

**RITA DE CÁSSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE E DAS VIAS ENVOLVIDAS  
NO MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE *Gochnatia polymorpha* ssp  
(Less) Cabrera EM RATOS**

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Biologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria  
Consuelo Andrade Marques  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cândida  
Aparecida Leite Kassuya

**CURITIBA**

**2009**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	10
2.1. Objetivo geral .....	10
2.2. Objetivos específicos .....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Biodiversidade e a fitoterapia .....	11
3.2. Plantas com propriedades medicinais.....	13
3.3. <i>Gochnatia polymorpha</i> .....	13
3.3.1. Composição química.....	14
3.3.2. Partes utilizadas .....	15
3.4. Participação do endotélio vascular no controle do tônus vascular. ....	16
3.5. Participação do cálcio (Ca <sup>+2</sup> ) na contração da musculatura lisa. ....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1. Material Botânico.....	22
4.2. FLUXOGRAMA .....	23
4.2.1. Fracionamento do extrato.....	23
4.3 Estudos farmacológicos .....	23
4.3.1 Animais.....	23
4.3.2 Drogas.....	24
4.3.3 Procedimento para o isolamento de aorta torácica de rato. ....	24
4.4. Protocolos experimentais .....	25
4.4.1. Caracterização dos efeitos do extrato e dos compostos: Acetato de ..... bauerenila e 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C, obtidos de <i>G.polymorpha</i> sobre aorta isolada de rato.....	25
4.4.2 Protocolo para avaliar a atividade do extrato obtido de <i>G. polymorpha</i> no mecanismo contrátil dependente de cálcio extracelular em aortas sem endotélio .....	26
4.4.3 Protocolo para avaliar a possível participação do extrato de <i>G.</i> <i>polymorpha</i> no mecanismo contrátil dependente de cálcio intracelular. ....	26
4.4.4 Análise dos resultados e testes estatísticos .....	27

5. RESULTADOS .....	28
5.1. Efeito do extrato bruto etanólico obtido de <i>G. polymorpha</i> em aorta isolada de rato sem endotélio.....	28
5.2 Efeito vasorrelaxante da fração diclorometano (DCM), em anéis de aorta sem e com endotélio. ....	29
5.3 Efeito vasorrelaxante das frações de extrato da <i>G. polymorpha</i> . ....	30
5.5 Efeito vasorrelaxante de extrato, fração DCM e compostos isolados de <i>G. polymorpha</i> em anéis de aorta sem endotélio.....	32
5.6 Envolvimento do cálcio intracelular no efeito vasorrelaxante da fração DCM obtido de <i>G. polymorpha</i> em aorta isolada sem endotélio. ....	33
5.7 Envolvimento do cálcio extracelular .....	34
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÕES .....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB	- acetato de baurenila
Ach	- acetilcolina
AcOEt	- acetato de etila
AMP <sub>c</sub>	- monofosfato cíclico de adenina
Ang II	- angiotensina II
ANOVA	- análise de Variância
BK	- bradiginina
BuOH	-butanol
Ca <sup>2+</sup>	- cálcio
CaCl <sub>2</sub>	- cloreto de cálcio
CCD	- cromatografia em camada delgada
DAG	- diacilglicerol
DC	- 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanin C
DCM	- diclorometano
DMSO	- dimetilsulfóxido
EBE	- extrato bruto etanólico
EDHF	- fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EGTA	- ácido etilenoglicol bis2-aminoetileter tetra acético
EP	- éter de petróleo
EtOH	- etanólico
GCs	- guanilato ciclase solúvel
GMP <sub>c</sub>	- monofosfato cíclico de guanosina
IP <sub>3</sub>	- trifosfato de inositol
IP <sub>4</sub>	- tetrafosfato de inositol
K <sup>+</sup>	- potássio
MLCK	- quinase de cadeia leve de miosina
Na <sup>+</sup>	- sódio
NO	- óxido nítrico
NOS	- óxido nítrico sintase
PA	- pressão Arterial
PGH <sub>2</sub>	- prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	- prostaciclina

Phe	- fenilefrina
PGI <sub>2</sub>	- prostaciclina
Phe	- fenilefrina
PIP <sub>2</sub>	- fosfatidil-inositol-bisfosfato
PKC	- proteína quinase C
PKG	- proteína quinase G
PLC	- fosfolipase C
ssp	- espécie
TXA <sub>2</sub>	- tromboxano A <sub>2</sub>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE TABELAS

1	% de relaxamento de extrato e fração de extrato	31
---	---	----

## LISTA DE FIGURAS

1	Composto isolado- Acetato e baurenila	15
2	Composto isolado-11- $\alpha$ H-13- diidrozaluzanina C	15
3	Importância do endotélio na regulação do tônus vascular	19
4	Via de sinalização envolvida na contração muscular	21
5	Efeito do extrato bruto etanólico obtido de <i>G. polymorpha</i> em aorta isolada de rato sem endotélio	28
6	Efeito vasorrelaxante da fração diclorometano (DCM), em anéis de aorta isolada sem e com endotélio	29
7	Efeito vasorrelaxante das frações de extrato da <i>G. polymorpha</i>	30
8	Efeito vasorrelaxante de extrato, fração DCM e compostos isolados de <i>G. polymorpha</i> em anéis de aorta sem endotélio	32
9	Envolvimento de canais de cálcio intracelular em aorta sem endotélio no efeito vasorrelaxante da fração DCM	33
10	Envolvimento do cálcio extracelular no efeito vasorrelaxante causado pela fração DCM do extrato de <i>G. polymorpha</i>	34

## 1. INTRODUÇÃO

Em meio à imensa diversidade de plantas existentes no mundo, o homem desde tempos muito remotos vem tentando desenvolver medicamentos de origem natural ou derivados sintéticos através da utilização de plantas medicinais para o tratamento das mais variadas doenças que afligem a humanidade. Essa prática sobreviveu ao processo evolutivo e aos avanços tecnológicos, chegando aos dias atuais como grande fonte de recursos terapêuticos (DI STASI, 1960).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos, os metabólitos primários que incluem os lipídeos, proteínas e glicídeos com funções vitais bem definidas e um segundo grupo de compostos químicos que são os metabólitos secundários. Eles apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. Neste grupo estão incluídos os alcalóides, terpenos e outros.

As plantas medicinais são freqüentemente utilizadas para o auxílio das terapias convencionais, principalmente pela facilidade de obtenção e pelo baixo custo, quando utilizadas *in natura*. Porém, sabe-se que as plantas apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com inúmeras atividades biológicas (FARNSWORTH *et al.*, 1985; SIMÕES, 2003) recomendando, portanto uma série de cuidados no seu uso, principalmente pelos efeitos colaterais que possam ocorrer e as interações com outros fármacos que estejam sendo utilizados simultaneamente.

O uso de plantas, na tentativa de melhora ou cura de doenças ou picadas de insetos e animais peçonhentos, é amplamente utilizada por curandeiros, xamãs e pajés no mundo todo. O conhecimento a respeito desta prática milenar é transmitido de geração em geração, perpetuando assim o seu uso como recurso terapêutico popular. Estas informações se tornaram importantes ao longo da história e por isso a ciência busca, através da etnobotânica e etnofarmacologia, validar o conhecimento popular e, disponibilizá-lo em descrições publicadas em livros, revistas ou em trabalhos científicos. Isso porque, um dos grandes problemas no uso terapêutico das



plantas para o tratamento de doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua ação biológica, seu espectro toxicológico e sua eficácia para garantir a segurança e qualidade dos medicamentos preparados a partir dos vegetais ou seus princípios ativos (menos de 10% das plantas utilizadas como medicinais apresentam estudos científicos).

O isolamento de compostos de plantas é uma importante estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos. Nas últimas décadas tem-se observado o grande interesse da indústria farmacêutica pelo potencial terapêutico das plantas medicinais. Estima-se que 25% de todos os medicamentos do mercado atual são derivados direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou mesmo compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN e CARTER, 2005). Assim, na terapêutica moderna, 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.

Dentro deste contexto, o Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, detendo cerca de 20% do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001). A imensa variedade de espécies de plantas, animais e microorganismos existentes no ecossistema brasileiro apresentam um importante diferencial para o desenvolvimento de vários medicamentos que assolam as inúmeras doenças que acometem a população. Dentro desta imensa variedade de espécies encontram-se as plantas do gênero *Gochnatia*. As folhas das plantas da espécie *G. polymorpha* têm sido usadas na medicina popular para o preparo de chás e xaropes no tratamento de gripes, resfriados, tosse e outras afecções do sistema respiratório (MORS *et al.*, 2000). Apesar da ampla utilização desta planta pela população, existem raros estudos que comprovem ou refutem a atividade biológica da *G. polymorpha*. Porém alguns estudos para a avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de folhas de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa* já foram realizados. Esta atividade parece estar relacionada à presença de diterpenos no extrato. (STEFANELLO *et al.*, 2006). Outros trabalhos estão sendo realizados no departamento de farmacologia da

Universidade Federal do Paraná (UFPR) com a mesma planta onde estão sendo avaliadas as atividades anti-edematogênica e antiinflamatória do extrato e frações de *G. polymorpha*. Os resultados preliminares indicam que tanto o extrato como a fração butanólica apresentam atividade antiedematogênica em modelo de edema de pata induzido pela carragenina, e atividade antiinflamatória em modelo de pleurisia induzido pela administração na cavidade pleural de carragenina, com redução na migração celular e protéica (de SOUZA, 2009).

