüente relaxamento vascular. A exemplo da acetilcolina, diversos agonistas provocam vasodilatação através da ativação da via L-arginina-óxido nítrico, como por exemplo a histamina, a serotonina, a bradicinina, prostaglandinas e a substância P (FURCHGOTT, 1983).

As prostaglandinas são compostos que apresentam estrutura complexa de cadeia cíclica. Há um número muito grande de diferentes prostaglandinas, mas dentre elas as que têm maior importância para o sistema cardiovascular são as

prostaciclina (vasodilatadora; OPIE, 1998). A prostaciclina (PGI_2) é um potente inibidor endógeno da agregação plaquetária com potente efeito vasodilatador, além de ser considerada como um antagonista fisiológico do tromboxano A_2 (TXA_2). O TXA_2 além de apresentar propriedades vasoconstritoras, favorece a agregação plaquetária. Dessa forma o equilíbrio entre a produção de TXA_2 e PGI_2 é crucial para a homeostasia do sistema cardiovascular, pois um desequilíbrio pode favorecer doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose ou infarto do miocárdio (LEVAL *et al.*, 2004).

As cininas são polipeptídios farmacologicamente ativos, que são liberados em tecidos e fluidos corporais como o resultado de ações enzimáticas de calicreínas e cininogênios. A família das cininas inclui as bradicininas, calidinas e metionil-lisil-bradicininas. Calidina e metionil-lisil-bradicinina são convertidas em bradicinina por aminopeptidases presentes no plasma e urina. A bradicinina é rapidamente inativada (<15 segundos) por cininases circulantes (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005), sendo conhecidas as cininases I, cininases II (enzima conversora de angiotensina) e encefalinases (SHARMA, 2009). As cininas exercem suas ações farmacológicas através da ativação de dois tipos de receptores metabotrópicos, B1 e B2. O receptor B1 raramente é expresso em tecidos normais, mais parece ser superexpresso em estados inflamatórios com lesão tecidual (SHARMA e AL-DHALMAWI, 2003), onde sua ativação pode gerar estimulação do músculo liso, aumento da proliferação celular, e síntese de colágeno. Já o receptor B2 é expresso normalmente em algumas células, onde sua ativação pode gerar a liberação de NO e PGI_2 , ambas promovendo potente vasodilatação e redução da pressão arterial (SHARMA, 2009).

Os rins apresentam um papel extremamente importante no controle da pressão arterial, iniciando com o processo de formação de urina. A formação de urina inicia-se com a filtração glomerular de cerca de 25% do plasma que atinge o rim. Um ultrafiltrado é coletado para o interior dos túbulos renais, sendo que a formação é dependente de propriedades glomerulares como coeficiente de permeabilidade, área filtrante, diferença de pressão hidrostática entre capilar glomerular e cápsula de Bowman e da pressão oncótica intracapilar. Assim, qualquer fator que afete alguma dessas propriedades irá interferir na filtração glomerular e, conseqüentemente, na produção de urina (EATON e POOLER, 2004). Entre esses fatores incluem-se alteração na perfusão renal, alteração morfológica do glomérulo, redução da massa renal, isquemia renal, *feedback* justaglomerular, agentes diuréticos, hormônios, hiperfiltração após administração de substâncias osmoticamente ativa, entre outros (FLECK, 1999).

Uma série de agentes produzidos no organismo interfere no processo de formação de urina por atuarem, tanto na regulação da filtração glomerular, como no transporte de eletrólitos e água ao longo dos túbulos renais. Dentre outras funções, o ADH é fundamental na manutenção da osmolaridade plasmática e homeostase dos líquidos corporais. Um aumento na osmolaridade plasmática ou redução do volume circulatório efetivo estimula a secreção de ADH, pela hipófise posterior, levando a um aumento na reabsorção de água e concentração da urina pelos rins retornando a osmolaridade plasmática e o volume extracelular, a níveis normais (BANKIR, 2001; VERBALIS, 2003). O ducto coletor é o principal alvo de ação desse hormônio no rim, onde o ADH se liga a receptores V2, presentes na membrana basolateral das células principais do ducto coletor, para produzir seu efeito antidiurético (INOUE *et al.*, 2001).

A hipertensão arterial interage com os rins, muitas vezes é difícil determinar se o rim está originando ou sendo modulado por alterações induzidas pela hipertensão (PRAXEDES, 1992). A necessidade de maior pressão de perfusão renal para excretar a carga de sal e água aumentada, devido a algum defeito renal desconhecido, tornaria alguns indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento de hipertensão. Assim, o fluido se acumularia no corpo, até que a pressão arterial aumentasse o suficiente para balancear a excreção com a ingestão de líquidos. A elevação da pressão arterial sistêmica aumentaria o fluxo sanguíneo para todos os tecidos do corpo.

Os estudos em modelos animais sugerem que a transmissão da hipertensão sistêmica para o interior do glomérulo altera a hemodinâmica intrarenal, causando glomeruloesclerose ou agravando uma doença renal pré-existente (TOMSON *et al.*, 1991). Estes resultados tem sido de grande influencia sobre a terapêutica anti-hipertensiva disponível, que objetiva diminuir tanto a pressão sistêmica quanto a pressão intraglomerular.

1.2. Hipertensão Arterial

Alterações em um ou ambos os mecanismos de controle da pressão arterial (neural e/ou humoral), poderão resultar em elevação dos níveis pressóricos, instalando-se assim um quadro de hipertensão arterial (GUYTON e HALL, 1996), que pode ser definida como uma doença ou como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças do coração, pois, na grande maioria das vezes, não provoca sintomas ou os sinais clínicos são gerais como dores de cabeça, tonturas, mal estar.

A hipertensão arterial é uma doença altamente prevalente em nosso meio, atingindo cerca de 20% da população adulta com mais de 18 anos, chegando a alcançar índices de 50% nos idosos (MION Jr. *et al.*, 2001), estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países do mundo (YUSUF *et al.*, 2001). É considerada de origem multifatorial (JACOB, 1999), onde seu tratamento e prevenção incluem adotar estratégias não farmacológicas baseadas na modificação do estilo de vida, associadas ao tratamento medicamentoso (THARKUR *et al.*, 2001).

Diversos agentes anti-hipertensivos são utilizados na clínica para o tratamento da hipertensão e suas complicações, como os diuréticos, os beta-bloqueadores, os bloqueadores de canais de cálcio, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, os bloqueadores de receptor da angiotensina II, os antagonistas da aldosterona e os inibidores de renina. Apesar de existir tantas classes de agentes anti-hipertensivos disponíveis para o tratamento da hipertensão nos dias atuais, problemas cardiovasculares relacionados à hipertensão continuam a afetar milhões de pessoas (CHOBANIAN *et al.*, 2003; LA MORENA *et al.*, 2010).

Do ponto de vista fisiopatológico, a hipertensão é uma doença que envolve mudanças persistentes em pelo menos uma das variáveis hemodinâmicas (débito cardíaco, rigidez arterial, ou resistência periférica) que determinam a mensuração da pressão arterial. Cada uma dessas variáveis tem um potencial alvo terapêutico, e é provável que alterações nestas variáveis também contribuam para a heterogeneidade da resposta farmacológica dos pacientes com hipertensão. Além disso, o tratamento atual adota estratégias que visam não só

focar na redução da pressão arterial, mas também em normalizar a estrutura e função vascular (BONESI *et al.*, 2010).

A redução da pressão arterial tem sido associada com uma redução em cerca de 40% do risco de ataques súbitos e em cerca de 20% de redução do risco de infarto do miocárdio (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Além disso, as diretrizes de práticas clínicas atuais identificam a redução da pressão arterial como prioridade no tratamento de pessoas com hipertensão (LONN, 2004). Ainda, devido ao grande número de efeitos adversos relacionados aos medicamentos de uso clínico atuais, cada vez mais se torna necessário o avanço das pesquisas em foco de novas alternativas terapêuticas, como a validação de plantas e compostos naturais, que além de mais econômicos podem apresentar menos efeitos colaterais (MAGOS *et al.*, 2008).

1.3. Plantas Medicinais

Os produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, são importantes fontes terapêuticas. Cerca de 30% de todas as drogas disponíveis para terapêutica são derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, dependem essencialmente de plantas medicinais para o tratamento primário de doenças (BERMUDEZ *et al.*, 2005). Entretanto, poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

Juntos, os países latino-americanos possuem grande parte da biodiversidade mundial e eles são também muito ricos em recursos naturais,

animais, microrganismos e recursos marinhos, porém estes países nem sempre usaram devidamente esta grande biodiversidade em seu próprio desenvolvimento. Só o Brasil possui aproximadamente 20% de todas as plantas existentes, com mais de 56.000 espécies. Entretanto, é estimado que não mais de 25.000 plantas fosse objeto de algum estudo científico (CALIXTO, 2005).

Como exemplos relevantes de medicamentos obtidos de plantas, podemos mencionar a digoxina (*Digitalis sp.*), o quinino (casca da *Chinchona sp.*), a pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (RATES, 2001). Assim, as plantas medicinais fornecem o substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem às entidades químicas.

Nota-se o interesse governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável visando a uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente e humanizada (FRANÇA *et al.*, 2008). Nesse sentido, o Estado brasileiro instituiu a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e assegura a qualidade para o registro desses produtos junto ao Ministério da Saúde (ANVISA, 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) tem encorajado o desenvolvimento de estudos com plantas tradicionais, com a esperança de obter os possíveis benefícios que as pesquisas sobre este assunto podem trazer (FRANCO, 2003).

Neste aspecto, a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônico-degenerativa que afeta o sistema cardiovascular, e seu controle tem se constituído um grande desafio para os profissionais da saúde. Apesar do grande

número de drogas disponíveis para o tratamento da hipertensão, o seu controle tem se mostrado inadequado, pois além da ineficácia das drogas empregadas em alguns indivíduos, o grande número de efeitos colaterais estimula a não adesão ao tratamento. Assim, a busca por novas moléculas ou fitoterápicos com propriedades anti-hipertensivas é uma tarefa muito importante para a ampliação do arsenal terapêutico, aumentando a eficiência e favorecendo o aumento da adesão ao tratamento farmacológico. Diversos produtos naturais, isolados a partir de plantas medicinais tem sido relatados como potenciais agentes terapêuticos no controle da hipertensão, assim, abrindo novas perspectivas no controle desta patologia.

No departamento de Farmacologia da UFPR, o grupo de pesquisa “Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Naturais”, desenvolve trabalhos com o objetivo de estudar plantas medicinais utilizadas popularmente com base em informações etnofarmacológicas e etnobotânicas, buscando contribuir com a demonstração da sua eficácia, em conjunto com a determinação da toxicidade e do estudo dos mecanismos de ação destes produtos. Uma das plantas que vem sendo estudada pelo grupo desde o ano 2004 é a *Achillea millefolium*, cuja atividade anti-úlceras em ratos já foi demonstrada (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

1.4. *Achillea millefolium*

A. millefolium é conhecida na medicina popular como mil-folhas, milefólio, milenrama, aquiléia, erva-dos-soldados, erva-dos-carpinteiros, botão-de-prata (LORENZI e MATOS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997). O nome do gênero, *Achillea*, provavelmente deriva de Aquiles, herói da mitologia grega, que

empregava as folhas da *A. millefolium* para estancar a hemorragia dos ferimentos dos seus soldados, na guerra de Tróia (~1200 a.C.) (CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998; CÁCERES, 1999). Já o nome da espécie, *millefolium*, deriva da característica da folha, cujo aspecto assemelha-se a inúmeras folhas numa só (CHANDLER, 1989).

Existem cerca de 100 espécies do gênero *Achillea* L. (Asteraceae) amplamente distribuídas no hemisfério norte. As plantas deste gênero têm sido utilizadas na medicina popular devido suas numerosas propriedades medicinais (SI *et al.*, 2006), como atividade antiflogística, antiinflamatória, propriedades analgésicas e antipiréticas, atividade antimicrobiana, citotóxica, distúrbios hemodinâmicos (como varizes, trombose, hemorróidas), afecções da pele, hipertensão arterial, asma, pleurisia, gastrite, úlcera, entre outras (ALJANCIC *et al.*, 1999; ALONSO, 1998; BENEDEK *et al.*, 2007; BLUMENTHAU *et al.*, 2000; CÁCERES, 1999; FONT QUER, 1985; MORS *et al.*, 2000).

A. millefolium apresenta-se como uma planta herbácea perene, rizomatosa, ereta, aromática, entouceirada, de 30 a 50 cm de altura. Suas folhas são compostas, finamente pinadas; as inflorescências são brancas ou rosáceas, em capítulos reunidos em uma panícula terminal. É uma planta de clima subtropical, aprecia o calor e resiste bem à seca. Ocorre de forma nativa na Europa, América do Norte, sul da Austrália e norte da Ásia, e é amplamente cultivada em hortas domésticas em quase todo o Brasil (LORENZI e MATOS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997).



Figura 2. Exemplar de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Foto: Arquimedes Gasparotto Jr, Umuarama – PR., 2007.

Estudos fitoquímicos demonstram a presença de cineol, borneol, pinenos, cânfora, mentol, eugenol, azuleno, camazuleno (LORENZI, 2002; PANIZZA, 1997), flavonóides como centaureidina, casticina, apigenina, luteolina, artemetina, rutina, quercetina, acacetina (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; GUEDON *et al.*, 1993; TESKE e TRENTIN, 1997) sesquiterpenos como paulitina, isopaulitina, psilostacina C, desacetilmatricarina, sistenina (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; GLASL *et al.*, 2002), alcalóides como a achileina (MILLER e CHOW, 1954), esteróides como β -sitosterol, estigmasterol, colesterol, campesterol, triterpenos como α -amirina, β -amirina, taraxasterol, pseudotaraxasterol (CHANDLER *et al.*, 1982), taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, ácidos graxos, alcalóides, e princípio amargo (LORENZI *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997; PIRES *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Achillea* têm sido objeto de grande número de investigações farmacológicas. Os compostos fenólicos como os flavonóides são considerados importantes compostos farmacologicamente ativos presentes em

espécies deste gênero. Tanto a atividade espasmolítica verificada em intestino de coelho isolado e em íleo isolado de cobaia (HALBERSTEIN, 2005; LEMMENS-GRUBER *et al.*, 2006), como também atividade antiflogística de *A. millefolium* L. foi atribuída a presença de flavonóides (BLUMENTHAU *et al.*, 2000). As flavonas, isoladas das partes aéreas de *A. atrata* L. *multifida*, parecem possuir atividade antimicrobiana *in vitro* (ALJANCIC *et al.*, 1999). Um estudo com extrato metanólico de *A. ageratum* L. em diversos modelos experimentais mostrou propriedades analgésicas e antipiréticas, no qual a investigação fitoquímica do extrato revelou a presença de compostos polifenólicos, sugerindo que os flavonóides fossem os responsáveis por estes efeitos (GARCIA *et al.*, 1997). Dois flavonóides, casticina (HAIDARA *et al.*, 2006) e centaureidina (TRIFUNOVIC *et al.*, 2006), respectivamente derivados de *A. millefolium* e *A. clavennae*, mostraram exercer atividade citotóxica. Além disso, os resultados de um estudo *in vitro*, mostraram que os flavonóides presentes no extrato de *A. millefolium* exibiam atividade estrogênica (INNOCENTI *et al.*, 2007).

O extrato bruto de *A. millefolium* já foi estudado em relação ao efeito hepatoprotetor contra d-galactosaminase (d-GalN) e lipopolissacarídeo (LPS) que agem induzindo hepatite em ratos e efeito antiespasmódico em preparações de intestino isolado. A co-administração de LPS e d-GalN produziu uma taxa de mortalidade de 100% em ratos. O pré-tratamento dos animais com extrato bruto de *A. millefolium* reduziu essa taxa de mortalidade para 40%. Além disso, os aumentos plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram prevenidos com a administração do extrato de *Achillea*. Também houve uma melhora na arquitetura hepática, com ausência de congestão parenquimal e diminuição da apoptose celular. Em preparações de jejuno de

coelho isolado, o extrato bruto de *A. millefolium* causou um relaxamento concentração-dependente tanto das contrações espontâneas como das contrações induzidas por potássio, e ainda perfil de deslocamento de curva concentração resposta ao cálcio semelhante ao verapamil. Por isto, estes resultados indicam que o extrato bruto de *A. millefolium* exibe efeito hepatoprotetor, que pode ser parcialmente atribuído ao bloqueio dos canais de cálcio (YAEESH *et al.*, 2006).

Outras atribuições a *A. millefolium* incluem sua ação antiinflamatória, onde estudos mostraram este efeito para o composto azuleno (ZITTER-EGLEER *et al.*, 1991; KASTNER *et al.*, 1993). Além disso, frações ricas em lactonas sesquiterpênicas mostraram exibir ação anti-flogística, por inibirem o edema induzido por óleo de cróton em orelha de camundongos (DELLA LOGGIA *et al.*, 1992).

