



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS UFRJ-MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA



Potencial farmacológico de *Kielmeyera membranacea* no sistema cardiovascular: investigação da atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas e frações

Bruno Meirelles Paes

Macaé
Maio de 2014

Bruno Meirelles Paes

Potencial farmacológico de *Kielmeyera membranacea* no sistema cardiovascular: investigação da atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas e frações

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico

Orientador (a): Prof^a Dr^a Juliana Montani Raimundo

Macaé

Maio de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Moacyr e Alba. Lembro-me que, ainda quando garoto, os incentivos aos estudos e à prática de atividades físicas sempre foram dados de maneira intensa, às vezes até pesada, mas hoje vejo que os resultados estão se tornando cada vez mais positivos. Enfim quem nunca ouviu que a prática de exercícios físicos melhora o desempenho escolar? Rrsrs. E claro, não posso deixar de agradecer o mais importante: O amor, aliado à confiança, que sempre tiveram e sei que continuarão tendo por mim.

Às minhas irmãs, mesmo que não pareça, digo que tiveram papel chave para a escolha da minha profissão e para a conclusão da mesma. Marina, a mais velha, é farmacêutica e começou a estudar apenas na faculdade. Pensei comigo “este curso deve ser bom... só agora que ela está estudando...”. Por outro lado, Liana, a mais nova, indiretamente me fez enxergar que eu acertaria na escolha de cursar farmácia. Quando mamãe estava cansada de explicar a matéria para ela, essa tarefa caía sobre mim, algumas vezes. E confesso, sempre gostei de ensinar geografia, química e biologia. Tudo fazia sentido, exceto a geografia.

Aos meus avós maternos, Wanilton e Alba, tenho mais do que agradecimentos.

Aos meus avós paternos, Herval e Maria Francisca, também tenho mais além de agradecimentos. Apesar de não ser muito próximo do meu avô e minha avó ter falecido antes do meu nascimento, construíram de maneira perfeita os pilares de suas famílias e, um desses pilares, é o meu pai.

Agradeço também aos meus tios, em especial ao “Paulinho”, “Teté” e à “Cida”, sempre sentindo felicidade ao vê-los.

Em um parágrafo especial agradeço ao meu tio/padrinho, Cláudio. Uma pessoa com um bom humor fora da média e sempre muito atencioso.

Agradeço também ao resto da família.

Ao pessoal/família do Laboratório, o meu muito obrigado. Primeiramente à Juliana Montani, minha segunda “mãe” que tive em Macaé. Com muita paciência, conhecimentos técnicos e um pouco mais de paciência me ensinou a amar o mundo das pesquisas, laboratório e aos ratinhos. Em segundo a Letícia Ferreira também com toda sua paciência e amizade. Em terceiro “empatam” a Amélia e Millena,

amigas que fiz. E claro, ao pessoal da nutrição, Elisaldo e Gustavo, sempre com conversas que animavam e tiravam o silêncio do laboratório.

Não posso deixar de agradecer aos professores também, principalmente aqueles que contribuíram de forma significativa para a minha formação. Dentre esses, em especial, mais uma vez Juliana Montani, Magdalena Rennó, Daniel Resende, William Andrioli, Edison Santana.

As amizades que construí na faculdade também foram importantíssimas para que eu pudesse concluir este ciclo. Sei que talvez, perderemos contato. É o ciclo da vida. Mas sempre me lembrarei de vocês e espero que não fique só na lembrança. Bruno Marques, Marcela Faria, Ambrósio, Thaíssa, Raphael Ferreira, Jéssica Ladeira, Jéssica Barbosa, William Andrioli, Thalita Braga, Alan Soares, o meu agradecimento.

Agradeço também aos colegas e amigos de turma, mesmo nos trancos e barrancos, aprendemos, principalmente, a nos respeitar no final do curso. Antes tarde do que nunca. E com o respeito, surgem o coleguismo e as amizades.

Ao Diego e menino Rey, também o meu agradecimento. Afinal além de dividirmos apartamento, dividimos histórias, risadas, zueiras, vodckas e amizade.

Por fim agradeço à Tia Lina. Cafezinhos e prosas quase todas as tardes durante 4 anos. Mesmo os alunos sendo proibidos de subirem no prédio da FUNEMAC, ela “batia o pé” e fazia questão da minha presença e a do Bruno Marques.

Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.