O uso popular não é o suficiente para validar a propriedade terapêutica de uma planta, uma vez que a autorização oficial para seu uso como medicamento é necessária e deve ser fundamentada em evidências experimentais e estudos farmacológicos que comprovem os benefícios de seu uso. O conhecimento empírico existente, e muitas vezes já consagrado pelo uso contínuo, nos permite planejar a pesquisa e validar ou não o uso da planta como medicamento, em bases científicas. (DI STASI 1995).

Tendo em vista as conseqüências clínicas mundiais geradas pelas doenças cardiovasculares, consideramos fundamentais os investimentos em estudos que buscam identificar novas opções de prevenção e tratamento das enfermidades (JACOB, 1999).

No departamento de Farmacologia da UFPR, o grupo de pesquisa “Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Naturais”, desenvolve estudos, *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de validar plantas medicinais utilizadas popularmente com base em informações etnofarmacológicas e etnobotânicas.

Assim sendo, tornou-se importante o estudo da ação e do mecanismo vasorrelaxante de extratos e compostos de *G. polymorpha* uma vez que nenhum estudo sobre esta atividade é relatado na literatura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar a ação do extrato, frações e dos compostos acetato de bauerenila e 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C de *G. polymorpha* sobre o tônus da

musculatura lisa vascular de ratos e identificar as vias envolvidas no mecanismo de ação *in vitro*.

## 2.2. Objetivos específicos

- Verificar a ação do extrato e dos compostos acetato de bauerenila 11-  $\alpha$  H-13-diidrozaluzanina C obtidos de *G. polymorpha* sobre o músculo liso vascular;
- Investigar as concentrações do extrato capazes de promover efeitos sobre a musculatura lisa vascular;
- Avaliar a participação do endotélio vascular no relaxamento produzido pelo extrato da *G. polymorpha*;
- Avaliar a participação dos canais de Cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) extracelular na possível ação vasorrelaxante do extrato da *G. polymorpha*;
- Avaliar a participação do Cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) intracelular na possível ação vasorrelaxante do extrato da *G. polymorpha*;

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

### 3.1. Biodiversidade e a fitoterapia

No final do século XX, a humanidade passou a preocupar-se com ações atuais e nas conseqüências vindouras para o novo século. A biodiversidade foi um dos aspectos inteiramente discutidos e previstos como de vital importância para as gerações futuras. A diversidade biológica abrange aspectos éticos, culturais, econômicos, sociais e científicos, mobilizando assim, grande parcela da população global (GARAY e DIAS, 2001).

A biodiversidade expressa o conjunto das diferentes formas em que a vida se manifesta, envolve todos os seres vivos existentes. Estima-se que existam pelo menos 5 a 50 milhões de espécies no planeta, sendo que já foram identificados pela ciência mundial, cerca de 1,4 milhões de espécies. Das

identificadas, mais de 365 mil espécies são de plantas, o que corresponde à cerca de 60% das existentes no mundo (GARCIA, 1995).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, o que corresponde a quase 23% da flora mundial. Estimativas atuais indicam a existência de 5 a 10 mil espécies de gimnospermas, 55 a 60 mil espécies de angiospermas, 3.100 espécies de briófitas, 1.200 a 1.300 espécies de pteridófitas e cerca de 530 espécies de algas marinhas (MMA, 1998, GIULIETI, *et al.*, 2005).

Os componentes da biodiversidade de plantas são importantes para a saúde humana. Antigamente, quase todos os medicamentos eram provenientes de plantas, e ainda hoje, mesmo com a modernização e as constantes mudanças impulsionadas pela tecnologia, elas continuam sendo vitais. A medicina tradicional ainda é usada como tratamento inicial por cerca de 80% da população em países em desenvolvimento (média de três bilhões de pessoas). Só na China são utilizadas mais de 5.100 espécies de plantas e, no noroeste da Amazônia em torno de 2.000 espécies são usadas para fins medicinais pela população (FUNDAÇÃO O BOTICÁRIO, 1992).

O imenso patrimônio genético brasileiro, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Estima-se que grande parte dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (CALIXTO, 2005).

Atualmente, no Brasil, o consumo de medicamentos sintéticos vem diminuindo drasticamente nos últimos 10 anos, dando lugar ao consumo de fitoterápicos (UPNMOOR, 2003). A palavra fitoterapia vem do grego e quer dizer: tratamento (*therapia*), vegetal (*phyton*) – tratamento pelos vegetais ou ainda “a terapêutica das doenças através das plantas” (STERN, 2007). Conceitualmente, a fitoterapia pode ser definida como o estudo e a aplicação

dos efeitos terapêuticos de drogas vegetais e derivados dentro de um contexto holístico (ELDIN e DUNFORD, 2001).

### **3.2. Plantas com propriedades medicinais**

Grande parcela das plantas encontradas mundialmente possui princípios biologicamente ativos. Quatro mil anos a.C., os povos descobriram as propriedades do ópio, obtido da papoula (*Papaver somniferum*) e este foi um marco histórico na utilização de princípios ativos de plantas. O ópio era usado como analgésico e assim como outras plantas do gênero que contém os mesmos princípios terapêuticos do ópio. Por volta de 1800 houve o isolamento da morfina que até os dias atuais é empregada como poderoso analgésico e ainda utilizada na medicina moderna.

Existe uma imensa diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e/ou biológicas de produtos isolados de plantas. 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, na terapêutica moderna, 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. Dentre a enorme biodiversidade de plantas utilizadas na medicina popular, podemos denotar o destaque da *G. polymorpha*.

### **3.3. *Gochnatia polymorpha***

A família Asteraceae (nome antigo: Compositae) compreende 1100 gêneros e cerca de 20.000 espécies. No Brasil está representada por cerca de 190 gêneros e 1.900 espécies. O gênero *Gochnatia* possui 66 espécies, a maioria encontrada na América do Sul. Do ponto de vista químico, é um gênero ainda pouco conhecido, pois apenas 15 espécies foram estudadas. *G. polymorpha* (Less) Cabr. é uma árvore de médio porte, encontrada em vários estados brasileiros. A sua madeira é muito aproveitada por ter um cerne

compacto, pesado e muito resistente. A subespécie *ceanothifolia* ocorre nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e também no Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina. A subespécie *floccosa* é exclusiva do Brasil, sendo encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No Brasil é conhecida como Cambará, cambará-da-folha-grande ou cambará-do-mato nome dado também a várias outras espécies do gênero. São reconhecidas três subespécies: *polymorpha*, *ceanothifolia* e *floccosa*, sendo a última amplamente dispersa no estado do Paraná (CABRERA, 1973; STEFANELLO *et al.*, 2003).

### 3.3.1. Composição química

Alguns estudos fitoquímicos já foram realizados com *G. polymorpha*, e os resultados apresentados foram diversos. Com o nome antigo de *Mochinea polymorpha*, FARIAS e colaboradores (1984) relataram o isolamento da lactona deidrocostunolídeo e do triterpeno acetato de bauerenila (Figura 1) a partir do caule de um exemplar coletado em Campinas, SP. As partes aéreas e raízes de um exemplar do Paraguai, sem identificação da subespécie, forneceram uma série de bisabolenos e guaianolídeos diméricos (BOHLMANN *et al.*, 1986). Outro trabalho realizado também com as partes aéreas e as raízes mostrou resultados totalmente diferentes. A partir de um exemplar paulista da subespécie *polymorpha*, foram isolados diterpenos, triterpenos, o eudesmanolídeo santamarina e os flavonóides genkwanina e demetoxicentaureidina (SACILOTTO *et al.*, 1997). Em um estudo realizado com outro exemplar brasileiro, subespécie não identificada foi verificado que os extratos das folhas possuíam atividade antiinflamatória (FALCÃO *et al.*, 2005). A partir desses extratos foram isolados os ácidos cafeico e clorogênico, o aminoácido 4-hidroxi-*N*-metilprolina e os flavonóides 3-*O* metilquercetina, hiperosídeo e rutina (MOREIRA *et al.*, 2000). Diterpenos, triterpenos e cumarinas foram isolados das partes aéreas de um exemplar paraguaio da subespécie *polymorpha* (CATALAN *et al.*, 2003). Fenilpropanóides, monoterpenos sesquiterpenos, e composto 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C (Figura 2) foram identificados das flores e raízes de um exemplar da subespécie *floccosa*. (STEFANELLO *et al.*, 2006). Essa variabilidade química

pode ser devido ao local de coleta, variações sazonais ou mesmo a existência de quimiotipos nesta subespécie

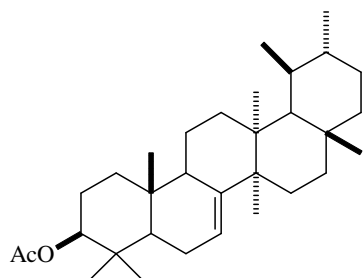


Figura 1: Acetato de bauerenila

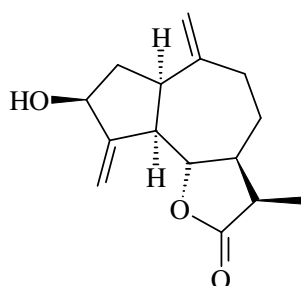


Figura 2: 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C

Em relação à confirmação científica de atividades biológicas, STEFANELLO e colaboradores (2006), sugerem a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos de *G. polymorpha* ssp *floccosa*. O extrato em diclorometano dos galhos mostrou uma atividade específica contra *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria de difícil controle envolvida em doenças respiratórias. Além disso, as folhas de *G. polymorpha* demonstraram atividade antiinflamatória (Moreira *et al.*, 2000).