Outra espécie do gênero *Achillea*, a *A. wilhelmsii* C. Koch é amplamente constituída de flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, que têm mostrado serem efetivas na redução dos lipídios séricos e na hipertensão arterial. Em um estudo clínico onde os indivíduos foram tratados com pastilhas de *A. wilhelmsii* C. Koch (de 15 a 20 pastilhas duas vezes ao dia por 6 meses), observou-se uma diminuição nos níveis de triglicérides, colesterol total e LDL-colesterol. Os níveis de HDL aumentaram significativamente após 6 meses de tratamento. E uma significativa redução na pressão sanguínea sistólica e diastólica foi observada depois do tratamento (ASGARY *et al.*, 2000).

O flavonóide artemetina, 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (figura 3), apresentou efeitos antiinflamatórios em ratos *Wistar*, onde a administração por via oral reduziu o edema de pata induzido pela carragenina, a formação de

granuloma induzido por *pellet* de algodão e a permeabilidade vascular induzida por histamina. Além disso, foram avaliadas também a segurança em relação ao seu uso prolongado, onde a artemetina administrada em ratos por via oral, em doses superiores às antiinflamatórias, durante 30 dias, não alterou o consumo de água e de alimentos, o ganho de peso corporal, não alterou parâmetros hepáticos e renais, além de não ter desenvolvido úlceras e nem ter alterado o comportamento dos animais (SERTIÉ, 1990).

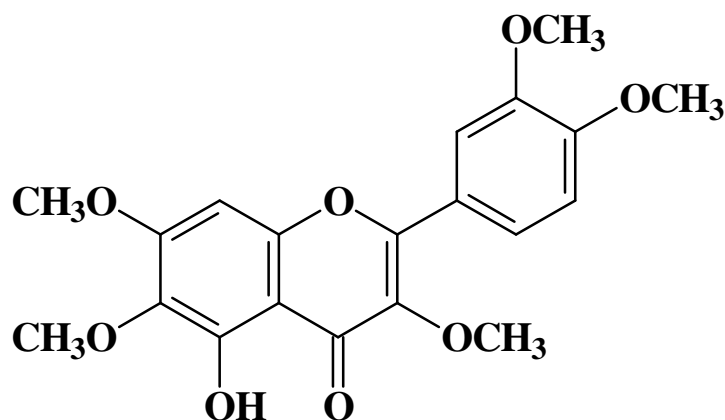


Figura 3. Estrutura do flavonóide artemetina.

A *A. millefolium* é considerada uma planta de baixa toxicidade, o que contribui com sua utilização pela população, sendo classificada como de uso seguro (DUKE, 1988), além de já ter sido aprovada pela *Food and Drug Association (FDA)* em bebidas alcoólicas (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Porém há também relatos de toxicidade, onde os constituintes químicos citados na literatura como potencialmente tóxicos são a cânfora, a rutina, as tujonas, o terpineol, o cineol e o ácido isovalérico (DUKE, 1988).

Apesar de *A. millefolium* L. ser bem conhecida na medicina tradicional brasileira como apresentando propriedades anti-hipertensivas e diuréticas, nenhum estudo científico tem demonstrado esta sua ação etnofarmacológica. Por isto, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito hipotensor e diurético do extrato hidro-etanólico, frações e compostos obtidos das partes aéreas de *A. millefolium* em ratos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o possível efeito hipotensor e diurético do extrato, frações e artemetina obtidos de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) em ratos, evidenciando o mecanismo de ação envolvido neste efeito.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar as diferentes doses do extrato hidroetanólico de *A. millefolium* (HEAM) capazes de promover efeitos sobre a pressão arterial média de ratos normotensos anestesiados. Além de determinar a dose efetiva, investigar se a administração oral do HEAM em diferentes tempos também promove resposta hipotensora;
- Verificar se as frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcE), butanólica (BT) e diferentes doses da sub-fração DCM-2, além do composto puro artemetina obtidas de HEAM, são capazes de promover efeito hipotensor em ratos normotensos anestesiados;
- Determinar se existe o envolvimento do sistema renina-angiotensina na atividade hipotensora da artemetina;
- Determinar se existe a participação de mediadores endoteliais, em especial o óxido nítrico, no efeito hipotensor da artemetina;

- Verificar se diferentes doses do extrato hidroetanólico de *A. millefolium* (HEAM) e fração (DCM-2) são capazes de apresentar propriedades diuréticas em ratos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises fitoquímicas

3.1.1. Material Botânico

A. millefolium foi fornecida pelo MSc Arquimedes Gasparotto Jr, sendo coletada em julho de 2007 no horto de plantas medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR) campus Umuarama, a 430 m de altitude acima do nível do mar (S23°47'55 – W53°18'48). A planta foi identificada pela Dra. Mariza Barion Romagnolo (Departamento de Botânica, UNIPAR). Um exemplar da espécie encontra-se depositado no herbário da UNIPAR sob número 2230.

O fracionamento, caracterização química e isolamento de compostos foi realizado pela prof. Dra. Maria Élide Alves Stefanello do Departamento de Química da UFPR.

3.1.2. Preparação do extrato hidro-etanólico, frações, sub-fração e isolamento de artemetina

As partes aéreas secas e trituradas de *A. millefolium* foram extraídas com etanol 90% a temperatura ambiente. A solução foi concentrada em um rota-evaporador a vácuo, filtrada e a solução final liofilizada, fornecendo o extrato bruto hidro-etanólico (HEAM, rendimento – 17,39%).

O HEAM foi ressuspenso em etanol-água (EtOH-H₂O) (1:1) e então extraído com diclorometano (CH₂Cl₂) (DCM), acetato de etila (EtOAc) (AcE) e 1-butanol (BuOH) (BT), sucessivamente. A evaporação do solvente rendeu as frações em CH₂Cl₂ (20%), EtOAc (10%) e BuOH (50%). A atividade foi concentrada na fração CH₂Cl₂. Uma alíquota (4,4 g) desta fração foi submetida a

uma coluna cromatográfica a vácuo em sílica gel, eluída com éter de petróleo, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -MeOH (3:1) e metanol puro (MeOH) originando 4 frações: F1 (0,06 g), F2 (1,22 g), F3 (2,68 g) e F4 (0,74g). A fração F2 (DCM-2) foi então submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel eluída com acetato de etila e hexano, gerando 20 frações. A fração 17 (60 mg) rendeu artemetina quase pura. Esta foi purificada através de uma coluna cromatográfica em camada delgada preparativa com hexano- CH_2Cl_2 -MeOH (2:1:0.1) gerando a artemetina pura (13,8 mg), um flavonóide previamente reportado em *A. millefolium* (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009). Este composto foi identificado por ^1H e ^{13}C RMN (200 MHz, CDCl_3) e comparado com dados relatados anteriormente (BARBERÁ *et al.*, 1986).

Para os testes, tanto o extrato como as frações foram solubilizados em solução aquosa com 5% Tween 80 em um volume final de 1 mL imediatamente antes da administração. O flavonóide artemetina (solução estoque) foi solubilizado em uma solução de bicarbonato de sódio (0,5%) e o volume final completado com solução salina (0,9%).

Os passos do fracionamento bio-monitorado estão esquematizados na figura 4.

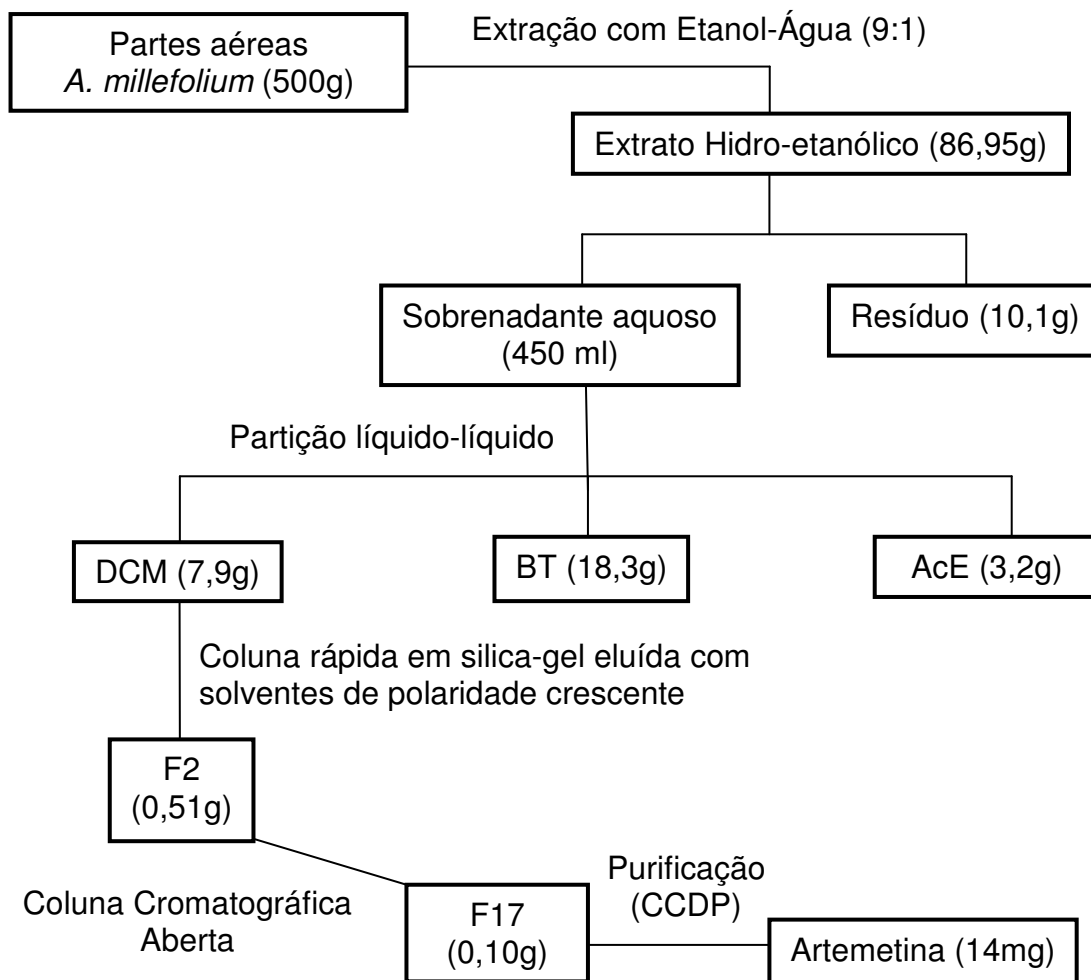


Figura 4: Fluxograma do processo de fracionamento de *A. millefolium*.

DCM – fração diclorometano; BT – fração butanólica; AcE – fração acetato de etila; F2 – sub-fração DCM-2; CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa.

3.2. Análises farmacológicas

3.2.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (220-280 g), com idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e o

ciclo claro/escuro de 12 horas. Algumas destas metodologias já são realizadas rotineiramente no laboratório de Validação de Produtos Naturais com atividade anti-hipertensiva e outras metodologias foram padronizadas. Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob número de autorização 240.

3.2.2. Drogas

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), sulfato de magnésio (MgSO₄), cloreto de cálcio (CaCl₂), dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), glicose e acetilcolina foram obtidas da Merck (Alemanha), angiotensina I, angiotensina II, bradicinina, N- ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME), captopril, losartan, hidroclorotiazida, o-ftaldialdeído, N-hipuril-His-Leu hidrato, reagente de Griess, sulfato de zinco, todas obtidas da Sigma (St. Louis, MO, USA), xilazina, cetamina e tiopental foram adquiridas da Bayer.

Bradicinina e angiotensinas I e II (solução estoque) foram dissolvidas em ácido clorídrico (0,5 N). Todas as outras drogas foram preparadas em solução salina (0,9%).

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

Os animais (ratos machos) foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administradas pela via intramuscular e suplementadas a

intervalos de 45 – 60 minutos. Após a fixação do animal em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 20), destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina, diluída em solução salina, foi administrada para prevenir coágulos e obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia e mantidos sob respiração espontânea. A artéria carótida esquerda de cada animal foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um catéter de polietileno (PE 20), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinado à mensuração contínua da pressão arterial. Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma overdose de tiopental (superior a 40mg/Kg i.v.).

Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, EUA) conectados a um computador Macintosh contendo um software específico de integração (Chart v 4.00, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, EUA).

3.2.4. Avaliação dos efeitos de HEAM, frações e artemetina na pressão arterial média (PAM) de ratos

Nestes experimentos uma única dose de HEAM (100 mg/kg, v.o.), ou veículo (CT), foram administrados aos animais 1,5, 3, 6 e 12 horas antes da mensuração da PAM. A cirurgia foi iniciada 30 minutos antes do tempo desejado. Um intervalo de 15 minutos foi dado, e então a PAM foi mensurada por mais 30 minutos. Outros grupos receberam HEAM (30-300 mg/kg, v.o.) ou veículo e tiveram a PAM mensurada no tempo de 3 horas. O mesmo protocolo foi seguido para as frações, onde diferentes grupos receberam fração butanólica (50 mg/kg, v.o.), fração acetato de etila (10 mg/kg, v.o.), fração diclorometano (20 mg/kg, v.o.), subfração DCM-2 (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) ou controle. E ainda, para avaliar os efeitos da artemetina, o tratamento oral (1,5 mg/kg) no tempo de 3 horas, e injeção intravenosa (nas doses de 0,15, 0,35, 0,75 ou 1,5 mg/kg) ou controle (veículo – salina) foram realizados. Todas as doses utilizadas nestes experimentos foram calculadas a partir do rendimento do processo extrativo, baseado na dose em que o HEAM apresentou eficácia.

3.2.5. Efeito da pré-administração de artemetina sobre a elevação da PAM induzida por angiotensina I e angiotensina II

Todas as drogas foram dissolvidas em salina e administradas em 200 µl de *bolus* intravenoso. O protocolo seguido foi adaptado de MONTENEGRO *et al.*, (2009). Depois da avaliação da PAM basal, os animais receberam angiotensina I (Ang I) ou angiotensina II (Ang II) nas doses de 0,1, 1 e 3 nmol/kg. Todas as doses foram selecionadas com base em estudos anteriores (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007). Quando a PAM retornava aos valores basais, artemetina (0,75 mg/kg) ou grupos controle (captopril na dose de 10 nmol/kg, losartan na dose de 1,0

mg/kg), ou somente salina (0,9%), foram administrados 5 minutos antes e o protocolo foi repetido (Ang I ou Ang II). As mudanças na PAM foram calculadas como a diferença entre os valores basais e aos maiores valores mensurados após a administração de cada dose de Ang I ou Ang II.

3.2.6. Efeito da pré-administração de artemetina sobre o efeito hipotensor da bradicinina

Todas as drogas foram dissolvidas em salina e administradas em 200 µl de *bolus* intravenoso. Para este protocolo seguimos o modelo descrito por MONTENEGRO e cols (2009). Depois da avaliação da PAM basal, os animais receberam administração intravenosa de bradicinina (BK) na dose de 10 nmol/kg. Dose selecionada com base em estudos anteriores (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007). Quando a PAM retornava aos valores basais, artemetina (0,75 mg/kg), captopril (10 nmol/kg) ou somente salina (0,9%), foram administrados por um período de 5 minutos e o protocolo foi repetido (BK). As mudanças na PAM foram calculadas como a diferença entre os valores basais e aos menores valores mensurados após a administração de BK.

3.2.7. Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática

Para este ensaio de atividade da ECA *ex vivo*, foram coletadas amostras de sangue da aorta abdominal de animais anestesiados pré-tratados, 3 horas antes, com artemetina (1,5 mg/kg), captopril (20 mg/kg) e controle (veículo – tween 5% + água destilada). O sangue foi acondicionado em tubos e

centrifugados a 1.000 g (10 minutos, 4 °C) para separação do plasma. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer -70 °C até a realização das dosagens. O soro (10 µL) foi incubado com 490 µL de uma solução contendo 5 mM Hip-His-Leu em 0.4 M tampão fosfato de sódio, pH 8.3, e 0.9 M NaCl por 15 min à 37 °C. A reação foi cessada com a adição de 1,2 mL de NaOH 0,34 N. O produto, His-Leu, foi mensurado fluorometricamente (365 nm excitação e 495 emissão, Aminco Model J4-7461 fluoromonitor, American Instrument Co., Silver Springs, MD) depois da adição de 100 µL de o-ftaldialdeído (20 mg/ml) em metanol, e após 10 minutos seguiu-se com a adição de 200 µL de HCl 3 N e centrifugação a 800 g por 5 min a temperatura ambiente.