(Sócrates)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Taxas de mortalidade por DCVs e suas diferentes causas no Brasil em 2007.....	12
FIGURA 2: Mecanismo da vasodilatação causada pelo óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI ₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).....	17
FIGURA 3: Estrutura base de potentes agentes terapêuticos para o tratamento da aterosclerose.....	25
FIGURA 4: Em A, fotografia de <i>Kielmeyera membranacea</i> (Retirado de Herbário IAC – SP, 2014). Em B, mapa representativo do domínio fitogeográfico da espécie <i>K. membranacea</i>	25
FIGURA 5: Registros representativos do teste para avaliação da integridade do endotélio. Em A, aorta com endotélio e em B, aorta sem endotélio..	30
FIGURA 6: Registro típico da resposta contrátil a 10 µM de fenilefrina seguido da exposição a concentrações crescentes de <i>K. membranacea</i> em aorta com endotélio.....	32
FIGURA 7: Efeito vasodilatador de EKM em anéis de aorta com endotélio.....	33
FIGURA 8: Curva concentração-resposta para EKM em aortas sem endotélio e em aortas com endotélio na ausência e presença de L-NAME (100 µM) ou ODQ (10 µM).....	34
FIGURA 9: Efeito da fração hexânica (Fr Hex) do extrato etanólico de folhas de <i>K. membranacea</i> em anéis de aorta com endotélio.....	35
FIGURA 10: Efeito vasodilatador da fração diclorometância (Fr CH ₂ Cl ₂) do extrato etanólico de folhas de <i>K. membranacea</i> em anéis de aorta com endotélio.....	36
FIGURA 11: Efeito vasodilatador da fração em acetato de etila (Fr AcOEt) do extrato etanólico de folhas de <i>K. membranacea</i> em anéis de aorta com endotélio.....	37
FIGURA 12: Efeito vasodilatador da fração butanólica (Fr BuOH) do extrato etanólico de folhas de <i>K. membranacea</i> em anéis de aorta com endotélio.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inibitória média (CI ₅₀) e relaxamento máximo para o extrato etanólico de folhas de <i>K. membranacea</i> e suas frações.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

[Ca²⁺]_i – Concentração intracelular de Ca²⁺

AA – Ácido araquidônico

ACh – Acetilcolina

AcOEt – Acetato de etila

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico ou monofosfato de adenosina cíclico

ATP – Trifosfato de adenosina

AVE – Acidente Vascular Encefálico

AZT – Azidovudina

BH₄ – Tetrahydrobiopterina

BuOH – Butanol

CBC – Convenção da Diversidade Biológica

CEUA-CCS/UFRJ – Comissão de Ética com Animais de Experimentação do Centro de Ciências da Saúde

CI₅₀ – Concentração Inibitória média

DAG –Diacilglicerol

DCM – Diclorometano

DCV – Doenças Cardiovasculares

DIC – Doença isquêmica do coração

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRF – Fator Relaxante Derivado do Endotélio

EKM – Extrato etanólico de folhas de *Kielmeyera membranacea*

ET-1 – Endotelina-1

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMN – Flavina Mononucleotídeo

GCs – Guanilatociclase solúvel

GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

Hex – Hexano

IP – Receptor de prostaciclina

IP₃ – Inositol 1, 4, 5, trifosfato

LDL – “Low Density Lipoprotein” ou Proteína de baixa densidade

LaProN – Laboratório de Produtos Naturais

L-NAME – L-N^G-Nitroarginina metil éster

MeOH – Metanol

MLC – Cadeia leve de miosina

MLCK – Quinase de cadeia leve de miosina

MS – Metabólito secundário

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO – Óxido Nítrico ou “Nitric Oxide”

NOS – Óxido Nítrico Sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – Pressão arterial

PARNA da Restinga de Jurubatiba ou PNRJ – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