### 3.3.2. Partes utilizadas

As suas folhas têm sido usadas na medicina popular para o preparo de chás e xaropes que são usados contra gripes, resfriados, tosse e outras afecções do sistema respiratório (MORS, *et al.*, 2000; PIO CORREA, 1984).

### **3.4. Participação do endotélio vascular no controle do tônus vascular.**

A pressão arterial corresponde à força que o sangue bombeado pelo coração exerce contra a parede distensível dos vasos. Nos humanos a pressão varia a todo instante, no entanto, raramente desvia do valor de referência de 10 a 15% ao dia. Um adulto normal apresenta a sua pressão arterial média em torno de 100 mmHg, em episódios com comprometimento circulatório (uma hemorragia por exemplo) pode chegar a 0 mmHg, ou aumentar a 160mmHg em indivíduos com hipertensão arterial, comprometendo assim a homeostasia.

Para compensar essas alterações o organismo lança mão de vários mecanismos de controle da pressão sanguínea, os quais interagem de forma eficaz para produzir respostas apropriadas nas circunstâncias que modificam a pressão arterial.

Esses mecanismos de regulação da pressão arterial podem ser agrupados de acordo com o tempo necessário à reação. Em curto prazo (reação em segundos), esse controle é desempenhado pelos barorreflexos, quimiorreflexos e sistema nervoso central. Os rins exercem o controle da pressão arterial a longo prazo (horas ou dias). E a médio prazo (minutos), a regulação ou modulação ocorrem principalmente por ação dos sistemas hormonais (sistema renina-angiotensina, sistema caliceína-cinina, vasopressina, fator natriurético atrial e mediadores endoteliais) (GUYTON, 1991).

A descoberta da produção de substâncias vasoativas pelo endotélio vascular acrescentou um importante mecanismo para a regulação ou controle da pressão arterial, através de efeitos locais que alteram o tônus dos vasos (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980)

O endotélio produz uma variedade de substâncias que desempenham um papel importante na regulação da circulação sanguínea e homeostase vascular. Dentre eles estão os vasoconstritores endotelina, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e a angiotensina II, e os vasodilatadores prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Através destes mediadores, o endotélio exerce sua influência no fluxo sanguíneo e ainda sobre as células circulantes, como os leucócitos, as plaquetas e ainda sobre substâncias envolvidas na



coagulação sangüínea. Todos estes efeitos contribuem para a modulação do tônus vascular e participam no desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares (SCHIFFRIN, 2001).  
Figura 3.

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 (em Inglês, conhecido como shear stress). O estresse de cisalhamento é um estímulo físico gerado pelo atrito do fluxo sangüíneo sobre a camada íntima dos vasos. Este atrito parece promover a liberação de substâncias vasorrelaxantes endoteliais como NO, a PGI<sub>2</sub> ou EDHF (FRANGOS *et al.*, 1985; CAMPBELL & GAUTHIER, 2002; BOO & 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. Da mesma forma, estímulos que liberam vasoconstritores endoteliais (como a endotelina) promovem redução no diâmetro vascular, o que resulta no aumento da pressão arterial. Desta maneira, mecanismos envolvendo substâncias produzidas pelo endotélio vascular podem contribuir para a regulação da pressão sangüínea.

A vasodilatação e a vasoconstrição, portanto, decorrem de alterações geradas por estímulos químicos ou físicos que atuam nas diferentes camadas constituintes dos vasos. Na camada de células endoteliais, estes estímulos podem culminar com a liberação de substâncias vasoativas produzidas por estas células (PGI<sub>2</sub>, NO e EDHF), as quais exercem suas ações na camada adjacente, a musculatura lisa. Entretanto, a camada de células musculares lisas, também pode ser alvo direto de outros estímulos químicos, além daqueles provenientes do endotélio (por exemplo, a adrenalina circulante).

Nos vasos sanguíneos, um dos principais mediadores 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. 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-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) presentes na membrana celular, originando o inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG) (GRIFFITH *et al.*, 1984).

O IP<sub>3</sub> age nos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> 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<sub>4</sub> (inositol 1, 3, 4, 5-tetrafosfato) e insensíveis ao IP<sub>3</sub>, localizados nas células endoteliais. Estes canais podem estar envolvidos no influxo transmembrana do Ca<sup>2+</sup> para as células endoteliais (LUCKHOFF & CLAPHAM, 1992) ou ainda, no relaxamento vascular pelo estresse de cisalhamento e na interação agonista–receptor nas células endoteliais (BASSENGE *et al.*, 1987). O DAG induz a estimulação da proteína quinase C (PKC), que pode fosforilar a NOS das células endoteliais, causando uma forte diminuição na sua atividade catalítica e na produção de NO (BREDT *et al.*, 1992). Isto pode explicar a inibição do relaxamento vascular pela histamina em artéria pulmonar de cobaias após a ativação da PKC pelo éster de forbol (ativador direto da PKC) (WEINHEIMER *et al.*, 1986).

O NO, depois de 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 & MARLETTA, 1995). A ativação da GCs gera um aumento da concentração citosólica do monofosfato cíclico de guanosina (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 & MURAD, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de K<sup>+</sup>, ocasionando hiperpolarização e conseqüente relaxamento vascular. A exemplo da acetilcolina, diversos agonistas provocam vasodilatação através da ativação da via L-arginina-óxido nítrico. Dentre eles estão a histamina, a serotonina, a bradicinina e a substância P (FURCHGOTT, 1983).

### Importância do endotélio na regulação do tônus vascular.

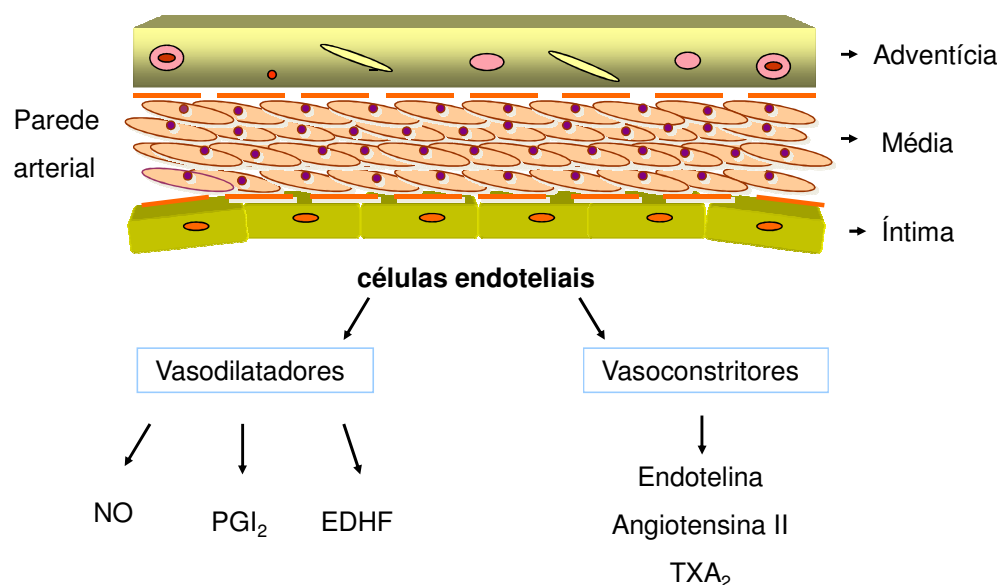


Figura 3: Modificado de FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1983

### 3. 5. Participação do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na contração da musculatura lisa.

As fibras do músculo liso são menores e mais finas que as fibras do músculo esquelético, medindo de 1 a 5 micrômetros de diâmetro e possuem de 20 a 500 micrômetros de comprimento, já as fibras da musculatura esqueléticas possuem um diâmetro 30 vezes maiores e são 100 vezes mais compridas (GUYTON,1991).

Os canais de cálcio são importantes para a regulação do tônus muscular liso e conseqüentemente da pressão sanguínea por influência da hiperpolarização em potencial de membrana por canais  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  no sistema de miócitos vasculares (JAGGAR *et al.* 2000; WIER & MORGAN, 2003). Eles também possuem influência despolarizando canais  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$  em outros músculos lisos como o pulmonar (REMILLARD *et al.* 2002).

O potencial de ação, no músculo liso, é na maioria dos casos gerado pelos canais de cálcio do tipo L, constituindo uma rota importante para a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, muitas células musculares lisas possuem canais de cátions controlados por ligantes que permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ao

responderem aos transmissores. As células musculares lisas também armazenam  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo endoplasmático, de onde pode ser liberado quando o  $\text{IP}_3$  é ativado. O  $\text{IP}_3$  é gerado pela ativação de diversos tipos de receptores acoplados à proteína G. No músculo liso, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e a contração podem ocorrer quando esses receptores são ativados, sem envolver necessariamente a despolarização e a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática (RANG&DALE, 2007).