3.2.8. Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) vascular

Para o ensaio de atividade da ECA *in vitro* utilizamos as aortas torácicas descendentes dos mesmos animais tratados para a coleta de sangue, conforme descrito no item 3.2.7. Após a remoção do seu tecido conectivo, a aorta foi seccionada em anéis e acondicionada através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs em mM: NaCl 110,8, KCl 5,9, NaHCO₃ 25,0, MgSO₄ 1,07, CaCl₂ 2,49, NaH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51; aerados com carbogênio (95% O₂/5% CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C e submetidos a tensão basal de 1 g. Foi adotado um intervalo de uma hora com trocas da solução nutritiva a cada 15 min, para estabilização das preparações. Em seguida, as preparações foram expostas a uma curva concentração resposta a angiotensina I (1 nM – 10 µM). Os valores de responsividade a vasoconstrição (em gramas) do grupo controle foram

comparados com os resultados obtidos com os grupos que receberam tratamento com artemetina ou captopril. Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, ADI Instruments, Austrália).

3.2.9. Avaliação dos efeitos da artemetina sobre a PAM de ratos expostos à infusão de L-NAME

Os animais foram preparados para o registro da PAM conforme descrito anteriormente (item 3.2.3) 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 com N- ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME; 7 mg/kg/min – correspondente a 10 μ l/min) por 30 minutos. Após esse período foi administrado, pela outra veia femoral, artemetina (0,75 mg/kg), acetilcolina (10 nmol/kg) ou apenas salina, com intervalos de 10 minutos entre cada administração. O mesmo procedimento foi repetido com outro grupo de animais, porém não foi administrado infusão com L-NAME. Este protocolo bem como as doses utilizadas de cada droga foram baseados em estudos anteriores (CRESTANI *et al.*, 2009).

3.2.10 Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx).

Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal de animais anestesiados pré-tratados, 3 horas antes, com artemetina (1,5 mg/kg), captopril (20 mg/kg) ou controle (veículo – tween 5% + água destilada). O sangue foi acondicionado em tubos e centrifugados a 1.000 g (10 minutos, 4 °C) para separação do plasma. As amostras foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -70 °C até a realização das dosagens.

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

3.2.11. Atividade diurética

Para a determinação da atividade diurética seguimos o modelo descrito por KAU e cols (1984), onde 8 horas antes do teste os ratos tiveram acesso somente à água, e em seguida os ratos machos (n = 5) foram pré-tratados com uma solução de salina (5% do peso corporal) via oral, e uma hora após distribuídos em 7 diferentes grupos: grupo controle (tratado com água destilada acrescido de 5%

de Tween 80 que foi utilizado como veículo para solubilização do extrato – 5 ml/kg do peso corporal), grupo controle positivo (tratado com hidroclorotiazida (HCTZ), 10 mg/kg – 5 ml/kg do peso corporal) e os grupos tratados com HEAM - (administrados 5 ml/kg do peso corporal de HEAM 30, 100 e 300 mg/kg) e subfração DCM-2 (administrados 5 ml/kg do peso corporal de DCM-2 10 e 30 mg/kg). Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e o volume de urina medido a cada 2 h durante 8 h. Após este período, a excreção cumulativa da urina foi calculada em relação ao peso corporal e expressa como ml/100g de peso corporal. As concentrações de eletrólitos (Na^+ e K^+), pH, densidade e condutividade foram estimadas de cada amostra de urina coletada de cada animal no final do experimento (8h).

As concentrações de Na^+ e K^+ foram mensuradas usando fotômetro de chama (Jenway Corp. modelo PFP7). O instrumento foi calibrado com solução padrão contendo diferentes concentrações de Na^+ e K^+ , e foram feitas as leituras das amostras, previamente diluídas em água destilada (1:200), sob comprimentos de onda específicos (Na^+ - 589nm e K^+ - 768nm).

A condutividade e pH foram diretamente determinadas nas amostras frescas de urina usando um condutímetro (LF-320 WTF), e um pHmetro (HI-8424, Hanna Instruments), respectivamente. A estimação da densidade foi feita pelo peso da amostra em balança analítica (Mettel AE 163) sob o volume mensurado com o auxílio de micropipetas.

3.2.12. Análise dos resultados e testes estatísticos

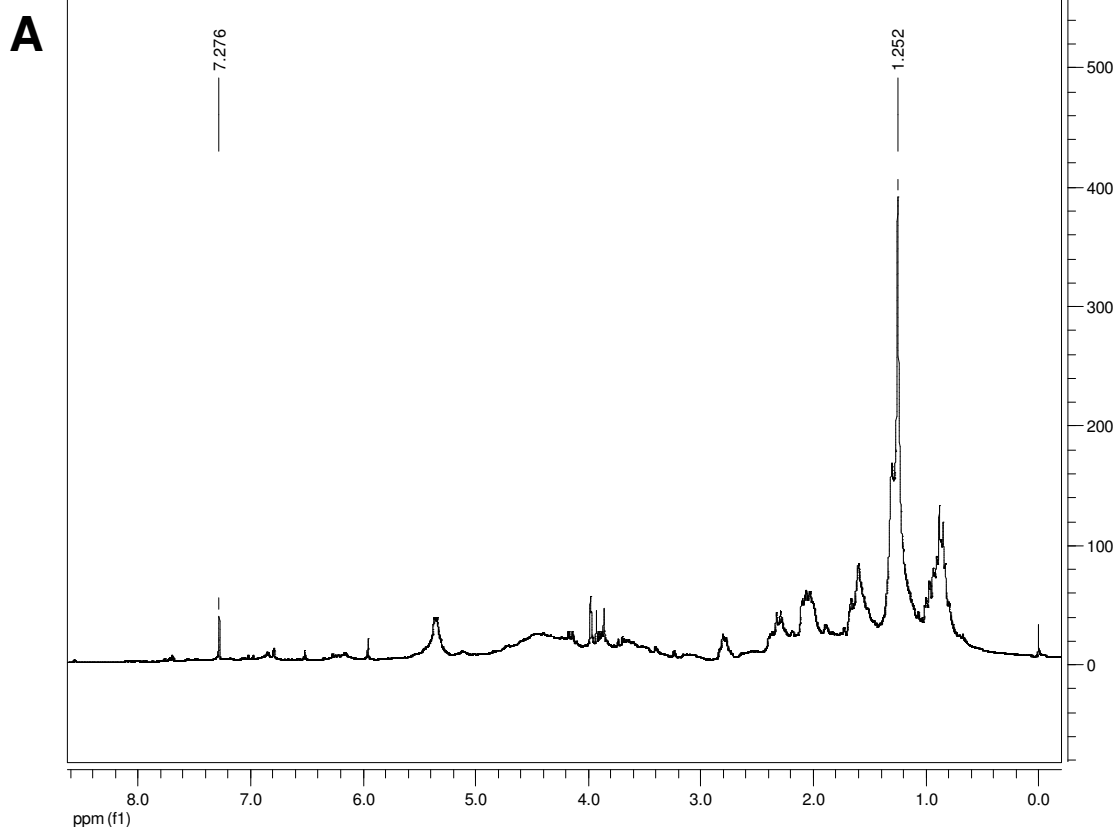
Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão médio (S.E.M) de 4-8 animais. Todos os gráficos apresentados foram produzidos com o auxílio

do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Para a análise estatística, foram utilizados a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste t de Bonferroni ou o teste t de Student, para amostras não pareadas. Foram considerados estatisticamente significantes os testes cujo valor de p foi menor que 0,05.

IV. RESULTADOS

4.1. Análise Fitoquímica

O espectro de RMN ^1H obtido da fração DCM revelou presença abundante de impurezas, com deslocamentos químicos minoritários que poderiam sugerir a presença de metabólitos secundários (Figura 5A). Com a purificação da fração DCM e obtenção do espectro de RMN ^1H da sub-fração DCM-2, foi possível verificar a presença de deslocamentos químicos característicos de flavonóides (presença de radicais metoxilados, anéis aromáticos, e radical hidroxila), porém ainda apresentava diversos deslocamentos característicos à presença de impurezas (Figura 5B). Com a purificação da sub-fração DCM-2, foi possível obter a artemetina purificada, em que seu espectro revelou os deslocamentos químicos de seus radicais, hidroxila e metoxilas, além da região de anéis aromáticos, muito semelhante à fração anterior, porém com eliminação das impurezas (Figura 5C). A sobreposição dos espectros obtidos da fração DCM, DCM-2 e composto isolado, mostra que o fracionamento permitiu o isolamento do composto majoritário da fração inicial com eliminação das impurezas (Figura 5D).



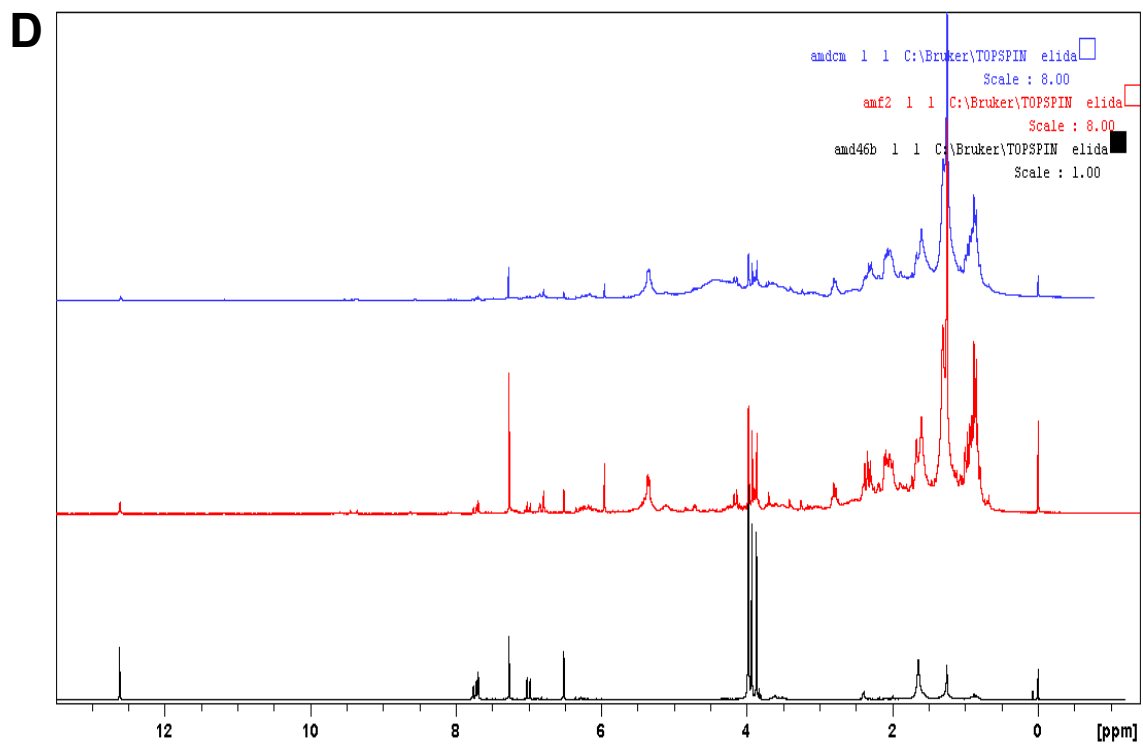
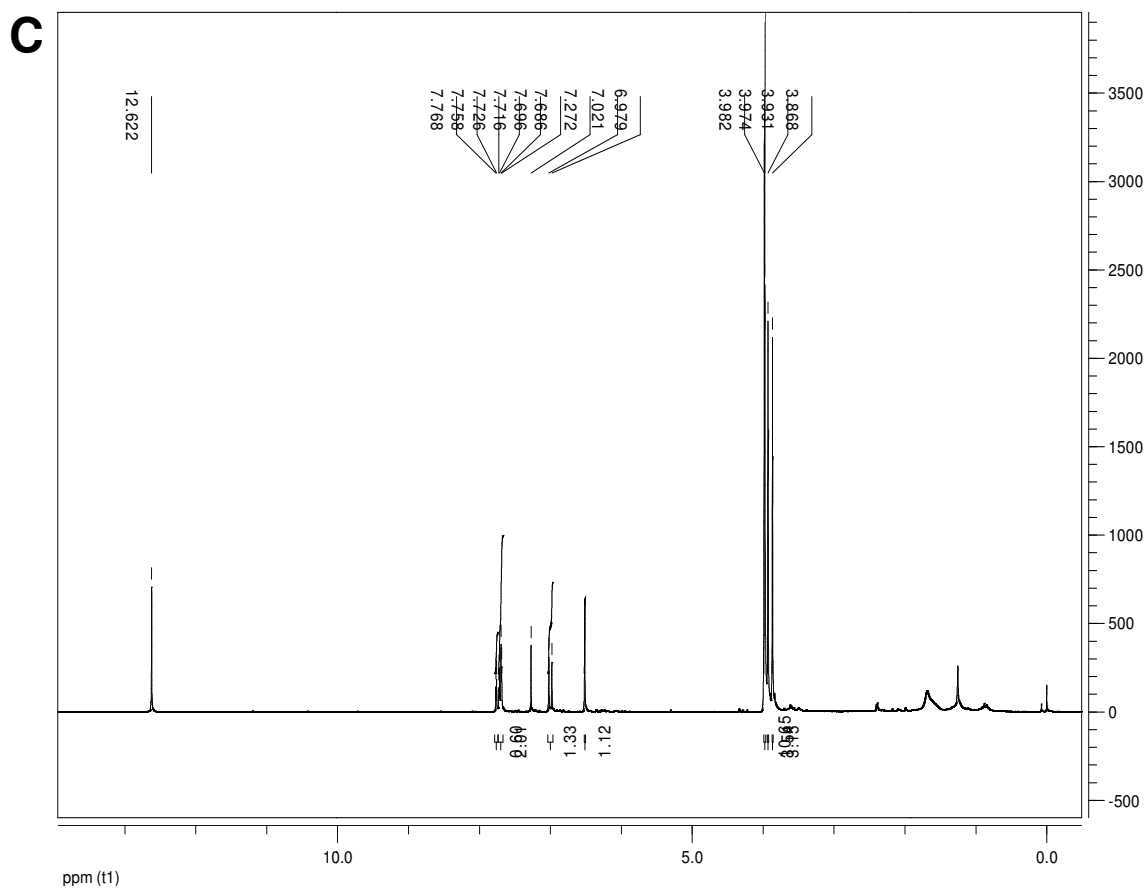
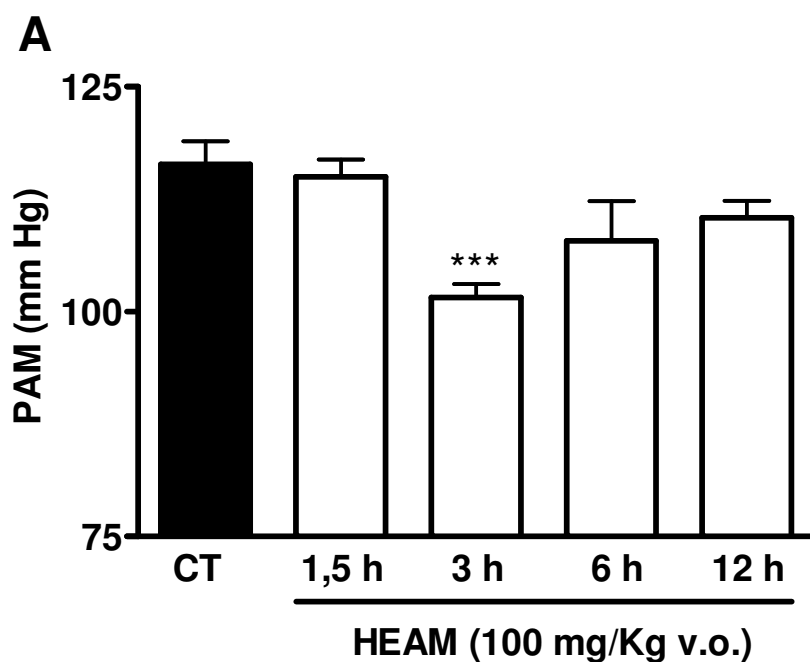


Figura. 5. Análise RMN ¹H. (A) – Espectro obtido da fração DCM; (B) – Espectro obtido da sub-fração DCM-2; (C) – Espectro de artemetina purificada; (D) – Sobreposição dos espectros obtidos da fração DCM, DCM-2 e de artemetina.

4.2. Efeito hipotensor do extrato hidro-etanólico de *A. millefolium* (HEAM) em ratos normotensos anestesiados

Para todos os protocolos realizados os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico descrito no item 3.2.3. Em animais controle, os valores da pressão arterial média (PAM) basal foram de $116,4 \pm 2,5$ mm Hg. Três horas após, mas não em outros tempos analisados, o tratamento oral com HEAM (100 mg/kg) reduziu a PAM de ratos normotensos anestesiados em $13,0 \pm 1,0$ mm Hg. (Figura 6A), quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo). Baseado na dose que reduziu significativamente a PAM (3 horas), os experimentos com outras doses de HEAM (30 e 300 mg/kg) foram realizados. HEAM foi capaz de reduzir a PAM de ratos normotensos anestesiados, nas doses de 100 e 300 mg/kg, com redução máxima de $13,0 \pm 3,0$ mm Hg (300 mg/kg) quando comparado com o grupo controle (Figura 6B).