PGI₂ – Prostaciclina

Phe – Fenilefrina

PIP₂ – Fosfolídeos fosfatidilinositol bifosfato

PKA – Proteína cinase dependente de AMPc

PKC – Proteína cinase C

PKG – Proteína cinase dependente de GMPc

PLC – Fosfolipase C

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças cardiovasculares	12
1.2 Regulação do tônus vascular	13
1.3 Importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos....	19
1.4 Biodiversidade do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba: Espécie vegetal <i>Kielmeyera membranacea</i>	21
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	28
4.1 Material Vegetal.....	28
4.2 Obtenção do Extrato etanólico bruto e suas frações.....	28
4.3 Preparo dos anéis de aorta para registro de tensão isométrica	29
4.4 Avaliação do efeito vasodilatador do extrato bruto e suas frações.....	30
4.5 Investigação do envolvimento do endotélio e da via NO/GMPc no efeito vasodilatador	30
4.6 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Avaliação do efeito vasodilatador do EKM	32
5.2 Importância do endotélio e da via NO/GMPC para o efeito vasodilatador do EKM.....	33
5.3 Efeitos das frações de EKM no músculo liso vascular.....	35
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

Potencial farmacológico de *Kielmeyera membranacea* no sistema cardiovascular: investigação da atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas e frações

As doenças cardiovasculares são responsáveis por mais de 16 milhões de óbitos por ano em todo o mundo, sendo a hipertensão arterial sistêmica (HAS) o mais prevalente fator de risco para estas enfermidades. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação do efeito vasodilatador do extrato etanólico das folhas da planta *Kielmeyera membranacea*, bem como o efeito vasodilatador provocado pelas frações desta planta encontrada na Restinga de Jurubatiba. A atividade vasodilatadora do extrato e das frações (em acetato de etila, diclorometano, butanólica, hexânica e aquosa) foi investigada em aortas isoladas de ratos *Wistar* machos (220-280 g) e preparados para registro de tensão isométrica. A contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10 μ M de fenilefrina, seguida da exposição a concentrações cumulativas do extrato ou frações (1-100 μ g/mL). Foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio. Para investigação do mecanismo de ação, aortas com endotélio foram pré-tratadas durante 15 minutos com L-NAME (100 μ M) ou ODQ (10 μ M). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA/CCS-UFRJ, sob protocolo MACAÉ01. O extrato etanólico de *K. membranacea* provocou relaxamento de forma dependente da concentração em aortas com endotélio, com efeito máximo de 70,5 \pm 8,0% observado na concentração de 30 μ g/mL ($P < 0,05$, $n=6$). A concentração do extrato necessária para inibir em 50% a contratatura máxima induzida pela fenilefrina foi (CI_{50}) 3,2 \pm 0,2 μ g/mL. A remoção do endotélio inibiu completamente o efeito vasodilatador do extrato, assim como o pré-tratamento com L-NAME e ODQ. As frações diclorometânica, em acetato de etila e butanólica, na concentração de 30 μ g/mL, provocaram relaxamento de 7,5 \pm 1,8; 79,1 \pm 5,0 e 83,9 \pm 1,4% ($P < 0,05$, $n=4-5$) em aortas com endotélio, respectivamente. A fração hexânica não alterou significativamente a contratilidade do músculo liso vascular. A fração butanólica ($CI_{50} = 1,7 \pm 0,4$ μ g/mL; $P < 0,05$) foi mais potente que as outras frações (CI_{50} fração diclorometânica = 67,3 \pm 0,7 μ g/mL; CI_{50} fração acetato de etila = 11,3 \pm 2,3 μ g/mL) e que o extrato bruto. Portanto, o extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* provoca intenso relaxamento vascular dependente de endotélio e substâncias bioativas presentes na fração em acetato de etila e, principalmente, na fração butanólica parecem ser responsáveis pelo efeito vasodilatador do extrato bruto. O efeito vasodilatador é dependente do endotélio e parece ser mediado pela via NO/GMPc.

Palavras-chave: vasodilatação; aorta; doença cardiovascular; Restinga de Jurubatiba.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares

A cada ano cerca de 17,3 milhões de pessoas morrem em decorrência das doenças cardiovasculares (DCVs) e estima-se que esse número será de 23,6 milhões em 2030, representando assim um grave problema de saúde pública. Vale ressaltar que 80% das mortes ocasionadas pelas DCVs ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2013).

No Brasil, as DCVs são a principal causa de morte, sendo responsáveis por 315 mil óbitos anuais, e o país é uma das dez nações com maior índice de mortes por estas doenças (Figura 1). No estado do Rio de Janeiro, das 117.690 mortes registradas no ano de 2004, 29% estavam relacionadas às DCVs (SBC, 2014; SOCERJ, 2009).