O início da contração muscular se dá quando ocorre um aumento da concentração de íons cálcio intracelular e impulsionada pela energia do ATP. Cada músculo apresenta características próprias neste mecanismo, no músculo esquelético a elevação na concentração de cálcio intracelular, afeta a actina, já no músculo liso afeta a miosina (contração regulada por miosina).

As células em repouso apresentam a maioria do cálcio intracelular armazenado, principalmente, no retículo sarcoplasmático e mitocôndrias. Nesta situação a quantidade de cálcio livre é baixa. Entretanto, em resposta a um estímulo específico, hormonal ou por uma droga, por exemplo, no músculo liso, a concentração intracelular de cálcio aumenta, através da liberação dos estoques intracelulares do retículo endoplasmático, bem como a entrada de cálcio extracelular através dos canais de cálcio. Esse aumento da concentração intracelular de cálcio leva à ativação do complexo cálcio calmodulina (a calmodulina ocorre sob forma livre no citosol ou como sub-unidade da glicogênio fosforilase quinase, é uma pequena proteína com quatro sítios de ligação para as moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que, ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e esta irá causar a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) soltando-a dos filamentos de actina induzindo a contração da musculatura lisa (WEBB, 2003). Uma segunda enzima a fosfatase de miosina reverte a fosforilação causando o relaxamento. Assim a MLCK e a fosfatase possuem efeitos que se contrabalançam, promovendo, respectivamente, contração e relaxamento do tecido muscular liso com ou sem a participação do endotélio vascular. As duas enzimas são reguladas por nucleotídeos ( $\text{AMP}_c$  e  $\text{GMP}_c$ ), e muitos fármacos que promovem relaxamento ou contração do músculo liso mediados pelos receptores acoplados à proteína G ou através dos receptores ligados à guanilato quinase atuam dessa forma (RANG&DALE, 2007). Figura 4.

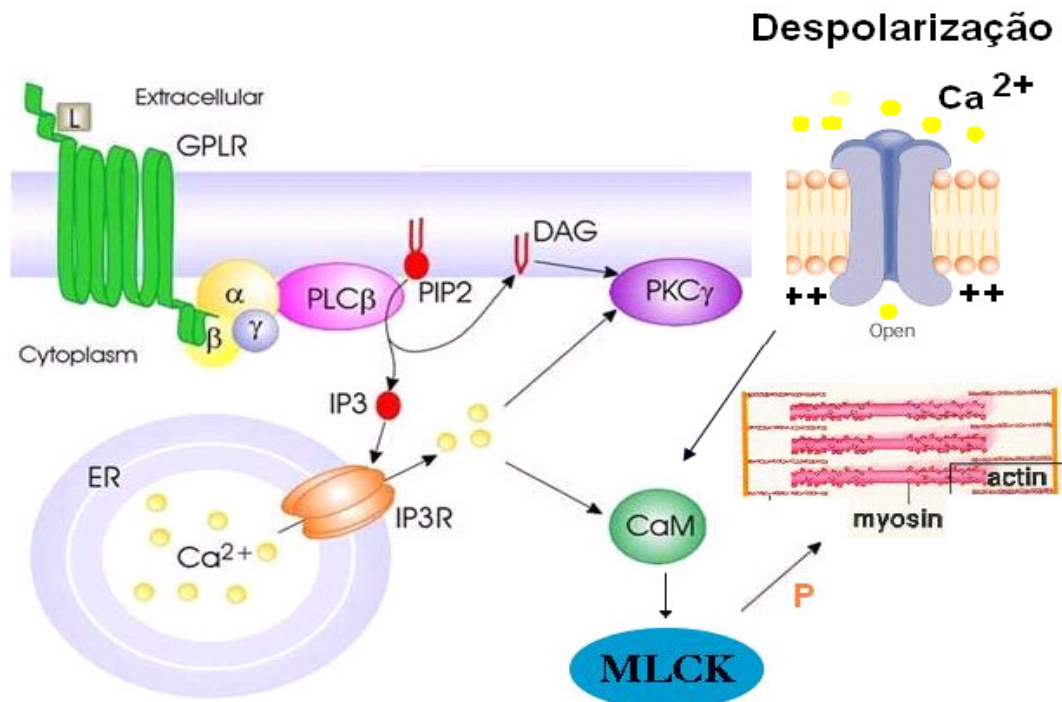


Figura 4: Via de sinalização envolvida na contração muscular.

Em resposta a um estímulo específico, hormonal ou por uma droga, no músculo liso a concentração de íons cálcio intracelular aumentam pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático ou através dos canais de cálcio de membrana. Esse aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  leva a ativação do complexo cálcio-calmodulina (CaM), que leva a ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), esta quinase vai fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC), soltando-a dos filamentos de actina induzindo a contração do músculo liso. (WEEB, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

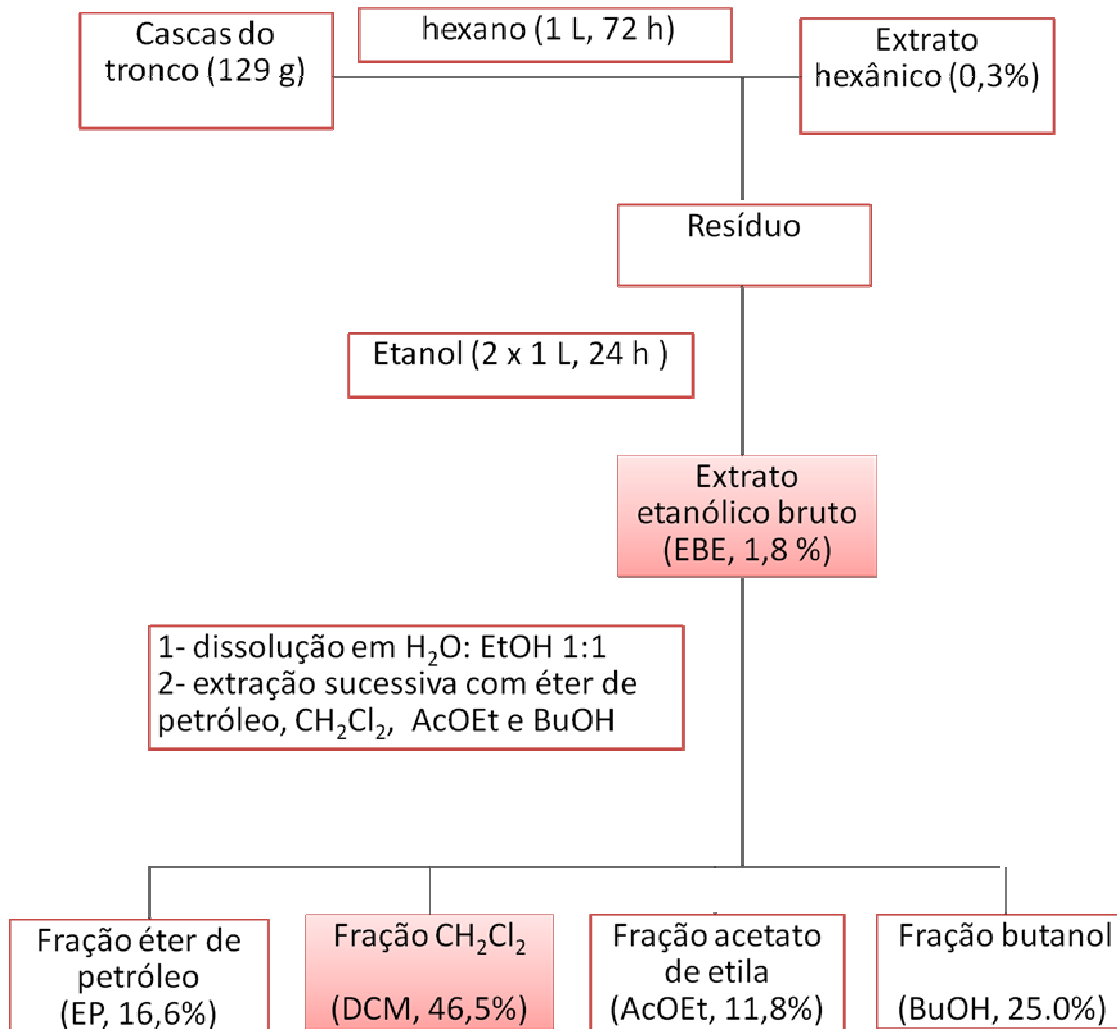
### 4.1. Material Botânico

Foram coletadas folhas, galhos, cascas do tronco e raízes de exemplares de *Gochnatia* em Curitiba, Paraná, Brasil em Maio de 2008. Um exemplar da espécie foi identificado pelo professor Armando Carlos Cervi do departamento de botânica UFPR e uma exsicata foi depositado em herbário na UFPR (UPCB 30.100). Para os nossos estudos, o extrato e as frações foram fornecidos pela Professora Maria Élide Stefanello, do Departamento de química, da Universidade Federal do Paraná.