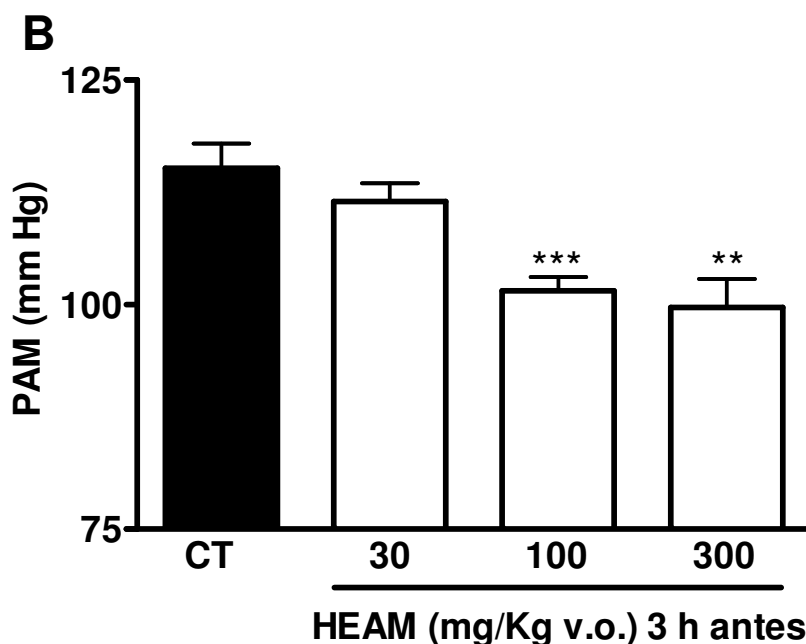


Figura 6. Efeito hipotensor induzido por HEAM em ratos normotensos anestesiados. (A) Pressão arterial média (mm Hg) em ratos pré-tratados via oral com HEAM (100 mg/kg) em diferentes tempos (1,5, 3, 6 e 12 horas). **(B)** Pressão arterial média (mm Hg) em ratos pré-tratados (3 horas) via oral com HEAM (30, 100 e 300 mg/kg). Os animais controle (CT) receberam apenas veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.3. Efeito das frações obtidas de *A. millefolium* na pressão arterial média de ratos normotensos anestesiados

O pré-tratamento via oral (3 horas) com a fração DCM, mas não com a BT e AcE, reduziu a PAM de ratos normotensos anestesiados em 11 ± 1 mm Hg, na dose de 20 mg/kg, comparado com o grupo controle, que neste experimento apresentaram PAM de $107,2 \pm 1,1$ mm Hg (Figura 7A). Através de estudos fitoquímicos, a sub-fração DCM-2 foi obtida e então testada nas mesmas condições das demais frações. A sub-fração DCM-2 também foi capaz de reduzir a PAM de ratos normotensos anestesiados (10 e 30 mg/kg), 3 horas após o tratamento oral, com reduções de 10 ± 1 e 11 ± 2 mm Hg respectivamente,

comparado com o grupo controle, que apresentaram PAM basal de $114,8 \pm 2,8$ mm Hg (Figure 7B).

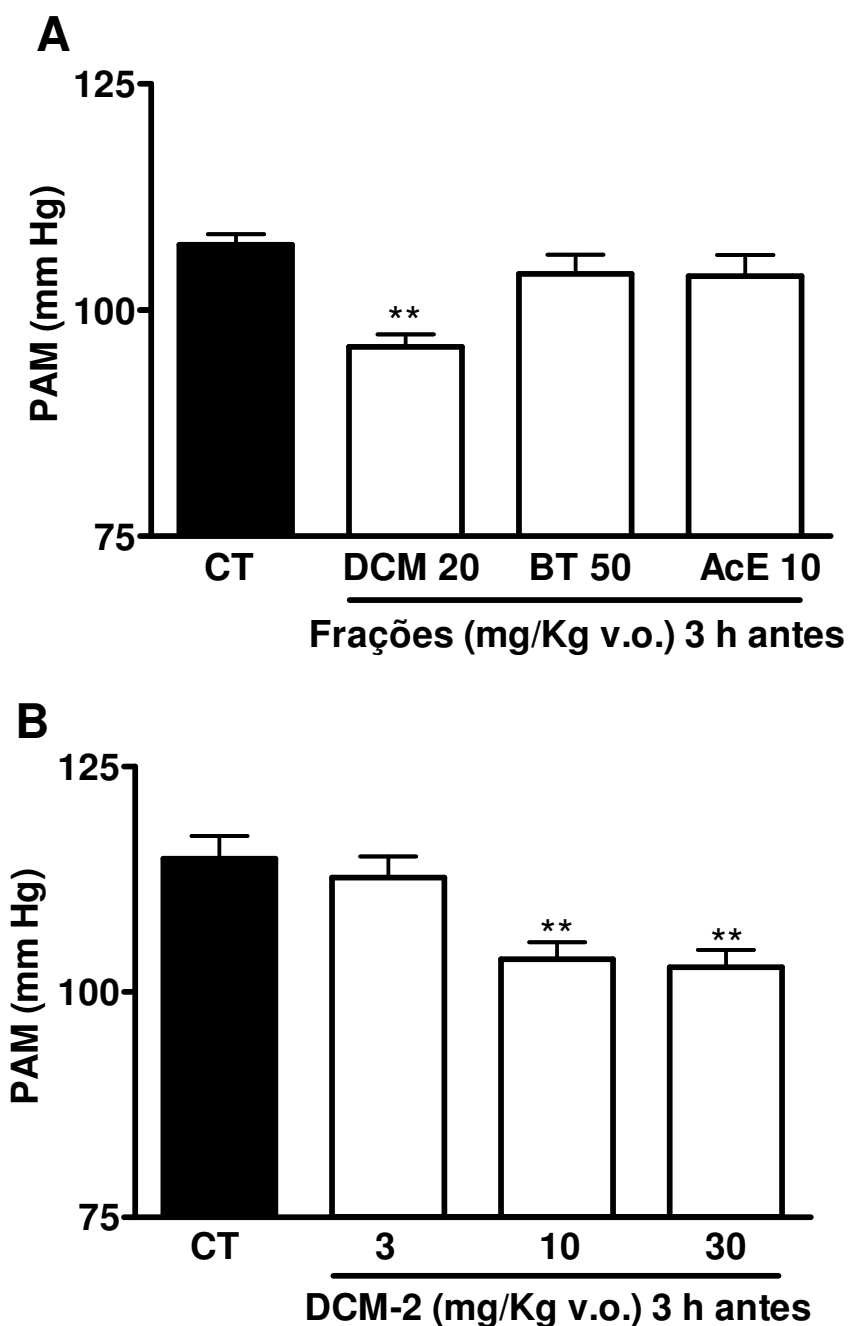
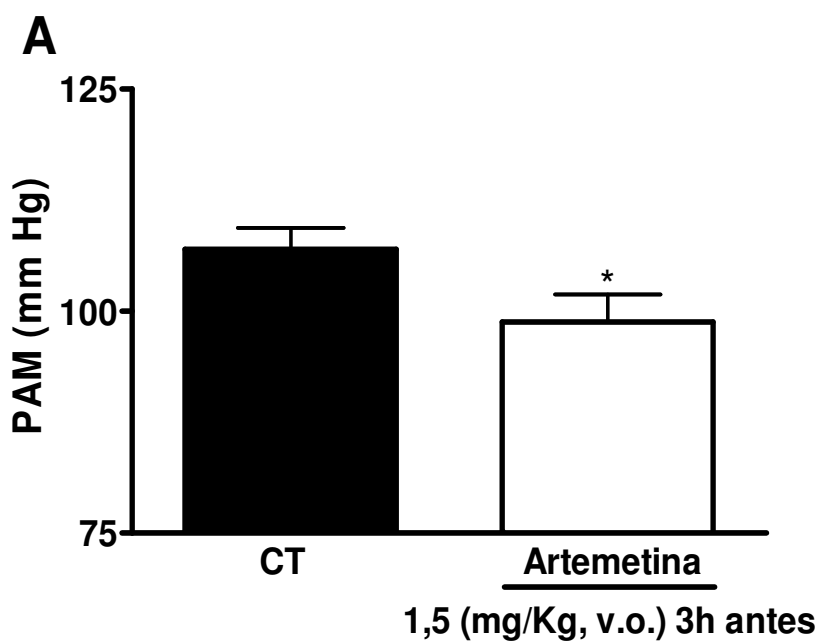


Figura 7. Efeito hipotensor induzido pelas frações DCM e DCM-2 em ratos normotensos anestesiados. (A) Pressão arterial média (mm Hg) em ratos pré-tratados via oral (3 horas) com as frações DCM, BT e AcE, respectivamente nas doses de 20, 50 e 10 mg/kg. **(B)** Pressão arterial média (mm Hg) em ratos pré-tratados via oral (3 horas) com DCM-2 (3, 10 e 30 mg/kg). Os animais controle (CT) receberam apenas veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde $**p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.4. Efeito do tratamento oral e injeção intravenosa de artemetina sob a PAM de ratos normotensos anestesiados

O composto isolado artemetina, alterou a PAM de ratos normotensos anestesiados em 8 ± 3 mm Hg comparado com o grupo controle (PAM basal de $106,9 \pm 2,44$ mm Hg), na dose de 1,5 mg/kg, 3 horas após o tratamento oral (Figura 8A). Ainda, a administração intravenosa de artemetina, em ratos, resultou em um significativo efeito hipotensivo, com redução dose-dependente da PAM de $5,6 \pm 0,9$, $11,0 \pm 1,0$ e $11,5 \pm 1,5$ mm Hg, respectivamente nas doses de 0,35, 0,75 e 1,5 mg/kg, comparados com o grupo controle (Figura 8B).



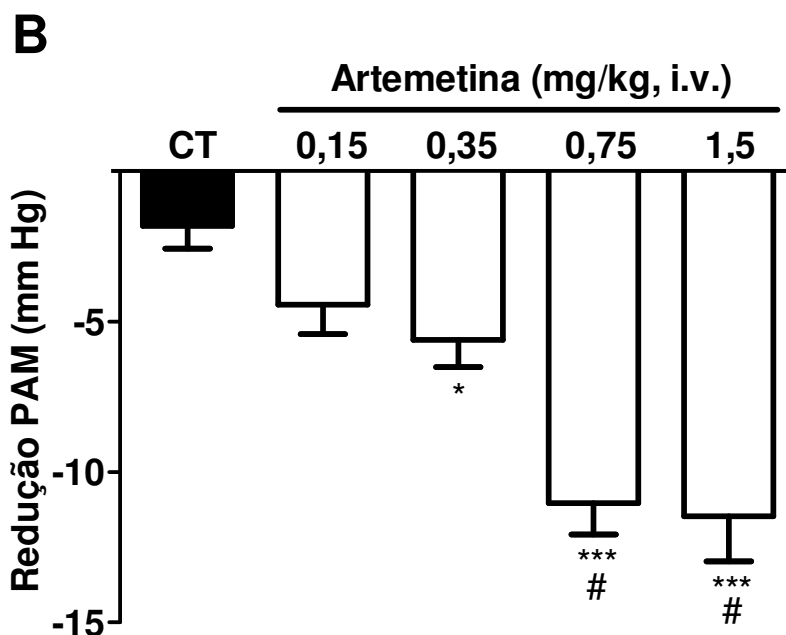


Figura 8. Efeito hipotensor da artemetina obtida de *A. millefolium* em ratos normotensos anestesiados. (A) Pressão arterial média (mm Hg) em ratos pré-tratados via oral com artemetina (3 horas), na dose de 1,5 mg/kg. Os animais controle receberam apenas veículo. **(B)** Efeito hipotensor da administração intravenosa de artemetina (0,35, 0,75 e 1,5 mg/kg) em ratos. Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo artemetina 0,35 mg/kg (figura B), e para as amostras não pareadas teste *t* de Student (figura A).

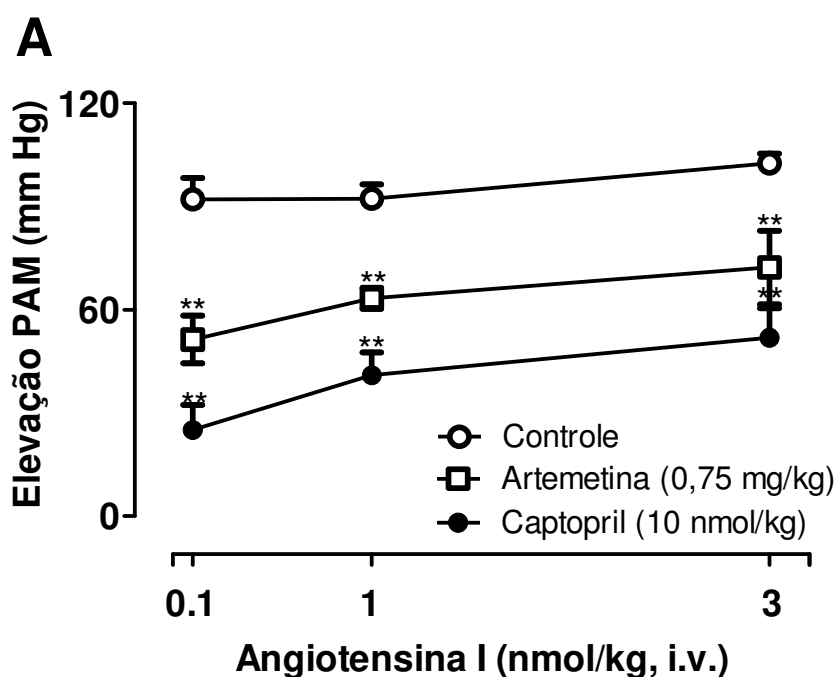
4.5. Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina I

Para investigar o mecanismo de ação deste flavonóide, foi realizado o teste de atividade da ECA em modelo animal *in vivo*. Inicialmente, avaliamos o efeito do captopril (10 nmol/kg), um inibidor da atividade da ECA de referência clínica, que foi capaz de reduzir o efeito hipertensivo induzido pela Ang I em 75 ± 7 , 59 ± 7 e 55 ± 7 %, respectivamente nas doses de 0,1, 1 e 3 nmol/kg, quando comparado com o grupo controle (Figura 9A).

A administração intravenosa de uma única dose de artemetina (0,75 mg/kg), em ratos normotensos anestesiados, resultou em uma redução da

resposta hipertensiva induzida pela Ang I em 49 ± 7 , 37 ± 7 e 37 ± 9 %, respectivamente nas doses de 0,1, 1 e 3 nmol/kg, comparados com o grupo controle (Figura 9A).

O tempo de duração do efeito hipertensivo induzido pela Ang I (segundos) também foi investigado, e tanto a artemetina quanto o captopril foram capazes de reduzir este tempo de efeito. A administração intravenosa de artemetina (0,75 mg/kg) resultou em uma pequena redução, mais estatisticamente significativa, do tempo do efeito da Ang I em 21 ± 3 , 25 ± 3 e 24 ± 10 %, respectivamente. E a administração intravenosa de captopril (10 nmol/kg), resultou em uma redução do tempo de efeito da Ang I em 55 ± 7 , 49 ± 11 e 47 ± 13 %, respectivamente, comparados com o grupo controle (Figura 9B).