As DCVs são causadas por desordens do coração e dos vasos sanguíneos como, por exemplo, distúrbios coronarianos, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, doença cardíaca congênita e insuficiência cardíaca. A razão mais comum para essas desordens é o acúmulo de gordura depositada nas paredes internas dos vasos sanguíneos que irrigam o coração e o cérebro (WHO, 2013).

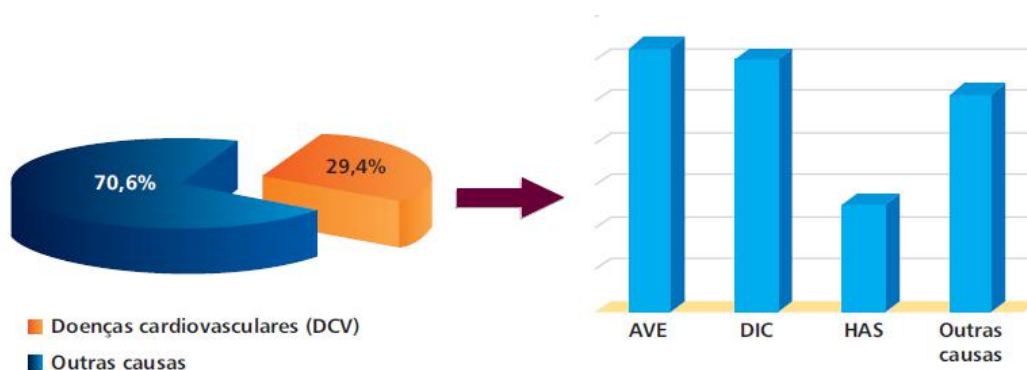


Figura 1. Taxas de mortalidade por DCVs e suas diferentes causas no Brasil, em 2007. AVE, acidente vascular encefálico; DIC, doença isquêmica do coração; HAS, hipertensão arterial sistêmica (Retirado de Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Os principais fatores de risco para as DCVs são a hipertensão arterial sistêmica (HAS), o diabetes, a hipercolesterolemia, o estresse, a obesidade, além de fatores comportamentais, como má alimentação, sedentarismo, tabagismo e o uso constante e abusivo de álcool (STAPLETON *et al.*, 2008; WHO, 2013).

A HAS está entre as doenças crônicas não transmissíveis mais comuns atualmente, sendo caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), estando frequentemente associada a alterações funcionais e estruturais do coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos. A HAS é definida por pressão sanguínea sistólica igual ou superior a 140 mmHg e/ou a pressão diastólica superior ou igual a 90 mmHg em medidas de consultório. A HAS é classificada como uma doença multifatorial decorrente da ação combinada de fatores ambientais, genéticos e comportamentais e é responsável por aproximadamente 9,4 milhões de morte por ano no mundo e estima-se uma prevalência acima de 30% no Brasil (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010; BOLÍVAR *et al.*, 2013).

1.2. Regulação do tônus vascular

Em condições fisiológicas, diversos mecanismos que regulam o tônus vascular atuam de forma ao organismo funcionar em homeostase, ou seja, em equilíbrio. Entre eles cita-se o sistema nervoso autônomo, o sistema renina - angiotensina - aldosterona e o endotélio vascular.

Os efeitos vasculares dos sistemas vasoconstritores e vasodilatadores são mediados, principalmente, por mudanças na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (KUNES *et al.*, 2004). Para entender melhor esses mecanismos, conhecer a histologia da parede vascular se faz necessário.

A parede vascular das artérias é constituída por 3 camadas distintas, a camada adventícia, a camada média e a camada íntima. A camada adventícia é a mais externa da parede vascular e em artérias de grande calibre é possível encontrar vasos sanguíneos, denominados *vasa vasorum*, que fornecem nutrientes e oxigênio à camada média. A camada média por sua vez, é a mais espessa, sendo composta basicamente por células musculares lisas e elastina. Esta camada exerce importante papel na fisiologia vascular, pois é responsável pela constrição e dilatação dos vasos. Por fim, a camada íntima, está em contato direto com o sangue e é composta por uma única camada de células endoteliais, responsáveis por

sintetizar e liberar mediadores relacionados à homeostase vascular (GUYTON & HALL, 2011).

Ao se tratar da contração do músculo liso vascular há duas formas essenciais de excitação que iniciam este processo: a despolarização do potencial de repouso da membrana (acoplamento eletromecânico) e a ativação de receptores por agonistas (acoplamento fármaco-mecânico) (ORALLO, 1996).