O material orgânico foi picado e colocado em estufa para secar, foi extraído a frio por solventes de polaridade crescente. Os solventes foram removidos em evaporador rotativo, fornecendo os extratos em cada um dos solventes. Da fração diclorometano (DCM), que apresentou maior bioatividade, foram isolados dois compostos (figura 1: acetato de bauerenila e figura 2: 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanin C) usando-se a cromatografia em camada delgada (CCD), que consiste na separação de componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorventes retida sobre uma superfície plana, geralmente de vidro. (MATOS, 1988; HARBORNE, 1984; COLLINS & BRAGA, 1987; CHRISTIAN & O' REILLY, 1986; MERCK, s.d.; SHRINER *et al* 1983). Além disso, a Prof.<sup>a</sup> Maria Élide Stefanello forneceu os compostos.

## 4.2. FLUXOGRAMA

### 4.2.1. Fracionamento do extrato



## 4.3 Estudos farmacológicos

### 4.3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) variedade *Wistar*, machos, adultos, pesando entre 180 e 250g, da colônia do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, ciclo claro/escuro de 12 horas, tratados com água e ração balanceada à vontade. Os protocolos para realização destes experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal desta Universidade sob o número 336.

### **4.3.2 Drogas**

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas, sais e reagentes: Fenilefrina (Phe), acetilcolina (Ach )EGTA (todas as drogas do laboratório Sigma, St. Louis, MO, USA), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), D-Glucose, (todos Merck; Alemanha); Todos os sais foram preparados no momento de uso e solubilizados em água destilada, e as diluições das drogas (obtidas a partir das soluções estoques) serão preparadas com líquido nutritivo de Krebs. O extrato foi preparado em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que a quantidade deste não interfira na resposta normal dos tecidos.

### **4.3.3 Procedimento para o isolamento de aorta torácica de rato.**

Os animais foram mortos por deslocamento cervical, a aorta torácica retirada e o tecido conectivo removido. Em seguida, o tecido foi seccionado em anéis com 4 mm de comprimento. Estes anéis foram mantidos em cubas de vidro (3 ml), contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit, aquecida a 37°C, aerada com solução carbogênica e sob 1 g de tensão. A haste introduzida no anel de aorta foi conectada a um transdutor de força que permitiu o registro de contrações isométricas em sistema computadorizado. Um período de 60 minutos de estabilização foi aguardado antes do início de cada experimento, bem como nos intervalos entre as estimulações. Neste período o líquido nutritivo foi renovado a cada 15 minutos.



#### 4.4. Protocolos experimentais

**4.4.1. Caracterização dos efeitos do extrato e dos compostos: Acetato de bauerenila e 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C**, obtidos de *G.polymorpha* em aorta isolada de rato.

Em anéis de aorta isolada, após o período de estabilização, a presença ou ausência de endotélio foi confirmada através da administração de acetilcolina (1  $\mu$ M) nos anéis de aorta contraídos previamente pela fenilefrina (1  $\mu$ M).

Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela acetilcolina correspondeu a 80%. Uma segunda resposta à fenilefrina foi obtida e, durante a fase tônica da contração resultante, o extrato ou fração de extrato de *G. polymorpha* foram adicionados nas concentrações de 3 – 3000  $\mu$ g/ml e os compostos, acetato de bauerenila e 11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanina C também foram testados nas concentrações de 3-10-30-100  $\mu$ M. Ao término deste procedimento, foi induzida uma nova contração por fenilefrina (1  $\mu$ M), seguida da adição da acetilcolina (1  $\mu$ M) para avaliar se o extrato não comprometeu a integridade das preparações de aorta.

Após a confirmação do efeito do extrato e da faixa de concentrações em que atuou, foi investigado o mecanismo de ação intracelular responsável pelo efeito vasorrelaxante. Para tanto, o protocolo experimental descrito anteriormente foi realizado em anéis de aorta cujo endotélio vascular foi removido mecanicamente. A ausência de efeito vasorrelaxante nestes anéis irá sugerir uma ação dependente dos mediadores endoteliais, especialmente do NO e da PGI<sub>2</sub>. No entanto, a manutenção do efeito vasorrelaxante nos anéis desprovidos do endotélio vascular pode sugerir uma ação bloqueadora de canais de cálcio. Abaixo, o detalhamento dos protocolos experimentais que avaliam estas vias.

#### **4.4.2 Protocolo para avaliar a atividade do extrato obtido de *G. polymorpha* no mecanismo contrátil dependente de cálcio extracelular em aortas sem endotélio**

Para a avaliação do envolvimento do cálcio extracelular no relaxamento de aortas sem endotélio foi utilizado o seguinte protocolo: Após um período de sessenta minutos de estabilização em solução de Krebs' normal, as aortas foram encubadas em solução de krebs' despolarizante livre de cálcio (60 mM KCl e 1 mM EGTA), por um período de 15 minutos, com 4-5 lavagens. Foi então induzida uma curva concentração resposta frente ao  $\text{CaCl}_2$  (1  $\mu\text{M}$ -100 mM) em cada cuba (PRIVIERO, 2006).

Após o registro da contração máxima frente ao  $\text{CaCl}_2$ , as aortas foram lavadas com a solução de krebs' normal por um período de 60 min. Uma segunda curva concentração resposta foi registrada com as mesmas concentrações de  $\text{CaCl}_2$  após a incubação do extrato da *G. polymorpha*, (10-100 ou 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) por 15 min. Ao final do protocolo para verificar se o extrato não comprometia a integridade das preparações de aorta, foi induzida uma terceira curva concentração resposta frente ao  $\text{CaCl}_2$ .

#### **4.4.3 Protocolo para avaliar a possível participação do extrato de *G. polymorpha* no mecanismo contrátil dependente de cálcio intracelular.**

Para avaliar o envolvimento do cálcio intracelular no efeito vasorrelaxante do extrato de *G. polymorpha*, em aortas sem endotélio foi seguido o seguinte protocolo. As aortas, sem endotélio, após um período de 60 min de estabilização em solução nutritiva de krebs' normal, foram lavadas e acondicionadas em solução nutritiva livre de cálcio, contendo 1 mM de EGTA, por 15 min. Nestas condições as aortas foram exposta à Phe (1  $\mu\text{M}$ ), e sua curva foi registrada. Uma segunda curva foi registrada após um período de 60 min, sob as mesmas condições. Após um novo período de estabilização diferentes concentrações do extrato, ou fração DCM da *G. polymorpha*, (10-100 ou 1000  $\mu\text{g/ml}$ ), foram adicionadas às cubas com solução nutritiva livre de cálcio, e após 15 min foram expostas à Phe (1  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.4.4 Análise dos resultados e testes estatísticos**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de, no mínimo, 5 experimentos. Todos os gráficos apresentados foram produzidos com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows. Para a análise estatística, foi utilizada 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.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito do extrato bruto etanólico obtido de *G. polymorpha* em aorta isolada de rato sem endotélio.

Verificamos que o extrato bruto etanólico nas concentrações cumulativas de (3-3000  $\mu\text{g/ml}$ ) promoveu um relaxamento máximo de  $66,6 \pm 12,6\%$  em relação ao controle, em aortas sem endotélio previamente contraídas com Phe ( $1\mu\text{M}$ ).

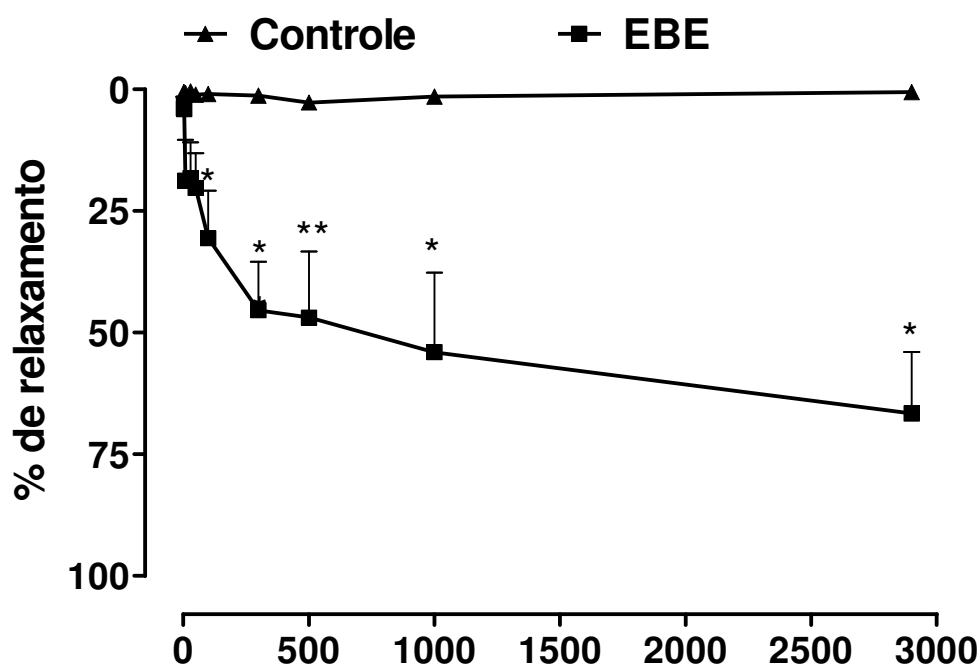


Figura 5: Efeito vasorrelaxante do EBE (nas concentrações de 3-3000  $\mu\text{g/ml}$ ) de *G. polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ). Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 experimentos, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA seguida do teste  $t$  de Bonferroni).