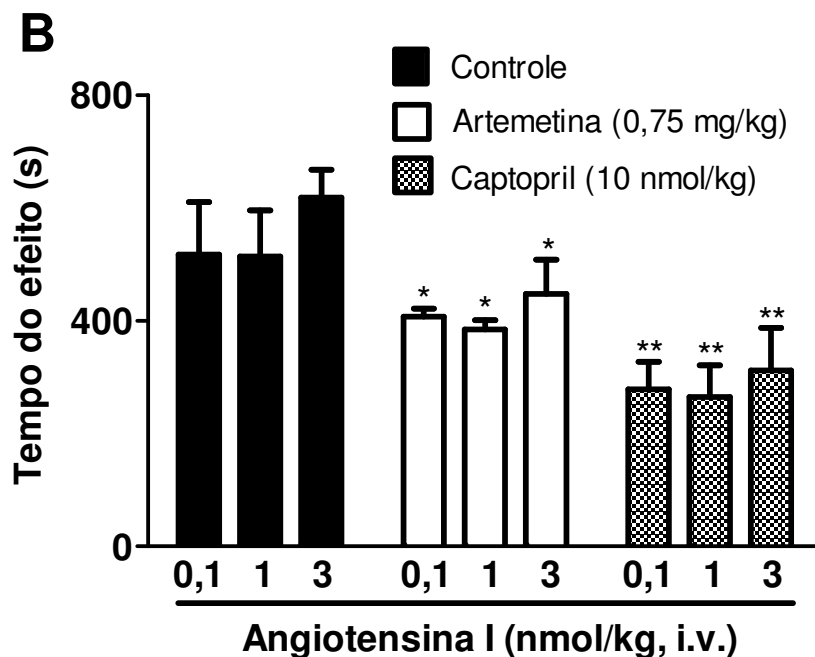
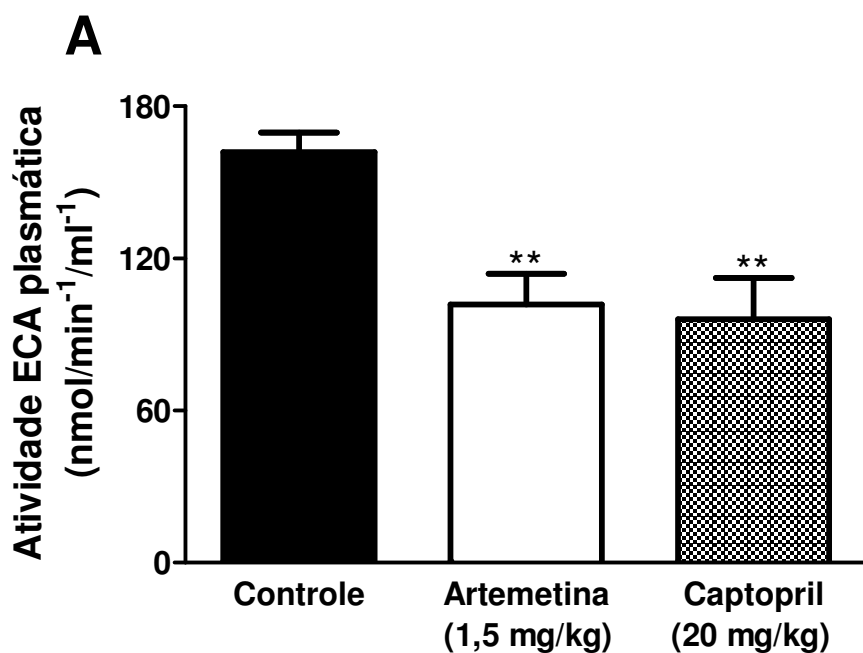


Figura 9. Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina I em ratos normotensos anestesiados. (A) Alteração na PAM (mm Hg) em ratos após administração intravenosa de angiotensina I (0,1, 1 e 3 nmol/kg), com o pré-tratamento intravenoso (5 minutos) com veículo, artemetina (0,75 mg/kg) ou captopril (10 nmol/kg). **(B)** Duração do tempo de efeito (segundos) da resposta hipertensiva induzida pela angiotensina I (0,1, 1 e 3 nmol/kg), com o pré-tratamento com artemetina (0,75 mg/kg) ou captopril (10 nmol/kg). Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.6. Efeito da artemetina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e vascular

Foram encontradas alterações significativas nas amostras coletadas de animais pré-tratados tanto com artemetina (1,5 mg/kg, v.o.) como com captopril (20 mg/kg, v.o.), comparados com as amostras coletadas de ratos do grupo controle ($161,9 \pm 7,8$ his-leu nmol/min⁻¹/ml⁻¹), evidenciando a redução na atividade da ECA plasmática ($101,8 \pm 12$ his-leu nmol/min⁻¹/ml⁻¹ e 96 ± 16 his-leu nmol/min⁻¹/ml⁻¹), respectivamente para os grupos artemetina e captopril (Figura 10A). Da

mesma forma, foi possível observar grande redução na atividade da ECA vascular nas preparações de aorta submetidas à vasoconstrição induzida pela angiotensina I (1 nM – 10 μ M), onde os grupos tratados com artemetina (1,5 mg/kg) e captopril (20 mg/kg) apresentaram variações de 63 a 89 % na redução da resposta contrátil quando comparado com o grupo controle (Figura 10B).



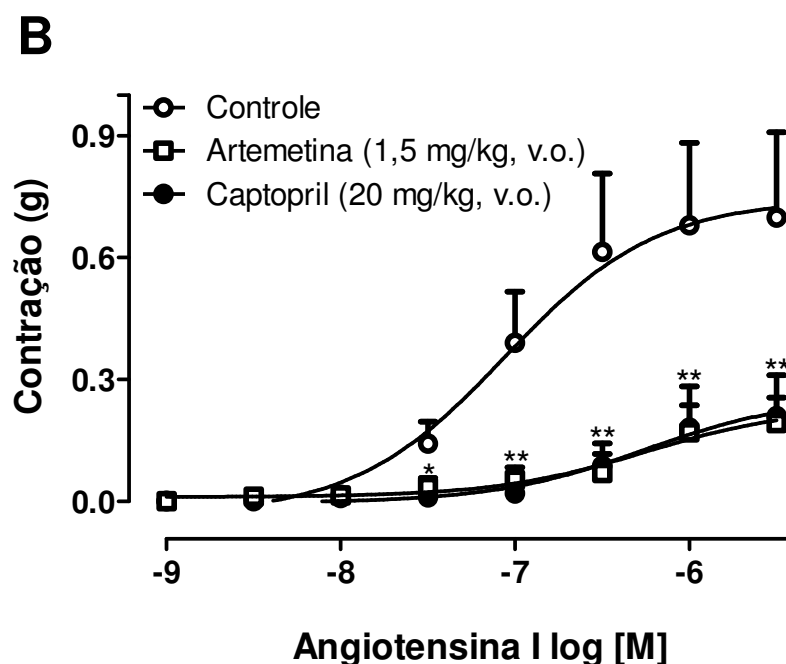


Figura 10. Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e vascular em ratos tratados com artemetina. Os animais receberam tratamento via oral 3 horas antes, com artemetina (1,5 mg/kg), captopril (20 mg/kg) ou veículo (controle). **(A)** A atividade da ECA plasmática foi mensurada pelo método fluorométrico usando Hip-his-leu como substrato. **(B)** Atividade da ECA vascular em preparações de aorta coletadas dos mesmos animais, submetidas à vasoconstrição induzida por angiotensina I (1 nM – 10 μ M). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.7. Efeito da artemetina na resposta vascular a bradicinina

Baseado nos resultados obtidos acima, a artemetina parece exibir um efeito inibitório sobre a atividade da ECA, foi investigado se esta inibição estaria aumentando o efeito da bradicinina, já que desta forma, ela poderia ser menos degradada. Tanto a pré-administração intravenosa de artemetina (0,75 mg/kg) como a de captopril (10 nmol/kg), não foram capazes de aumentar significativamente a ação hipotensora da bradicinina, em ratos normotensos anestesiados, comparados com o controle (Figura 11A). Porém, a duração do tempo do efeito hipotensor da bradicinina foi bastante aumentada para ambas as

drogas, em 118 ± 29 e em 146 ± 35 %, respectivamente para artemetina e captopril (Figura 11B).

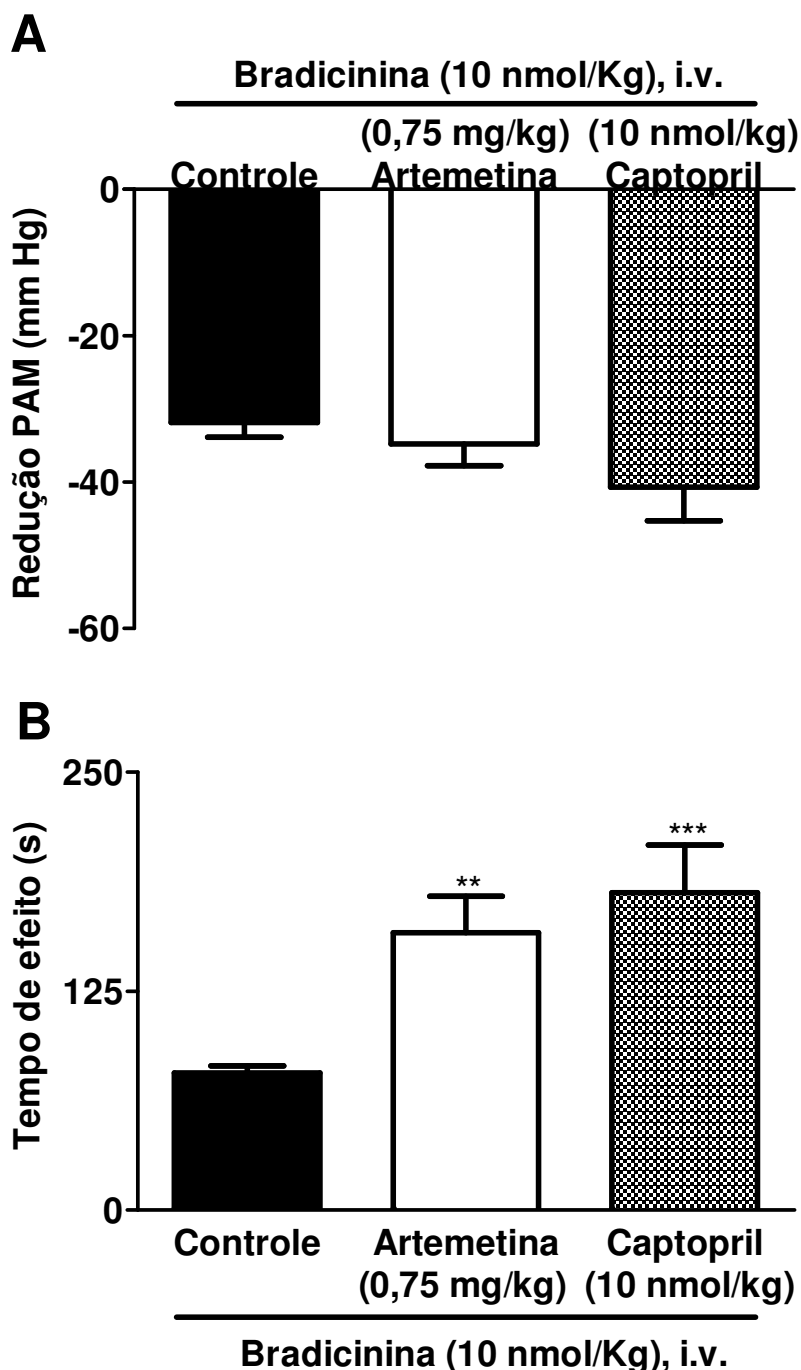


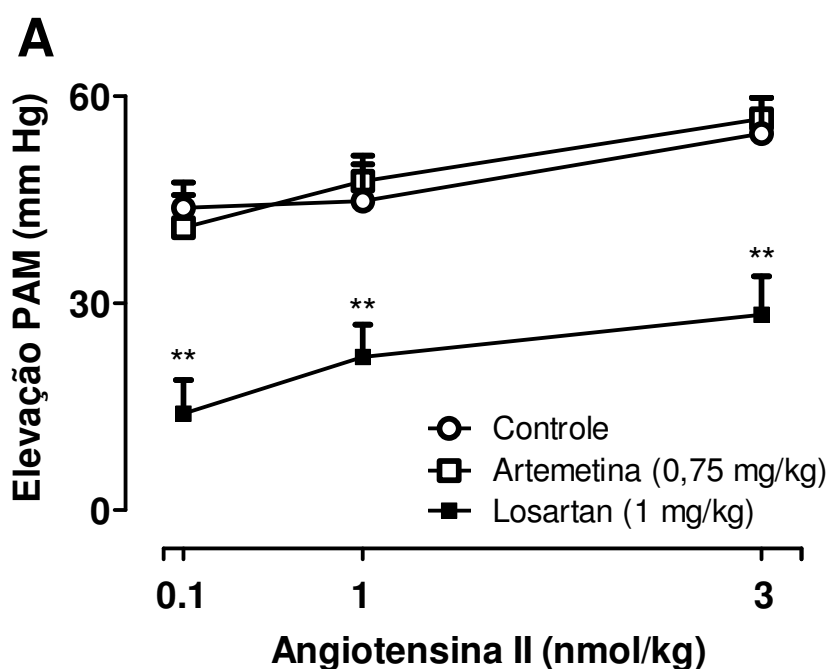
Figura 11. Efeito da artemetina na resposta vascular a bradicinina. (A) PAM (mm Hg) após administração intravenosa de bradicinina (10 nmol/kg) com o pré-tratamento (5 minutos antes) com veículo, artemetina (0,75 mg/kg) e captopril (10 nmol/kg), em ratos normotensos anestesiados. **(B)** Duração do tempo de efeito (segundos) da resposta hipotensora induzida pela bradicinina (10 nmol/kg), com o pré-tratamento com veículo, artemetina (0,75 mg/kg) ou captopril (10 nmol/kg). Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A

diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.8. Efeito da artemetina na resposta vascular a angiotensina II

Para verificar se o efeito hipotensor da artemetina não envolveria o bloqueio de receptores AT_1 impedindo assim a ação da angiotensina II, prosseguimos com a avaliação do envolvimento do sistema renina-angiotensina.

A administração intravenosa, de uma única dose de artemetina (0,75 mg/kg), 5 minutos antes, em ratos normotensos anestesiados, não resultou em redução da resposta hipertensiva induzida pela Ang II (0,1, 1 e 3 nmol/kg) e também não alterou o tempo do efeito hipertensivo da Ang II, comparado com o controle, sugerindo que não há envolvimento no bloqueio dos receptores de Ang II para o efeito hipotensor da artemetina. Já o controle positivo, droga de referência clínica utilizada, losartan (1 mg/kg), reduziu o efeito da Ang II em 68 ± 11 , 55 ± 9 e 51 ± 10 %, respectivamente nas doses de 0,1, 1 e 3 nmol/kg. Losartan também foi capaz de reduzir a duração do tempo de efeito hipertensivo da Ang II em 43 ± 5 , 55 ± 1 e 43 ± 2 %, comparado com o controle (Figura 12A e 12B).



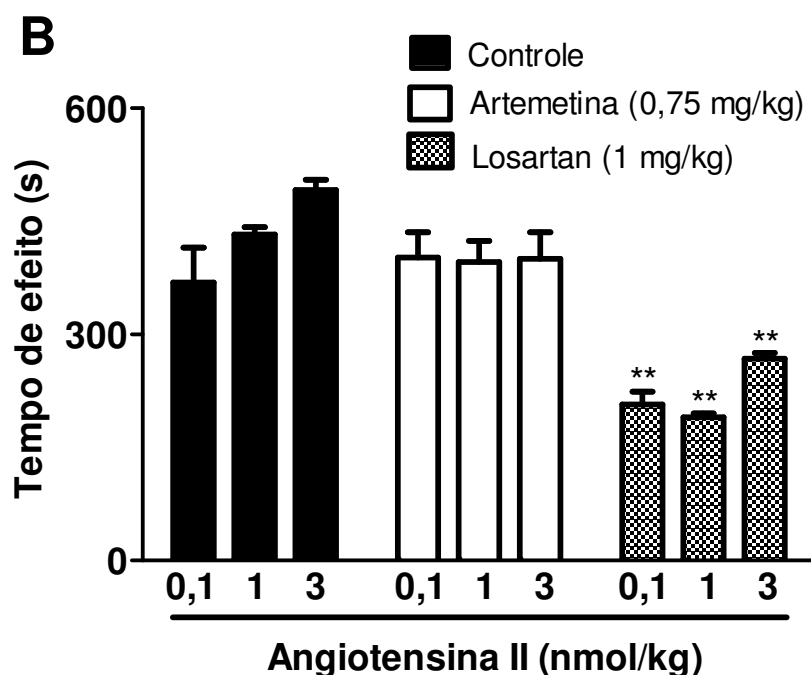


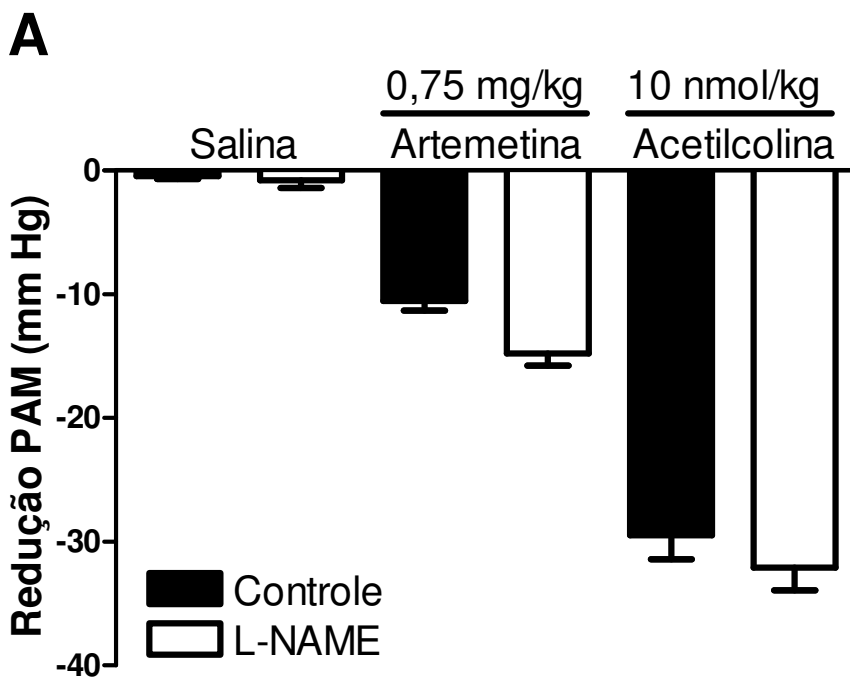
Figura 12. Ausência de envolvimento dos receptores de angiotensina II no efeito hipotensor da artemetina em ratos normotensos anestesiados. (A) Elevação da PAM (mm Hg) após administração intravenosa de angiotensina II (0,1, 1 e 3 nmol/kg) com o pré-tratamento com veículo, artemetina (0,75 mg/kg) ou losartan (1 mg/kg). **(B)** Duração do tempo de efeito (segundos) da resposta hipertensiva induzida pela angiotensina II (0,1, 1 e 3 nmol/kg), com o pré-tratamento com veículo, artemetina (0,75 mg/kg) ou losartan (1 mg/kg). Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde $**p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4.9. Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito hipotensor da artemetina

Os animais tratados continuamente com L-NAME (7 mg/kg/min) tiveram um aumento sustentado da PAM em cerca de 60 mm Hg, ou seja, um estado agudo de hipertensão, pois o L-NAME tem a propriedade de inibir a enzima NOS, impedindo assim a formação de óxido nítrico (Figura 13B).

No grupo controle, não infundidos com L-NAME, a administração intravenosa de artemetina, na dose de 0,75 mg/kg, reduziu a PAM em $10,6 \pm 0,7$

mm Hg. E no grupo infundido com L-NAME, inibidor da NOS, a artemetina (0,75 mg/kg, i.v.) continuou promovendo efeito hipotensor, de $14,80 \pm 0,99$ mm Hg, o que nos sugere que o efeito hipotensor da artemetina seja independente da liberação de óxido nítrico. O controle positivo utilizado, acetilcolina, conhecida por produzir efeitos hipotensores independentes da liberação de NO, promoveu efeitos semelhantes, onde nos animais controles promoveu uma redução da PAM em $29,5 \pm 1,93$ mm Hg e nos animais infundidos com L-NAME promoveu uma redução da PAM em $32,1 \pm 1,8$ mm Hg (Figura 13A).



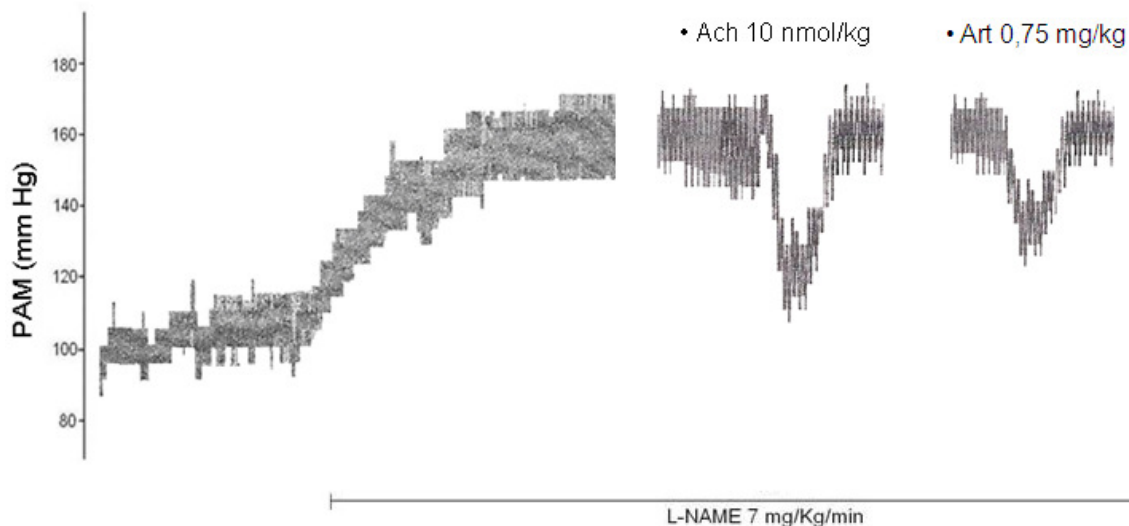
B

Figura 13. Efeito hipotensor da artemetina na presença do L-NAME. (A) – Resposta da administração intravenosa de artemetina (0,75 mg/kg) e de acetilcolina (10 nmol/kg) na ausência e presença de L-NAME. **(B)** – Registro da elevação da PAM na presença do L-NAME e resposta da acetilcolina (10 nmol/kg) e artemetina (0,75 mg/kg). Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni.

4.10. Efeito da artemetina nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx)

Os níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito, que por meio de regressão linear, os valores foram expressos como μ M de NOx (nitrato e nitrito). Porém, tanto o tratamento com artemetina (1,5 mg/kg) como com captopril (20 mg/kg) não foram capazes de alterar estes níveis de NO significativamente quando comparados com o grupo controle (Figura 14).

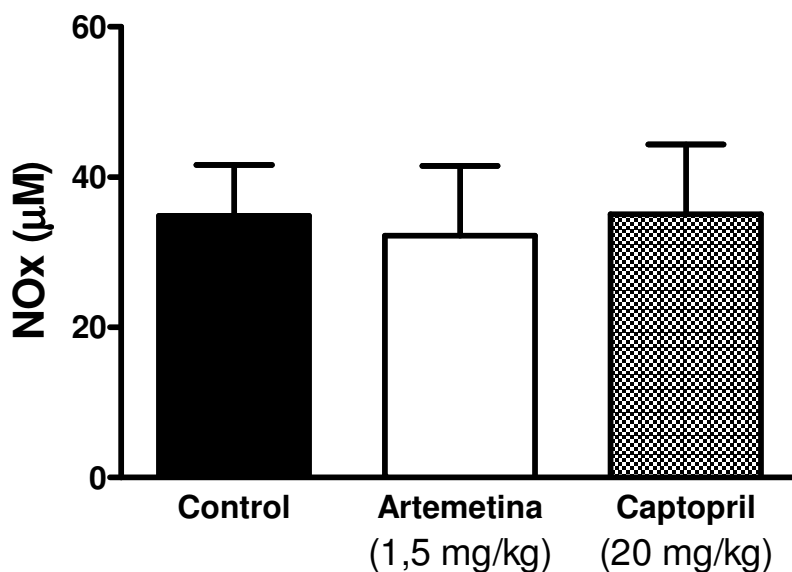


Figura 14. Efeito da artemetina nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx). Os animais foram tratados 3 horas antes da coleta de sangue com veículo, artemetina (1,5 mg/kg) ou captopril (20 mg/kg), por via oral. Os animais controle receberam somente veículo. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni.

4.11. Avaliação da atividade diurética do HEAM e sub-fração DCM-2 em ratos

Os diferentes parâmetros analisados para o HEAM e sub-fração DCM-2 em testes animais, bem como as concentrações de eletrólitos (Na^+ e K^+), estão inclusos nas tabelas 1–2.

A tabela 1 mostra o volume urinário (ml / 100 g / 8 h) e o conteúdo de eletrólitos (mmol/L / 8 h) nas amostras de urina dos animais tratados com HEAM, DCM-2, HCTZ e grupo controle (veículo), e a tabela 2 mostra outros parâmetros relacionados com a excreção de eletrólitos como a condutividade, pH e densidade.

O diurético de referência HCTZ induziu um aumento na excreção de urina em $72 \pm 6 \%$, e entre $51 \pm 7 \%$ e $49 \pm 7 \%$ para a excreção de Na^+ e K^+ ,

respectivamente, quando comparados com o grupo controle não-tratado (Tabela 1).

A tabela 1 também mostra que HEAM promoveu um aumento importante na excreção urinária na maior dose administrada em $37 \pm 4 \%$, comparado com o grupo não-tratado. A excreção de eletrólitos induzida pelo HEAM mostrou um aumento dose-dependente quando comparado com o controle, em $33 \pm 7 \%$ para a excreção de Na^+ e $47 \pm 4 \%$ para a excreção de K^+ .

A tabela 1 ainda mostra que a sub-fração DCM-2 também promoveu grande aumento na excreção urinária na dose de 30 mg/kg em $90 \pm 6 \%$, comparado com o grupo não tratado. Houve também grande aumento na excreção de eletrólitos com a administração da sub-fração DCM-2, em $45 \pm 3 \%$ para a excreção de Na^+ e $36 \pm 7 \%$ para a excreção de K^+ , quando comparados com o controle.

Por outro lado, somente a HCTZ foi capaz de aumentar significativamente a condutividade das amostras analisadas, quando comparado com as amostras controle (Tabela 2). Não houve alteração no pH e na densidade para nenhum dos grupos analisados.

Tabela 1 - Efeito da administração oral de HEAM e DCM-2 no volume urinário e excreção de eletrólitos.

| Grupo | <i>n</i> | Volume urina (mL/100 g/ 8h) | Índice diurético ^a | Na ⁺ (mmol/L) | K ⁺ (mmol/L) | Índice salurético ^b | | Na/K |
|------------------|----------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------|------|
| | | | | | | Na ⁺ | K ⁺ | |
| Controle | 5 | 2.85 ± 0.18 | - | 100.00 ± 3.85 | 33.03 ± 2.43 | - | - | |
| HCTZ (10 mg/kg) | 5 | 4.90 ± 0.40 *** | 1.71 | 151.00 ± 7.00*** | 49.23 ± 2.35** | 1.51 | 1.49 | |
| HEAM (30 mg/kg) | 5 | 3.16 ± 0.53 | 1.10 | 100.30 ± 11.20 | 41.38 ± 6.86 | 1.00 | 1.25 | |
| HEAM (100 mg/kg) | 5 | 3.45 ± 0.35 | 1.21 | 120.80 ± 8.32* | 45.38 ± 5.61 | 1.20 | 1.37 | |
| HEAM (300 mg/kg) | 5 | 3.90 ± 0.38 * | 1.36 | 133.00 ± 6.88*** | 48.63 ± 4.51* | 1.33 | 1.47 | |
| DCM-2 (10 mg/kg) | 5 | 3.7 ± 0.59 | 1.30 | 124.2 ± 9.26* | 37.00 ± 6.07 | 1.24 | 1.12 | |
| DCM-2 (30 mg/kg) | 5 | 5.69 ± 0.74 *** | 1.99 | 144.6 ± 9.05*** | 45.00 ± 3.66* | 1.44 | 1.36 | |

Resultados expressos como a média dos valores ± erro; *n* = número de animais em cada grupo. * P< 0.05, ** P< 0.01 e *** P< 0.001 em comparação com o grupo controle (veículo) - ANOVA - *t* de bonferroni.

^aÍndice diurético = volume grupo problema/volume grupo controle.

^bÍndice salurético = mmol/L grupo problema/mmol/L grupo controle.

Tabela 2 – Efeito da administração oral de HEAM e DCM-2 na condutividade, pH e densidade.

| Grupo | <i>n</i> | Condutividade (mS/cm) | pH | Densidade (g/mL) |
|------------------|----------|-----------------------|-------------|------------------|
| Controle | 5 | 15.60 ± 0.22 | 5.86 ± 0.08 | 0.99 ± 0.01 |
| HCTZ (10 mg/kg) | 5 | 17.00 ± 0.41** | 6.00 ± 0.10 | 0.98 ± 0.01 |
| HEAM (30 mg/kg) | 5 | 14.92 ± 1.34 | 5.50 ± 0.10 | 0.95 ± 0.04 |
| HEAM (100 mg/kg) | 5 | 16.78 ± 0.45 | 5.86 ± 0.07 | 0.91 ± 0.01 |
| HEAM (300 mg/kg) | 5 | 16.56 ± 0.53 | 5.63 ± 0.16 | 0.89 ± 0.03 |
| DCM-2 (10 mg/kg) | 5 | 16.19 ± 0.15 | 5.79 ± 0.17 | 1.012 ± 0.001 |
| DCM-2 (30 mg/kg) | 5 | 16.05 ± 0.17 | 6.04 ± 0.08 | 1.009 ± 0.001 |

Resultados expressos como a média dos valores ± erro; *n* = número de animais em cada grupo. ** *P* < 0.01 em comparação com o grupo controle (veículo) - ANOVA - *t* de bonferroni.

V. DISCUSSÃO

Apesar de existir uma vasta gama de excelentes agentes anti-hipertensivos disponíveis para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS) nos dias atuais, problemas cardiovasculares relacionados a esta patologia continuam a afetar milhões de pessoas em todo o mundo. Além disso, algumas drogas apresentam custo elevado, e assim não disponível para os segmentos mais pobres da sociedade (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Deste modo, a descoberta de novas substâncias com atividade anti-hipertensiva, com baixo custo, poucos efeitos adversos é ainda um aspecto desejável e de importância para a utilização clínica. Entretanto, várias dificuldades são encontradas para este fim como a escolha de modelos experimentais, obtenção de extratos padronizados e a dificuldade de obtenção, isolamento e identificação das substâncias ativas.

Um grande número de plantas usadas tradicionalmente na medicina popular exhibe propriedades farmacológicas com potencial de aplicação terapêutica. *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) é uma erva perene que tem sido extensivamente usada em diversos países (CHANDLER *et al.*, 1982; WICHTL, 1989), e inclusive no Brasil para tratar doenças cardiovasculares e renais (ALJANCIC *et al.*, 1999; BENEDEK e KOPP, 2007; FONT QUER, 1988; HAGGAG *et al.*, 1975; MIRALDI *et al.*, 2001; NEMETH e BERNATH, 2008; NEWALL *et al.*, 1996). Diversos usos tradicionais foram comprovados cientificamente, incluindo efeito anti-inflamatório, analgésico, anti-úlceras, antioxidante, colerético e hepatoprotetor (CAVALCANTI *et al.*, 2006; DELLA LOGGIA *et al.*, 1992; GADGOLI e MISHRA, 1995; NEMETH e BERNATH, 2008; PIRES *et al.*, 2009; YAEESH *et al.*, 2006). Contudo, apesar desta planta ser amplamente utilizada

como anti-hipertensiva e diurética, nenhum estudo científico foi publicado até o momento confirmando estes efeitos.

Resultados do presente estudo demonstram que o HEAM e as frações (DCM e DCM-2) obtidas de *A. millefolium* exibem efeitos hipotensores e diuréticos quando administrados por via oral. Além disso, estes efeitos parecem estar associados com a presença do flavonóide artemetina encontrada nesta planta. Nosso estudo também evidencia que as ações hipotensoras e diuréticas dos extratos e da artemetina são, pelo menos em parte, mediadas através da redução da formação de angiotensina II (Ang II) pela inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Estes resultados são relevantes tendo em vista a grande utilização dessa planta pela população. Além disso, o Ministério da Saúde (MS) incluiu a *A. millefolium* na lista de plantas que poderão virar fitoterápicos (Fev/2009), reforçando ainda mais a necessidade de estudos científicos que comprovem seu uso pela população, acerca de sua eficácia e segurança (MS, 2009).

Estudos fitoquímicos realizados paralelamente com este trabalho sugerem que devido às características químicas do HEAM, muitas classes de compostos, substâncias altamente apolares e impurezas, seja necessário um tempo maior para que seja devidamente absorvido e produza seus efeitos. Dentre as frações, somente a DCM reproduziu os efeitos observados com o HEAM, que de acordo com a análise química (RMN), poderiam ser uma série de metabólitos secundários como, por exemplo, lignanas, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos. A purificação da fração DCM, originou a sub-fração DCM-2, que continuou a apresentar efeitos hipotensores com doses menores que a fração anterior. A análise química da sub-fração DCM-2 revelou deslocamentos

característicos de compostos fenólicos (flavonóides), especialmente aqueles ricos em radicais metoxilados. Continuando, a purificação da sub-fração DCM-2 resultou no isolamento do flavonóide artemetina, que promoveu redução na PAM com doses consideravelmente menores do que a fração anterior.

Os resultados deste trabalho mostram também que a administração intravenosa de artemetina foi capaz de promover redução na PAM de ratos normotensos anestesiados nas maiores doses administradas. Observou-se que o tempo necessário para o retorno da PAM aos valores basais após a administração intravenosa de artemetina foi relativamente curto (dados não mostrados), demonstrando que este efeito hipotensor é reversível, dado este importante farmacologicamente, pois sugere que o composto não inativa o alvo farmacológico de ação. Além disso, este dado sugere também que a artemetina produz seus efeitos hipotensores com ausência de lesão tissular.

Artemetina também já foi identificada em outras plantas, como *Artemisia arborescens* (ABU ZARGA *et al.*, 1995), *Cordia curassavica* DC (BAYEUX, 2002), e algumas espécies de *Vitex*, *V. trifolia* L. (LI *et al.*, 2005), *V. agnus-castus* (CHOUDHARY, 2009) e *V. rotundifolia* (KO, 2000). Estudos científicos demonstraram algumas atividades da artemetina como antioxidante (DUGAS *et al.*, 2000), inibidora do ciclo celular (LI *et al.*, 2005), atividade anti-inflamatória (SERTIE *et al.*, 1990), e ação inibidora da lipoxigenase (CHOUDHARY *et al.*, 2009). Contudo, nenhum estudo científico sugere efeito hipotensor para este flavonóide até o momento, e nem mesmo para estas espécies de planta em que a artemetina já foi identificada.