## 5.2. Efeito vasorrelaxante da fração diclorometano (DCM), em anéis de aorta sem e com endotélio.

Verificamos que a fração DCM nas concentrações cumulativas de (3-3000  $\mu\text{g/ml}$ ) foi capaz de promover um relaxamento máximo de  $65,9\pm 8,3\%$  e  $30,00\pm 6,66\%$  em anéis de aorta sem e com endotélio respectivamente, previamente contraídas pela Phe (1  $\mu\text{M}$ ), em relação ao controle.

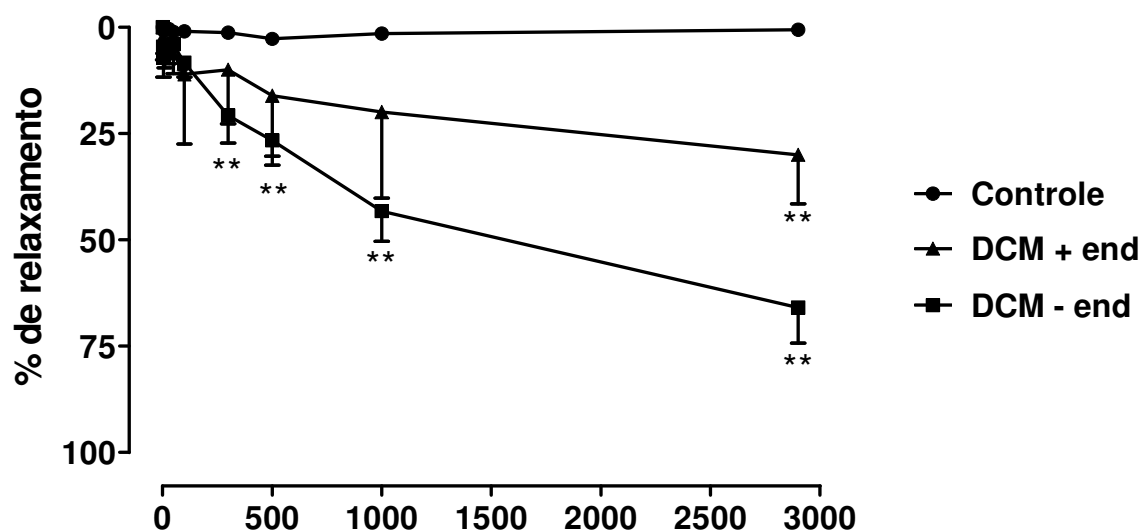


FIGURA 6: Efeito vasorrelaxante do extrato em DCM (nas concentrações de 3-3000  $\mu\text{g/ml}$ ) de *G. polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ). Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão das médias de 7 ou 8 experimentos, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA seguida do teste *t* de Bonferroni).

### 5.3. Efeito vasorrelaxante das frações de extrato da *G. polymorpha*.

O EBE, nas concentrações cumulativas de (3-3000  $\mu\text{g/ml}$ ), foi capaz de promover um relaxamento de:  $18,3 \pm 7,4\%$ ,  $5,2 \pm 2,4\%$ ,  $30,6 \pm 0,7\%$ ,  $45,4 \pm 1,0\%$ ,  $46,9 \pm 13,6\%$ ,  $54 \pm 16\%$ ,  $66,6 \pm 12,6\%$  respectivamente. A fração DCM promoveu um relaxamento de:  $20,7 \pm 1,9\%$ ,  $26,6 \pm 3,7\%$ ,  $43,3 \pm 7,1\%$ ,  $65,9 \pm 8,3\%$ , nas concentrações de (100-3000  $\mu\text{g/ml}$ ). A fração Éter de Pet promoveu um relaxamento máximo de  $7,3 \pm 4,9\%$  na concentração de 3000  $\mu\text{g/ml}$ . A fração BuOH promoveu um relaxamento de  $29,2 \pm 9,6\%$  na concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Já a fração AcOEt promoveu um relaxamento máximo de  $47,1 \pm 15,6\%$ , na concentração de 3000  $\mu\text{g/ml}$ , todos em aorta sem endotélio. Figura 7

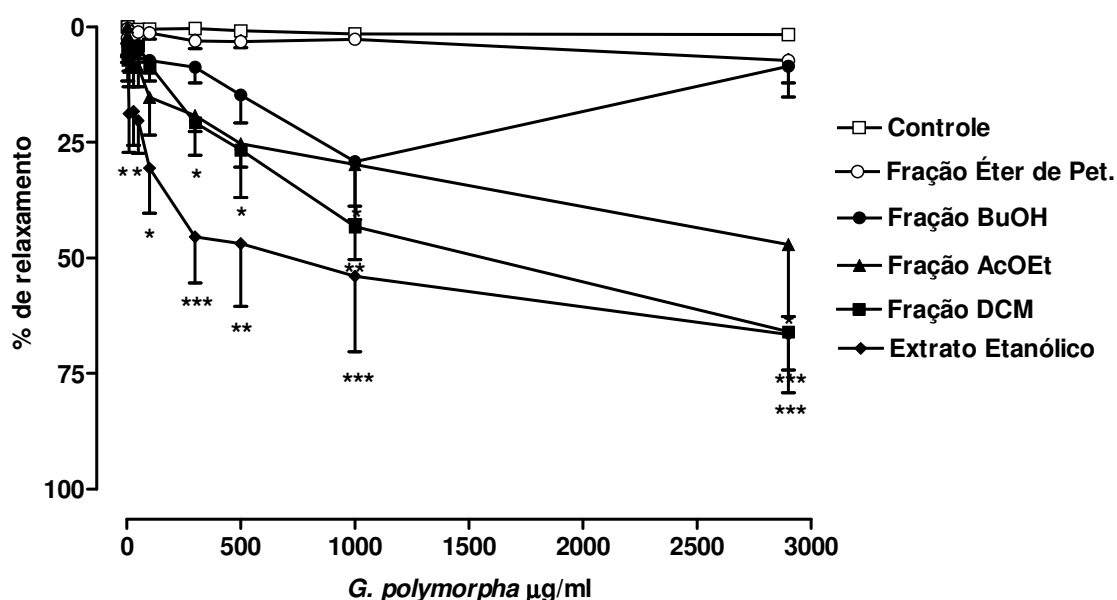


Figura 7: Efeito vasorrelaxante do extrato bruto etanólico e frações obtidas a partir da *G. polymorpha* (nas concentrações de 100-3000  $\mu\text{g/ml}$ ) em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ). Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 experimentos, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA seguido do teste *t* de Bonferroni).

**5.4. Tabela 1: % DE RELAXAMENTO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO EXPRESSOS COM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DE MÉDIA.**

	100	300	500	1000	3000
<b>EBE</b>	30,6 ± 0,7*	45,4 ± 1,0***	46,9 ± 13,6**	54 ± 16***	66,6 ± 12,6***
<b>DCM</b>	8,4 ± 3,3	20,7 ± 1,9*	26,6 ± 3,7*	43,3 ± 7,1**	65,9 ± 8,3***
<b>E P</b>	1,34 ± 1,3	3,1 ± 1,6	3,2 ± 1,3	2,7 ± 1,1	7,3 ± 4,9
<b>BuOH</b>	7,3 ± 2,7	8,7 ± 3,4	14,8 ± 6	29,2 ± 9,6	8,5 ± 6,6
<b>AcOet</b>	15,3 ± 8,1	19 ± 8,5	25,3 ± 11,6	29,8 ± 11,9*	47,1 ± 15,6*

Resultados expressos como a média ± erro padrão das médias de 6 experimentos, , \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 (ANOVA seguido do teste *t* de Bonferroni).

### 5.5 Efeito vasorrelaxante de extrato, fração DCM e compostos isolados de *G. polymorpha* em anéis de aorta sem endotélio.

Verificamos que o EBE promoveu um relaxamento máximo de  $54 \pm 16\%$  e a fração DCM um relaxamento máximo de  $43,3 \pm 7\%$ , na concentração de  $1000 \mu\text{g/ml}$ . Os compostos isolados da fração DCM, não promoveram relaxamento. Todos em aorta de rato sem endotélio.