Preparações obtidas de *A. millefolium* são continuamente auto-administradas como fitoterápico. Contudo, nem *A. millefolium* ou artemetina foram

cronicamente administradas em nossos experimentos. Entretanto, para nosso interesse, um estudo realizado por SERTIE e cols (1990) demonstrou uma toxicidade extremamente baixa deste flavonóide em ratos, quando administrado sub-cronicamente por via oral.

Apesar da existência de inúmeros alvos relevantes para o estudo do possível mecanismo hipotensor da artemetina, nossos estudos foram direcionados inicialmente para investigação do possível envolvimento na modulação (inibição) do sistema renina-angiotensina aldosterona, fato este devido a vários compostos polifenólicos descritos na literatura apresentarem esta atividade. Além disso, a hiperatividade deste sistema observada na hipertensão arterial representa um importante alvo da terapia farmacológica baseada no emprego de inibidores da ECA e antagonistas de receptores AT1 da Ang II. Onde tais agentes farmacológicos são hoje uma das principais opções terapêuticas no tratamento da HAS tendo um grande impacto na morbidade e mortalidade associada à hipertensão (MULLINS *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são descritos por apresentarem diversas atividades no sistema cardiovascular. Os flavonóides e alimentos ricos em compostos polifenólicos parecem exibir atividade cardioprotetora e vasodilatadora (AJAY *et al.*, 2003; AJAY *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 1999), ações antioxidantes (ENGLER e ENGLER, 2004; HEIM *et al.*, 2002; MODAK *et al.*, 2005; PRASAD *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010) e efeitos antihipertensivos (CHO *et al.*, 2007; MAGOS *et al.*, 2008). Existem diversos estudos sugerindo os mecanismos responsáveis por estes efeitos, como melhora na biodisponibilidade do óxido nítrico endotelial e modulação da sensibilidade das células do músculo liso vascular ao óxido nítrico, porém muitas das ações ainda não foram

devidamente elucidadas. Além disso, os flavonóides são alvos de diversos estudos devido suas ações inibidoras da ECA (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003; KAMEDA *et al.*, 1987; LACAILLE *et al.*, 2001; LUCAS-FILHO *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2004; OTTAVIANI *et al.*, 2006; WAGNER, 1993); porém, parte destes estudos, mostram uma inibição da ECA *in vitro*, e a relação entre o efeito hipotensor *in vivo* permanece não esclarecido.

Nosso estudo mostra que a artemetina reduziu a resposta hipertensiva induzida pela Ang I provavelmente como resultado da inibição da atividade da ECA. Avaliamos ainda o efeito da artemetina sobre a atividade da ECA plasmática e vascular, onde ambas encontraram-se reduzidas em animais tratados com este flavonóide por via oral.

Como descrito acima, nosso estudo está de acordo com a literatura científica, onde diversos flavonóides são descritos como inibidores da atividade da ECA. E apesar da grande quantidade de estudos investigando este mecanismo para os flavonóides, nenhum estudo foi feito até o momento para mostrar esta atividade para a artemetina. A ECA encontrada principalmente em células endoteliais do pulmão, endotélio vascular, e em membranas celulares dos rins, coração e cérebro (BREWSTER e PERAZELLA, 2004) é crucial na regulação do sistema renina-angiotensina (SRA) e desempenha um papel importante na regulação da função cardiovascular e pressão arterial (PERSSON *et al.*, 2009). Ensaios clínicos com inibidores da ECA e bloqueadores de receptor de Ang II (BRAs) sugerem que diversos dos efeitos destas drogas são mediados por inibir os efeitos da Ang II (GIBBONS, 1998; SCRIBNER *et al.*, 2003; ASMAR *et al.*, 1988), que podem indiretamente prevenir doença isquêmica cardíaca, doença

aterosclerótica, nefropatia diabética e hipertrofia ventricular esquerda (BREWSTER e PERAZELLA, 2004).

Por outro lado, acredita-se que parte dos efeitos benéficos dos inibidores da ECA sobre o sistema cardiovascular advém da inibição do metabolismo da bradicinina (CORVOL *et al.*, 1995; LINZ *et al.*, 1992). Algumas dessas ações têm sido atribuídas principalmente devido à bradicinina estimular a geração de substâncias vasodilatadoras como o NO e a PGI₂ (IMIG, 2004), além de substâncias como os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) (MIURA *et al.*, 1999; NAKASHIMA *et al.*, 1993). Neste íterim, nossos resultados evidenciaram que a artemetina realçou o tempo de resposta hipotensiva da bradicinina, e assim podemos sugerir que a inibição da ECA por este flavonóide seja a responsável pela menor degradação da bradicinina fazendo com que sua meia-vida seja sustentada por mais tempo.

Tendo em vista a ativação dos receptores AT₁ para que ocorram os efeitos constritores da Ang II, fomos investigamos se o efeito hipotensor da artemetina não envolveria o bloqueio destes receptores. Mais ao contrário do que foi observado com o losartan, a artemetina não foi capaz de reduzir os aumentos pressóricos induzidos pela administração de Ang II, sugerindo que o mecanismo de ação hipotensor da artemetina não envolva o antagonismo destes receptores.

Considerando o benefício do aumento na biodisponibilidade do NO com drogas inibidoras da ECA, seja pela redução de NADPH (principal fonte vascular de ânion superóxido) e de xantina oxidase, ou pelos próprios efeitos da bradicinina sobre os receptores B₂ endoteliais (aumento intracelular de Ca²⁺ estimulando a NOS) (FERNANDES *et al.*, 2005) fomos investigar se parte dos efeitos hipotensores da artemetina não envolveria a liberação endotelial de NO.

Porém, a demonstração da produção de NO é ainda difícil, sendo sempre feita de maneira indireta. Um dos métodos utilizados para demonstrar o NO é a substituição do substrato por um análogo (L-NAME) sendo a ausência do efeito pesquisado imputado pela não formação de NO devido ao bloqueio da reação da L-arginina à L-citrulina, desencadeando um quadro agudo de hipertensão; e o resultado obtido sugere que o efeito hipotensor da artemetina é independente da síntese de NO, já que mesmo com a NOS inibida continuou a promover redução na PAM. Além disso, realizamos também a dosagem de nitrato + nitrito (NOx) em amostras de sangue coletadas de animais tratados com artemetina via oral, com o intuito de confirmar a observação anterior. Sendo assim, o tratamento com artemetina não resultou em aumento dos níveis de NOx, reforçando nossa hipótese de que o mecanismo hipotensor deste flavonóide não envolva a modulação da produção de NO. Apesar dos relatos na literatura mostrarem uma relação na produção de NO com a inibição da ECA e o mecanismo hipotensor de flavonóides (PERSSON *et al.*, 2006), não foi observada tal relação em nosso estudo.

Entretanto, para verificar se o efeito hipotensor da artemetina não envolveria a liberação endotelial de outras substâncias vasodilatadoras, outros testes deveriam ser realizados, como o envolvimento da PGI₂ e EDHFs, ou ainda, verificar o envolvimento de mediadores endoteliais vasoconstritores como TXA₂ e endotelina; porém para este estudo, a quantidade de composto isolada limitou nossa gama de experimentos.

Apesar de contarmos clinicamente com um grande número de drogas diuréticas, a grande maioria pode induzir vários efeitos adversos. Este fato estimula a investigação de novas moléculas com propriedades diuréticas (ERNST

e MOSER, 2009). Dentro deste contexto, muitas plantas medicinais são utilizadas na medicina popular brasileira com o intuito de melhorar algum distúrbio renal ou mesmo por apresentarem apenas efeito diurético, como por exemplo, *A. millefolium*.

Considerando que drogas inibidoras da ECA como o ramipril, exercem parte de seus efeitos hipotensores devido sua atividade natriurética, e ainda dependente da inibição do metabolismo da bradicinina com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo renal (SAKAMOTO *et al.*, 1994); e devido a artemetina apresentar efeito inibidor significativo da ECA e modulador do metabolismo da bradicinina, consideramos a possibilidade de uma contribuição renal no efeito hipotensor observado. Nossos achados demonstraram que tanto HEAM como a sub-fração DCM-2, nas maiores doses testadas, causaram expressivo aumento na diurese. Além disso, pela análise da excreção de Na⁺ e de K⁺ observou-se que ambos os tratamentos aumentaram significativamente a fração de excreção de ambos os íons.

Diversos fatores endógenos podem ser os responsáveis por um aumento na excreção de eletrólitos. A filtração glomerular é um dos principais mecanismos que regulam a excreção renal de Na⁺ e K⁺ (EATON e POOLER, 2006). Outro fator determinante na excreção renal de Na⁺ é a secreção de aldosterona, hormônio que aumenta a reabsorção de Na⁺ nos segmentos distais do néfron (VERBALIS, 2003; BLOT-CHABAUD *et al.*, 1990). Uma redução na síntese e/ou liberação de aldosterona poderia ser a responsável pelo aumento na fração de excreção de Na⁺ observado em nosso estudo, já que de acordo com nossos resultados, o composto isolado da sub-fração DCM-2, artemetina, parece inibir a ECA, proporcionando assim menor formação de Ang II e conseqüentemente menor

liberação de aldosterona. Neste sentido, realizamos também o ensaio de atividade da ECA plasmática em amostras de sangue coletadas de animais tratados com HEAM e DCM-2, onde ambos os tratamentos evidenciaram uma redução na atividade desta enzima (resultados não mostrados), permitindo assim sugerir que parte dos efeitos diuréticos observados em nosso estudo possa advir da inibição da ECA e seu conseqüente efeito no metabolismo da bradicinina.

Estudos prévios demonstram que diversos compostos polifenólicos obtidos de produtos naturais podem apresentar atividade diurética (JADHAV *et al.*, 2010), principalmente os flavonóides (MAGHRANI, 2005), que dentre os mecanismos de ação propostos, destacam-se a inibição da ECA, mecanismos osmóticos, aumento do fluxo sanguíneo renal e liberação de prostaglandinas vasodilatadoras (GASPAROTTO *et al.*, 2009). A importância do efeito diurético não se deve somente ao fato destes agentes reduzirem a pressão arterial, mais também por realçarem a eficácia de outros agentes (ERNST e MOSER, 2009).

O uso de modelos experimentais de hipertensão arterial sistêmica (HAS) tem contribuído em muito para o entendimento dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial e também no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o controle dos níveis tensionais elevados (FAZAN Jr *et al.*, 2001). Em nosso estudo, avaliamos os efeitos de *A. millefolium* somente em ratos normotensos, devido à dificuldade na obtenção de animais da linhagem SHR (*spontaneously hypertensive rats*) ou na padronização de outros modelos, sendo este uma das principais limitações do nosso trabalho. Porém não descartamos a possibilidade de continuar este estudo e avaliar os efeitos desta planta em modelos de hipertensão animal como os SHR ou em outros modelos de disponíveis para estudo.

Em resumo, os resultados do presente estudo, evidenciam que HEAM e sub-fração DCM-2 apresentam efeito hipotensor e diurético em ratos. Em relação aos efeitos hipotensores, este pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença de artemetina no HEAM, DCM e DCM-2, cujo mecanismo hipotensor parece envolver a inibição da enzima conversora de angiotensina. Nossos dados demonstram que o flavonóide artemetina administrado *in vivo* reduziu de maneira expressiva as respostas de pressão arterial hipertensiva induzida pela angiotensina I e realçou o tempo do efeito hipotensor da bradicinina. Observamos também uma redução na atividade da ECA plasmática em animais tratados com artemetina, bem como uma diminuição expressiva na responsividade a angiotensina I *in vitro*, relacionado a uma redução na atividade da ECA vascular. Ainda, no caso da artemetina o principal alvo de ação parece ser a inibição da ECA e não a produção de NO e nem o bloqueio de receptores da angiotensina II. Além disso, o HEAM e DCM-2 demonstraram efeitos diuréticos importantes, e o mecanismo de ação pode também estar relacionado com a modulação da ECA e conseqüente redução dos níveis de aldosterona.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

- O extrato hidro-etanólico de *A. millefolium* (HEAM) apresenta um ou mais componentes capazes de promover redução da pressão arterial média, além de promover efeito diurético;
- As frações (DCM e DCM-2) obtidas a partir do extrato de *A. millefolium* também apresentam componentes capazes de promover redução da pressão arterial média, sendo que a sub-fração DCM-2 também apresentou potente efeito diurético;
- A artemetina parece ser um dos compostos capaz de promover redução da pressão arterial média;
- A resposta hipotensora induzida pela artemetina parece estar envolvida com a inibição da enzima conversora de angiotensina (plasmática e vascular), bem como no aumento do tempo do efeito hipotensor da bradicinina;
- A resposta hipotensora da artemetina parece não depender do bloqueio de receptores da angiotensina II;
- A resposta hipotensora induzida pela artemetina parece não depender da síntese de óxido nítrico.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU ZARGA, M., QAUASMEH, R., SABRI, S., MUNSOOR, M., ABDALLA, S., 1995. Chemical constituents of *Artemisia arborescens* and the effect of the aqueous extract on rat isolated smooth muscle. *Planta Med* 61(3):242-245.

ACTIS-GORETTA, L., OTTAVIANI, J.I., KEEN, C.L., FRAGA, C.G., 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett* 555(3):597-600.

AJAY, M., ACHIKE, F.I., MUSTAFA, M.R. 2007., Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacol Res* 55(5):385-391.

AJAY, M., GILANI, A.U., MUSTAFA, M.R., 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 74(5):603-612.

ALJANCIC, I., VAJS, V., MENKOVIC, N., KARADZIC, I., JURANIC, N., MILOSAVLJEVIC, S., MACURA, S., 1999. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial activity. *J Nat Prod* 62(6):909-911.

ALONSO, J. R. Tratado de fitomedicina. Buenos Aires: Isis, 1998. p. 725-729.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 21/03/2010.

ASGARY S, NADERI GH, SARRAFZADEGAN N, MOHAMMADIFARD N, MOSTAFAVI S, VAKILI R. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs Exp Clin Res*. 2000;26(3):89-93.

ASMAR, R.G., PANNIER, B., SANTONI, J.P., LAURENT, S., LONDON, G.M., LEVY, B.I., SAFAR, M.E. 1988. Reversion of cardiac hypertrophy and reduced

arterial compliance after converting enzyme inhibition in essential hypertension. *Circulation* 78(4):941-950.

BANKIR, L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*, v.51, p.372-390, 2001.

BARBERÁ, O., MARCO, J.A., SAN, J.F., SANCHEZ-PARAREDA, J., 1986. 3-methoxyflavones and coumarins from *Artemisia incanescens*. *Phytochemistry* 25:2357-2360.

BASSENGE, E.; BUSSE, R.; POHL, U. Abluminal release and asymmetrical response of the rabbit arterial wall to endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res*, 61(5 Pt 2): II68-73, 1987.

BAYEUX, M.C., FERNANDES, A.T., FOGGIO, M.A., CARVALHO, J.E., 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Braz J Med Biol Res* 35(10):1229-1232.

BENEDEK, B. (2007) *Achillea millefolium* L. s.l. – Analysis of Phenolic Compounds and Biological Testing. PhD thesis, University of Vienna

BENEDEK, B., KOPP, B., 2007. *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: recent findings confirm the traditional use. *Wien Med Wochenschr* 157(13-14):312-314.

BERMUDEZ, A.; OLIVEIRA-MIRANDA, M.A.; VELAZQUEZ, D. Ethnobotanical Brazil, research on medicinal plants: A review of its goals and current approaches. *Interciencia*. 2005 Aug 30; 8: 453.

BLOT-CHABAUD, M.; WANSTOK, F.; BONVALET, J.P.; FARMAN, N. Cell sodium induced recruitment of Na⁺- K⁺- ATPase pumps in rabbit cortical collecting tubules is aldosterone-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.265, p.11676-11681, 1990.

BLUMENTHAL, M. GOLDBERG, A. BRINCKMANN, J. Herbal medicine. Expanded Commission E Monographs. Newton: Integrative Medicine Communications; 2000. p. 419-23.

BONESI, M., LOIZZO, M.R., STATTI, G.A., MICHEL, S., TILLEQUIN, F., MENICHINI, F. The synthesis and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity of chalcones and their pyrazole derivative. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 1990–1993.

BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(3): C499-508, 2003.

BREWSTER, U.C., PERAZELLA, M.A. 2004. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease. *The American Journal of Medicine*; 116: 263-272.

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

CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Ed. Universitaria, 1999. p. 268-270.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005 Aug 22;100(1-2):131-4.

CAMPBELL, W. B.; GAUTHIER, K. M. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11(2): 177-183, 2002.

CAVALCANTI, A.M., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., RIECK, L., DE SOUSA, R.S., DA SILVA-SANTOS, J.E., MESIA-VELA, S., MARQUES, M.C., 2006. Safety

and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 277–284.