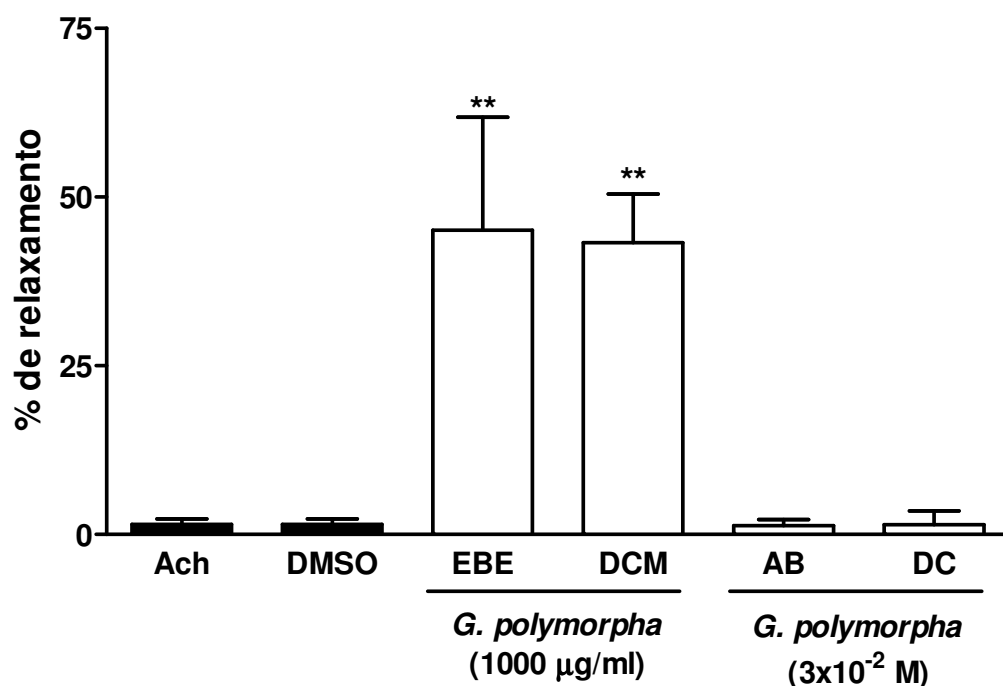


Figura 8: Efeito vasorrelaxante do extrato bruto etanólico, fração DCM e compostos isolados AB (Acetato de bauerenila) e DC (11- $\alpha$ H-13-diidrozaluzanin C) obtidas de *G. polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ). Resultados expressos como o relaxamento máximo obtido com a concentração de  $1000 \mu\text{g/ml}$  para EBE e DCM, e  $3 \times 10^{-2}$  M para AB e DC. Onde  $**p < 0,01$  (ANOVA seguido do teste *t* de Bonferroni).



### 5.6 Envolvimento do cálcio intracelular no efeito vasorrelaxante da fração DCM obtido de *G. polymorpha* em aorta isolada sem endotélio.

As concentrações de 10, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$  reduziram a contração máxima obtida com a Phe em 29, 35 e 42% respectivamente, quando incubados em solução nutritiva livre de cálcio.

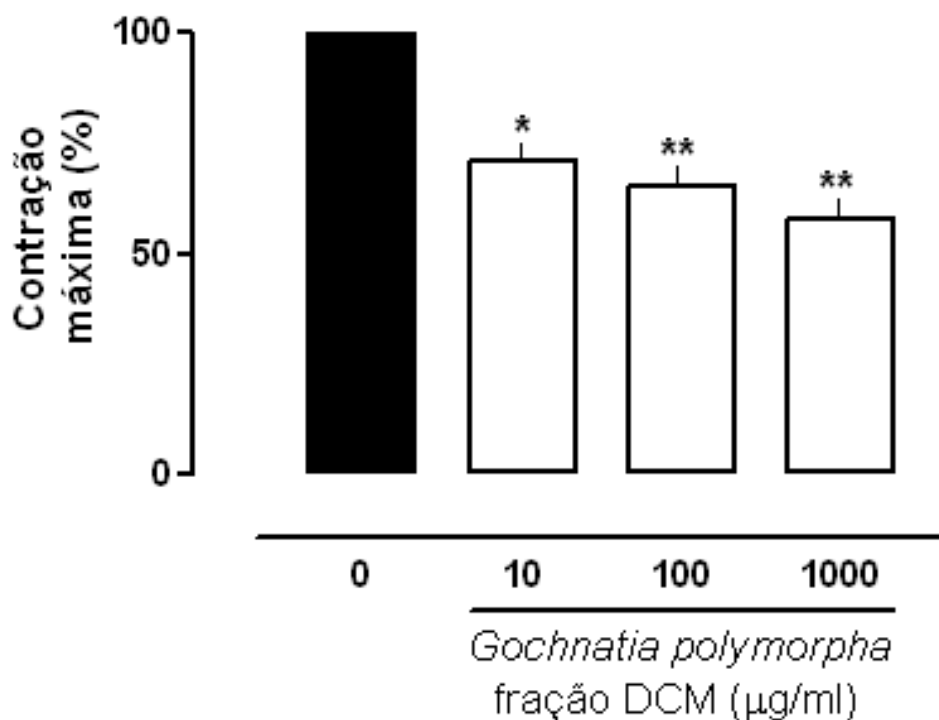


Figura 9: Efeito da fração DCM de *Gochnatia polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato contraídos pela fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) antes e após a incubação da fração em solução nutritiva sem cálcio. Resultados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de bonferroni, onde \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado com o controle

### 5.7. Envolvimento do cálcio extracelular

As concentrações de 10, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$  reduziram a contração induzida pela da última concentração de  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$  a 100 mM), em  $92\pm 2\%$ ,  $93\pm 2\%$  e  $94\pm 2\%$ , respectivamente, quando incubados em solução de krebs despolarizante sem cálcio (60 mM KCl sem cálcio, e 1 mM de EGTA).

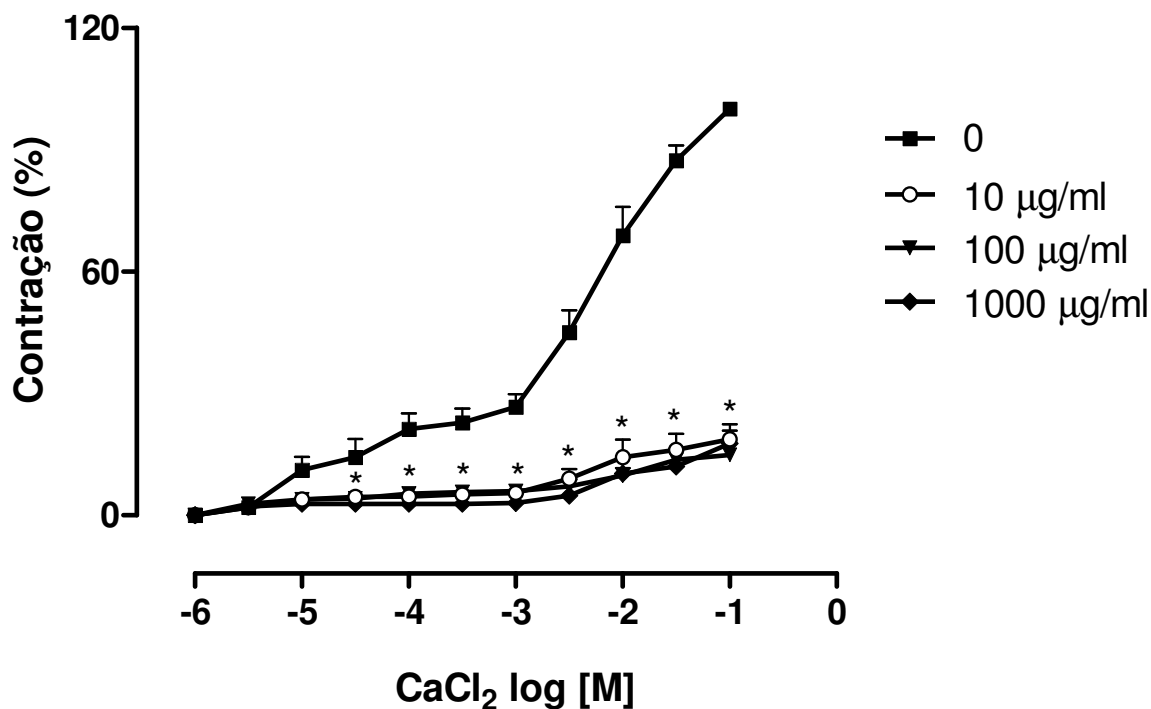


Figura 10. Efeito da fração DCM de *Gochnatia polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato contraídos por concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$  a 100 mM) antes e após a incubação do extrato em solução nutritiva despolarizante sem cálcio (60 mM). Resultados expressos como a média  $\pm$  erro ( $n=6$ ). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste  $t$  de bonferroni, onde  $*p < 0,001$ .

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram, pela primeira vez que, extrato e frações obtidos de *G. polymorpha* apresentam atividade vasorrelaxante e que o mecanismo de ação do extrato pode estar relacionado, pelo menos em parte, a ação sobre os canais de Cálcio. Sendo o efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato dependente da concentração, mas independente da integridade do endotélio do vascular. Além disso, os constituintes químicos presentes na fração DCM parecem ser os principais responsáveis pela ação vasorrelaxante induzida no músculo liso vascular de ratos, entretanto os dois compostos isolados nos estudos fitoquímicos não foram capazes de apresentar efeito biológico no modelo testado neste trabalho. Os resultados do presente estudo são relevantes uma vez que a *G. polymorpha* é uma espécie que compreende plantas amplamente utilizadas pela população no Brasil, embora relativamente poucos estudos científicos validem o uso popular desta planta.

A espécie *G. polymorpha*, conhecida popularmente como cambará, cambará-do-mato ou cambará-da-folha-grande tem seu chá utilizado na medicina popular para o tratamento da asma, bronquite crônica, e demais afecções do aparelho respiratório (MORS *et al.*,2000).

Estudos anteriores realizados por Moreira e colaboradores, (2000) demonstraram que os extratos e compostos isolados da *G. polymorpha* apresentaram fraca atividade antiedematogênica no edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Entretanto de Souza *et al.* 2009 corrobora e estende os conhecimentos a cerca do estudo do potencial antiinflamatório de extrato e fração butanólica de *G. polymorpha* ao mostrar marcante atividade antiinflamatória, inibindo a migração de leucócitos e exsudação protéica em modelos de inflamação induzida por carragenina na pleura e na pata.