CHANDLER, R. F. *Herbal medicine: yarrow*. Janvier, 1989.

CHANDLER, R.F., HOOPER, S.N., HOOPER, D.L., JAMIESON, W.D., FLINN, C.G., SAFE, L.M., 1982. Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (Yarrow). *J Pharm Sci* 71(6):690-693.

CHO, T.M., PENG, N., CLARK, J.T., NOVAK, L., ROYSOMMUTI, S., PRASAIN, J., WYSS, J.M. 2007. Genistein attenuates the hypertensive effects of dietary NaCl in hypertensive male rats. *Endocrinology* 148(11):5396-5402.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L. JR.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. JR.; ROCCELLA, E.J.; 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. Dec; 1. 42: 1206–1252.

CHOUDHARY, M.I., JALIL, S., NAWAZ, S.A., KHAN, K.M., TAREEN, R.B., 2009. Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from *Vitex agnus-castus*. *Phytother Res* 23(9):1336-1339.

COGOLLUDO, A., VIZCAÍNO, F.P., TAMARGO, J., 2005. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 14: 423-7.

CORVOL, P., WILLIAMS, T.A., SOUBRIER, F., 1995. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol* 248:283-305.

CRACKOWER, M. A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, v.417, n.20, p.822-828, 2002.

CRESTANI, S., RATTMANN, Y.D., CIPRIANI, T.R., DE SOUZA, L.M., IACOMINI, M., KASSUYA, C.A.L., MARQUES, M.C.A., DA SILVA-SANTOS, J.E. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vascular Pharmacology* 51 (2009) 57–63.

CSUPOR-LOFFLER, B., HAJDU, Z., ZUPKO, I., RETHY, B., FALKAY, G., FORGO, P., HOHMANN, J., 2009. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. *Phytother Res* 23(5):672-676.

DEANFIELD, J., et al., 2005. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23(1):7-17.

DELLA LOGGIA, R. Anti-inflammatory principles from *Achillea asplenifolia* and *Achillea pratensis*. *Planta Medica*, v. 58, supp. 1, p. A641-A642, 1992.

DONG, X., LIU, T., YAN, J., WU, P., CHEN, J., HU, Y., 2009. Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg Med Chem* 17(2):716-726.

DUGAS, A.J., JR. CASTANEDA-ACOSTA, J., BONIN, G.C., PRICE, K.L., FISCHER, N.H., WINSTON, G.W., 2000. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 63(3):327-331.

DUKE, J.A., 1988. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 483–484.

DUKE, L.M., EVANS, R.G., WIDDOP, R.E., 2005. AT₂ receptors contribute to acute blood pressure-lowering and vasodilator effects of AT₁ receptor antagonism

in conscious normotensive but not hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2289-2297.

EATON, D.C.; POOLER, J.P. Fisiologia Renal de Vander. In: EATON, D.C.; POOLER, J.P. Fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular. Porto Alegre : Artmed, 6 ed. cap. 2, p.37-51, 2006.

ENGLER, M.B., et al., 2004. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23(3):197-204.

ERNST, E. M.; MOSER, M. 2009. Use of Diuretics in Patients with Hypertension. *The New England Journal of Medicine*; 361:2153-2164.

FAZAN, JR. R.; DIAS DA SILVA, V.J.; SALGADO, H.C.. Modelos de hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001, 8: 19-29.

FELIZZOLA, L. R; ROSSINI SOBRINHO, J. R; ZORN, W. G. W; BELLEN, B. V. The role of the endothelium in circulatory physiology. *Cir. vasc. angiol*;12(3):129-36, set. 1996.

FERNANDES, L.; FORTES, Z.B.; CASARINI, D.E.; NIGROA, D.; TOSTES, R.C.A.; SANTOS, R.A.S.; CARVALHO, M.A.C. Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regulatory Peptides* 127: 183– 189; 2005.

FLECK, C. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances. *Physiological Research*, v.48, p.267-279, 1999.

FONT QUER, P., 1988. Plantas Medicinales: el discórides renovado. Labor: Calábria.

FRANCO L.L. Doenças Tratadas com Plantas Medicinais. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Vozes; 2003.

FRANGOS, J. A.; ESKIN, S. G.; MCINTIRE, L. V.; IVES, C. L. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science*, 227(4693): 1477-1479, 1985.

FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, J.A.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. *Rev Bras Enferm*, Brasília 2008 mar-abr; 61(2): 201-8.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, 53(5): 557-573, 1983.

GADGOLI, C. & MISHRA, S. H. Preliminary screening of *Achillea millefolium*, *Cichorium intybus* and *Capparis spinosa* for antihepatotoxic activity. *Fitoterapia*, v. 66, n. 4, p. 319-323, 1995.

GARCIA, M.D. PUERTA, R. MARTINEZ, S. SAENZ, N.T. Analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects of *Achillea ageratum*. *Phytother Res* 1997;11(5):376-9.

GASPARO, M., CATT, K.J., INAGAMI, T., WRIGHT, J.W., UNGER, T.H. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52:415-72.

GASPAROTTO, A., BOFFO, M.A., LOURENCO, E.L., STEFANELLO, M.E., KASSUYA, C.A., MARQUES, M.C. 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *J Ethnopharmacol* 122(3):517-522.

GIBBONS, G.H., 1998. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. *Am J Hypertens* 11(11 Pt 2):177S-181S.

GLASL, S., MUCAJI, P., WERNER, I., PRESSER, A., JURENITSCH, J., 2002. Sesquiterpenes and flavonoid aglycones from a Hungarian taxon of the *Achillea millefolium* group. *Z Naturforsch C* 57(11-12):976-982.

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

GUÉDON, D., ABBE, P., LAMAISON, J.L., 1993. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. Subspecies. . *Biochem Syst Ecol* 21(607-611).

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

GUYTON, A.C., HALL, J.E. Textbook of medical physiology. 9thed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.

GUYENET, P. G. The Sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews. Neuroscience*. Vol.7, Mai, 335-346. 2006.

HAGGAG, M.Y., SHALABY, A.S., VERZAR-PETRI, G., 1975. Thin layer and gas-chromatographic studies on the essential oil from *Achillea millefolium*. *Planta Med* 27(4):361-366.

Haidara, K. ZAMIR, L. SHI, Q.W. BATIST, G. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. *Cancer Lett* 2006;242(2):180-90.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol* 2005;15(9):686-99.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10):572-584.

IMIG, J.D. ACE Inhibition and Bradykinin-Mediated Renal Vascular Responses: EDHF Involvement. *Hypertension*. 2004;43:533–535

INNOCENTI, G. VEGETO, E. DALL'ACQUA, S. CIANA, P. GIORGETTI, M. AGRADI, E. et al. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine* 2007;14(2-3):147-52.

INOUE, T.; NONOGUCHI, H.; TOMITA, K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovascular Research*, v.51, p.470-480, 2001.

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

JADHAV, R.B., BHATNAGAR, S.P., SURANA, S.J. 2010. Diuretic activity of squamate mistletoe, *Viscum angulatum*. *Pharm Biol* 48(4):417-421.

KAU. S.T., KEDDI, J.R., ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rats. *J. Pharmacol. Meth.* 1984; 11: 67–75.

KAMEDA, K., TAKAKU, T., OKUDA, H., KIMURA, Y., OKUDA, T., HATANO, T., ÁGATA, I., ARICHI, S., 1987. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J Nat Prod* 50(4):680-683.

KASTNER, U., SOSA, S., TUBARO, A., BREUER, J., RÜCKER, G., DELLA LOGGIA, R., JURENITSCH, J., 1993. Anti-edematous activity of sesquiterpene lactones from different taxa of the *Achillea millefolium* group. *Planta Medica* 59, A669.

KO, W.G., KANG, T.H., LEE, S.J., KIM, N.Y., KIM, Y.C., SOHN, D.H., LEE, B.H., 2000. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by

inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem Toxicol* 38(10):861-865.

LA MORENA, J.S.; DONAIRE, J.A.G.; URIOSTE, L.M.R. 2010. New therapeutic strategies to improve control of arterial hypertension and simplify the regimen of drug treatment. *Med Clin (Barc)*; 134 (14):625-642.

LACAILLE, D., FRANCK, U., WAGNER, H., 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* 8(1):47-52.

LEE, C. R., WATKINS, M. L., PATTERSON, J. H., GATTIS, W., O'CONNOR, C. M., GHEORGHIADU, 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.

LEEB-LUNDBERG, L.M.F., MARCEAU, F., MÜLLER-ESTERL, W., et al.: International Union of Pharmacology. XLV. Classification of Kinin Receptor Family: From Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacol Rev* 2005, 57:27-77.

LEMMENS-GRUBER, R. MARCHART, E. RAWNDUZI, P. ENGEL, N. BENEDEK, B. KOPP, B. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittelforschung* 2006;56(8):582-8.

LEMONS, V.S., FREITAS, M.R., MULLER, B., LINO, Y.D., QUEIROGA, C.E., CORTES, S.F., 1999. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur J Pharmacol* 386(1):41-46.

LEVAL, X. D.; HANSON, J.; DAVID, J-L.; MASEREEL, B.; PIROTTE, B.; DOGNE, J-M. New Developments on Thromboxane and Prostacyclin Modulators Part II: Prostacyclin Modulators. *Current Medicinal Chemistry*, v.11, n.10, p.1243-1252, 2004.

LI, W.X., CUI, C.B., CAI, B., WANG, H.Y., YAO, X.S., 2005. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. *J Asian Nat Prod Res* 7(4):615-626.

LIMA-LANDMAN, M.T., BORGES, A.C., CYSNEIROS, R.M., DE LIMA, T.C., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., 2007. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine* 14(5):314-320.

LINZ, W., WIEMER, G., SCHOLKENS, B.A., 1992. ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 24(8):909-919.

LONN, E., 2004. The clinical relevance of pharmacological blood pressure lowering mechanisms. *Can J Cardiol* 20 Suppl B:83B-88B.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. ed., SP: Nova Odessa, Instituto Plantarum. p p.129-130.

LUCAS-FILHO, M.D., SILVA, G.C., CORTES, S.F., MARES-GUIA, T.R., PERPETUA FERRAZ, V., SERRA, C.P., BRAGA, F.C., 2010. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. *Phytomedicine* 17(5):383-387.

MAGOS, G.A., MATEOS, J.C., PAEZ, E., FERNANDEZ, G., LOBATO, C., MARQUEZ, C., ENRIQUEZ, R.G., 2008. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 117(1):58-68.

MAGHRANI, M., ZEGGWAGH, N.A., HALOUI, M., EDDOUKS, M. 2005. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J Ethnopharmacol* 99(1):31-35.

MARTINS, E.R. CASTRO, D.M. CASTELLANI, D.C. DIAS, J.E.; 2000. Plantas medicinais. Viçosa: UFV, p. 150-152.

MILLER, F.M., CHOW, L.M., 1954. Alkaloids of *Achillea millefolium* L. I. Isolation and characterization of achilleine. . *Journal of American Chemical Society* 76(1353-1354).

MION JUNIOR, D.; PIERIN, A.M.S.; GUIMARÃES, A. 2001. Tratamento da hipertensão arterial. Respostas de médicos brasileiros a um inquérito. *Rev Ass Med Bras* 47: 249-254.

MIRALDI, E., FERRI, S., MOSTAGHIMI, V., 2001. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J Ethnopharmacol* 75(2-3):77-87.

MIURA, H., LIU, Y., GUTTERMAN, D.D. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization – contribution of nitric oxide and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circulation*. 1999; 99: 3132–3138.

MODAK, B., CONTRERAS, M.L., GONZALEZ-NILO, F., TORRES, R., 2005. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. *Bioorg Med Chem Lett* 15(2):309-312.

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*, 38(11): 1709-1715, 1989.

MONTENEGRO, M.F., PESSA, L.R., TANUS-SANTOS, J.E., 2009. Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. *Eur J Pharmacol* 607(1-3):173-177.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. (2000) *Medicinal Plants of Brazil*, Reference Publications Inc., Michigan, p. 60.

MS – Ministério da Saúde – Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf/> Acesso em:
24/03/2010.

MULLINS, L. J.; BAILEY, M. A.; MULLINS, J. J. 2006. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol Ver. Apr*;86(2):709-46.

NAKASHIMA, M., MOMBOULI, J.V., TAYLER, A.A., VANHOUTTE, P.M. Endothelium dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest.* 1993;92:2867–2871.

NEMETH, E., BERNATH, J., 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). *Curr Pharm Des* 14(29):3151-3167.

NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D., 1996. Herbal remedies: a guide for healthcare professionals. ed., London: Pharmaceutical Press.

OH, H., KANG, D.G., KWON, J.W., KWON, T.O., LEE, S.Y., LEE, D.B., LEE, H.S., 2004. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol Pharm Bull* 27(12):2035-2037.

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

OTTAVIANI, J.I., ACTIS-GORETTA, L., VILLORDO, J.J., FRAGA, C.G., 2006. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 88(3-4):359-365.

PANIZZA, S., 1997. *Plantas que curam: cheiro de mato.* 17 ed., São Paulo: Ibrasa. p 152-153.

PERSSON, I.A, JOSEFSSON, M., PERSSON, K., ANDERSSON, R.G. (2006). Tea flavanols inhibit angiotensin-converting enzyme activity and increase nitric

oxide production in human endothelial cells. *J Pharm Pharmacol.* Aug;58(8):1139-44.

PERSSON, I.A., PERSSON, K., ANDERSSON, R.G., 2009. Effect of *Vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 57(11):4626-4629.

PIRES, J.M., MENDES, F.R., NEGRI, G., DUARTE-ALMEIDA, J.M., CARLINI, E.A. Antinociceptive Peripheral Effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both Plants known popularly by Brand Names of Analgesic Drugs. *Phytother. Res.* 23, 212–219 (2009).

PRASAD, K.N., YANG, B., DONG, X., JIANG, G., ZHANG, H., XIE, H., JIANG, Y., 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10:627-632.

PRAXEDES, J.N., MARCONDES, M. Rim e hipertensão. *Rev Soc Cardiol ESP*, 4:47-52, 1992.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-Dependent Vasodilator-And Nitrovasodilator-Induced Relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians*, 96: 19-30, 1983.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. 1983. Agonist-induced endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 52: 352-357.

RATES, S.M.K. (2001). *Plants as sources of drugs.* *Toxicon*, Oxford 39:603-613.

SAKAMOTO, T., CHEN, C., LOKHANDWALA, M.F. 1994. Contribution by bradykinin to the natriuretic response to the angiotensin converting enzyme

inhibitor ramiprilat in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350(1):84-89.

SCRIBNER, A.W., LOSCALZO, J., NAPOLI, C., 2003. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 482(1-3):95-99.

SERTIE, J.A., BASILE, A.C., PANIZZA, S., MATIDA, A.K., ZELNIK, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Med* 56(1):36-40.

SHARMA, J.N. Hypertension and the Bradykinin System. *Current Hypertension Reports* 2009, 11:178–181.

SHARMA, J.N., AL-DHALMAWI, G.S. Bradykinin receptor antagonists: therapeutic implications. *IDrugs* 2003, 6:581–586.

SI, X.T. ZHANG, M.L. SHI, Q.W. KIYOTA, H. Chemical constituents of the plants in the genus *Achillea*. *Chem Biodivers* 2006; 3(11):1163-80.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, 34(45): 14668-14674, 1995.

TESKE, M., TRENTINI, A.M.M., 1997. *Compêndio de Fitoterapia*. ed., Curitiba: Herbarium.

THARKUR, V.; ROBERT, R.; REISIN, E. Obesity, hypertension, and the heart. *Am J Med Sci*. 2001; 321(4):242-8.

TOMSON, C.R.V., PETERSON, K., HEAGERTY, A.M. Does treated essential hypertension result in renal impairment. A cohort study. *J Hum Hypertens* 5:189-192, 1991.

TRIFUNOVIC, S. VAJS, V. JURANIC, Z. ZIZAC, Z. TESEVIC, V. MACURA, S. et al. Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. *Phytochemistry* 2006;67(9):887-93.

VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.17, p.471-503, 2003.

VIRDIS, A., GHIADONI, L., TADDEI, S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2010.

WAGNER, H., 1993. Leading structures of plant origin for drug development. *J Ethnopharmacol* 38(2-3):105-112.

WICHTL, M., BISSET, N.G., 1989. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. ed.: Medpharm Scientific Publishers. p 566.

YAEESH S, JAMAL Q, KHAN AU, GILANI AH. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. *Phytother. Res.* 2006 Jul;20(7):546-51.

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.

ZAGO, A.S., ZANESCO, A. 2006. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol* 87(6):e264-270.

ZITTERL-EGLSEER, K., JURENITSCH, J., KORHAMMER, S., HASLINGER, E., SOSA, S., DELLA LOGGIA, R., KUBELKA, W., FRANZ, C., 1991. Sesquiterpenelactones of *Achillea setacea* with antiphlogistic activity. *Planta Medica* 57, 444–446.