Em relação à utilização da *G. polymorpha* para o tratamento de doenças cardiovasculares, verifica-se que não existem relatos ainda na literatura. Desta forma, nosso trabalho demonstra que o extrato etanólico de *G. polymorpha* (EBE) possui um efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos na presença ou na ausência de endotélio. Este protocolo com a aorta isolada é importante, pois permite avaliar a participação ou não do endotélio nos efeitos observados.

A contração da musculatura lisa está sob influência direta de uma diversidade de fatores endógenos como neurotransmissores (noradrenalina), peptídeos de síntese plasmática ou endotelial (angiotensina, endotelina), substâncias endoteliais não-peptídicas (NO, PGI<sub>2</sub>). Assim, nossas observações em aorta isolada indicam que o EBE de *G. polymorpha* apresentou importante efeito vasorrelaxante independente da presença do endotélio vascular.

Além da avaliação da atividade vasorrelaxante do EBE (figura 5), se tornou interessante avaliar também as frações obtidas a partir deste extrato que apresentou significativa atividade vasorrelaxante (figura 7, tabela 1). Assim como a fração DCM foi a que apresentou um maior relaxamento entre as frações, sendo de  $65,9 \pm 8,3$  na concentração de 3000 µg/ml a maior atividade vasorrelaxante observada isto nos sugeriu que os compostos responsáveis por esta atividade estariam nesta fração.

Após a confirmação do efeito do extrato e fração, e da faixa de concentrações em que atuaram foi investigado o mecanismo de ação intracelular responsável pelo efeito vasorrelaxante. Como o extrato e a fração foram capazes de promover relaxamento em anéis de aorta sem endotélio funcional, isto nos sugeriu uma possível ação sobre o cálcio dos estoques intracelulares, assim como o influxo do cálcio extracelular através de canais de cálcio de membrana (Hiraoka *et al*, 1968; Deth e Lynch, 1981; Nielsen e Arrigoni-Martelli, 1981; Saida e van Breemen, 1983; Yashiro e Duling, 2003).

A fração DCM do extrato, foi capaz de reduzir os efeitos contráteis do CaCl<sub>2</sub> em musculatura vascular de ratos e diminui a contração promovida pela fenilefrina em anéis de aorta mantidos em solução nutritiva desprovida de cálcio. Figuras 9 e 10.

Esses resultados nos sugerem que a fração DCM do extrato está de alguma maneira impedindo a mobilização do cálcio intracelular, assim como a utilização do cálcio extracelular através da membrana não permitindo a sua atuação na maquinaria contrátil (WEBB, 2003), este pode ser um dos mecanismos de atuação de vasorrelaxamento do extrato e fração de extrato da *G. polymorpha*, uma vez que o cálcio é importante na contração da musculatura lisa vascular. Para ativar o mecanismo contrátil é necessário um aumento global dos níveis de cálcio citoplasmático.

Neste contexto, o resultado obtido neste estudo nos fornece base farmacológica que demonstram os efeitos vasorrelaxante de extratos e frações obtidos de *G. polymorpha*.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que:

- O extrato etanólico da *G. polymorpha* induz relaxamento vascular;
- O relaxamento vascular promovido pelo EBE é independente do endotélio vascular;
- A *G. polymorpha* possui componentes químicos capazes de promover relaxamento vascular que provavelmente estão presentes na fração DCM-DCM;
- O mecanismo de vasorrelaxamento do extrato pode estar relacionado, pelo menos em parte, a ação sobre o Cálcio.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSENGE, E.; BUSSE, R.; POHL, U. Abluminal release and asymmetrical response of the rabbit arterial wall to endothelium-derived relaxing factor. **Circ Res**, v.61 (5 Pt 2): p.1168-73, 1987.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; HIRSCHMANN, G.S.; JAKUPOVIC, J.; DOMINGUEZ, X.A.; KING, R.M. E ROBINSON, H. Dimeric guaianolides and other constituents from *Gochnatia* species. **Phytochemistry**, v.25, n.5 p.1175-8, 1986.

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

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned And Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase. **Nature**, v.351, n.6329, p.714-718, 1991.

CABRERA, A.L.E.; KLEIN, R.M. **Compostas - tribo Mutisieae**, in Reitz, R. Flora Ilustrada Catarinense, 1973, p.1-124.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.** v.100, n.1-2, p.131- 4. 2005.

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

CATALAN, C.A.N.; VEGA, M.I.; LOPEZ, M.E.; CUENCA, M.R.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. Coumarins and a kaurane from *Gochnatia polymorpha* ssp *polymorpha* from Paraguay. **Biochem Syst Ecol.** v. 3, n. 417p.422. 2003

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

DE SOUZA, P.; LAPA, F.R.; STEFANELLO, M.E.A.; ZAMPRONIO, A.R.; KASSUYA, C.A.L. Avaliação do Efeito Antiinflamatório de *Gochnatia Polymorpha Ssp Floccosa* em Camundongos. 12<sup>o</sup> WorkShop de Plantas Medicinais. Dourados – MS, 2009

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

FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** v. 15, p. 381-391. 2005.

FARIAS, A.C.M.; SILVA, A.J.R.; TOMASSINI, T.C.B. Constituents of *Mochinea polymorpha*. **J Nat Prod.** v. 47, n. 363-364. 1984

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

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, v. 53, n. 5, p. 557-573, 1983.

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



GARAY, I. & B.F.S. DIAS, **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Editora Vozes. Petrópolis. p. 430, 2001.

GIULIETT, A M.; HAELRY,R. M.;QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.; BERG, C.V.D. Biodiversidade e conservação das plantas. **Megadiversidade**. v.1, n.1, 2005.

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

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

JAGGAR, J. H. Intravascular pressure regulates local and global Ca<sup>2+</sup> signaling in cerebral artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 281, p. C439–C448, 2001.

KOEHN, F. E. AND G. T. CARTER The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** v. 4, n. 3, p. 206-20. 2005

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

LAGAUD, G. J.; RANDRIAMBOAVONJY, V.; ROUL, G.; STOCLET, J. C.; ANDRIANTSITOHAINA. R. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. **Am J Physiol.**, v.276, p.H300-308, 1999.

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas de Brasil**, v.1., Editora Nova Odessa, São Paulo, 2002.

LUCKHOFF, A.; CLAPHAM, D. E. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel. **Nature**, 355(6358): 356-358, 1992.

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.

MOREIRA, A.S.; SPITZER V.; SCHAPOVAL E.E.S.; SCHENKEL, E.P.; Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytother Res**. v. 14, p. 638-640, 2000.

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

PRIVIERO, F. B. M. Mecanismo de ação de antagonistas de adrenoreceptores  $\beta$  na reatividade vascular em ratos. **Tese de doutorado Universidade Estadual de Campinas** – São Paulo, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup>.ed.;Rio de Janeiro: Editora Elsevier LTDA, 2007.

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**, v. 96, p. 19-30, 1983.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, v 9, n. 4- 5, p 281-296, 1983.

RATES SMK Plants as sources of drugs. **Toxicon**, Oxford v. 39, p. 603 613, 2001

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

REMILLARD, C. V.; ZHANGW, M.; SHIMODA, L. A.; SHAM, J. S. K. Physiological properties and functions of Ca<sup>2+</sup> sparks in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 283, p.L433–L444, 2002.

SACILOTTO, A.C.B.; VICHNEWSKI W, HERZ W. Ent-kaurene diterpenes from *Gochnatia polymorpha* var. *polymorpha*. **Phytochemistry**. v. 44, n. 6, p. 59-661, 1997

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STELEMANN, J.R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5° ed., Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 1998.

SOTODA, Y., Y. SHIMAZAKI. Nitric oxide-dependent and -independent inhibition by lipopolysaccharide of phosphoinositide hydrolysis in vascular smooth muscle. **Life Science** v.69, n.24, p. 2845-54, 2001

STEFANELLO, M.E.A. **Avaliação Estatística de Plantas Mediciniais: Química, Farmacologia e Sistemática**. Tese de doutoramento, Universidade de S.Paulo. 1993

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *fl occosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.16, n .4, p.525-530, 2006.

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

TERLUK, M. R., J. E. DA SILVA-SANTOS, ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** v.361, n.5, p.477-83, 2000

VANDEPUTTE, C., P., MCCORMICK A. Responsiveness to noradrenaline in aorta from wild-type, nitric oxide synthase-2, nitric oxide synthase-3 and alpha2A/D-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Pharmacol.** v.466, n.1-2, p. 129-36. 2003

VANHOUTTE, P. M.; EBER, B. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Wien Klin Wochenschr**, v.103, n.14, p. 405-411, 1991.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **The American Physiological Society**, v. 27, n. 4, p.1043-4046, 2003.

WEINHEIMER, G.; WAGNER, B.; OSSWALD, H. Interference of phorbol esters with endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. **Eur J Pharmacol**, v. 130, n.3, p.319-322, 1986.

WIER, W. G.; MORGAN, K.  $\alpha$ 1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v. 150, p. 91–139, 2003.