O componente elétrico de excitação das células musculares lisas é representado por potenciais de ação, os quais provocam influxo de Ca^{2+} extracelular através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L. O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ também ocorre por meio da liberação desses íons das reservas intracelulares do retículo sarcoplasmático. O acoplamento fármaco-mecânico ocorre através da ativação de receptores de membrana, como os receptores adrenérgicos α_1 , que levam ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da sensibilidade do aparelho contrátil ao Ca^{2+} . A ativação de receptores de membrana acoplados à proteína Gq promove a ativação da fosfolipase C (PLC), resultando na hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), enquanto o IP_3 provoca a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (OGUT & BROZOVICH, 2003; ORALLO, 1996). O cálcio liberado a partir dos estoques intracelulares ou oriundo do meio extracelular liga-se à calmodulina, ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), a qual fosforila a cadeia leve da miosina, resultando na interação da miosina com os filamentos de actina e contração do músculo liso vascular (ORALLO, 1996).

Em contraste aos mecanismos contráteis, os mecanismos de relaxamento vascular envolvem a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a desfosforilação da cadeia leve da miosina pela miosina fosfatase.

O endotélio vascular tem papel essencial na regulação da contratilidade vascular. A sua ampla distribuição, podendo abranger 1000 m², sua localização estratégica e sua sensibilidade ao fluxo e à pressão sanguínea favorecem este órgão a desempenhar suas funções reguladoras e moduladoras do tônus vascular (FURGHGOTT & VANHOUTTE, 1989).

As células endoteliais são capazes de produzir e liberar diversas substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras para a manutenção da homeostase vascular,

sendo as principais substâncias vasoconstritoras a endotelina-1 (ET-1) e o tromboxano A_2 (COELHO *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2009).

Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram um fator derivado do endotélio de extrema importância na regulação do tônus e manutenção da homeostasia vascular, sendo este um potente vasodilatador denominado de óxido nítrico (NO). Este gás desempenha funções essenciais na regulação da PA e na prevenção contra a aterosclerose, na inibição da adesão e ativação de plaquetas e leucócitos, na distribuição do fluxo sanguíneo e na inibição da proliferação das células musculares lisas. Outros vasodilatadores liberados pelo endotélio são a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (ZAGO & ZANESCO, 2006; FURGHGOTT & VANHOUTTE, 1989).

A NO sintase endotelial (eNOS) é a enzima responsável pela biotransformação da L-arginina à NO e citrulina. Esta enzima pode ser ativada por diversos receptores acoplados à proteína G, pela força de cisalhamento, por ionóforos de cálcio e pode até ter sua transcrição induzida a partir de estimulação hormonal, como por exemplo, por estrógenos. A ativação da eNOS envolve o acoplamento ao complexo Ca^{2+} /calmodulina, aliado à presença de co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida (NADPH), oxigênio (O_2), tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

O NO, por ser um gás solúvel, difunde-se para o músculo liso vascular atuando de duas formas para promover a sua ação vasodilatadora (FURGHGOTT & VANHOUTTE, 1989). A primeira envolve a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), aumentando os níveis de guanosina 3, 5-monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez ativa a quinase dependente de GMPc (PKG) (Figura 2). Esta quinase leva a redução da $[Ca^{2+}]_i$ através de diversos mecanismos: inibição do influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L; aumento do efluxo de Ca^{2+} através da ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} e da ativação da Na^+/K^+ ATPase; ativação da bomba Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, aumentando o sequestro de Ca^{2+} ; e ativação de canais de K^+ levando a hiperpolarização da membrana (LUCAS *et al.*, 2000). A outra via de relaxamento vascular a partir do NO é através da ação direta em canais de K^+ , independente da ativação da GCs (VANHOUTTE, 2004).

A PGI₂ tem um papel importante no reforço da vasodilatação e na supressão da adesão de células sanguíneas e plaquetas, sendo, portanto, importante na prevenção da aterosclerose e na formação de trombos. A PGI₂ promove relaxamento vascular através da ativação de receptores IP acoplados à proteína Gs, presentes nas membranas da musculatura lisa vascular, tendo como resposta a ativação da adenilato ciclase com conseqüente aumento na concentração citosólica de adenosina 3, 5-monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a quinase dependente de AMPc (PKA). Esta quinase promove redução da [Ca²⁺]_i e da sensibilidade do aparelho contrátil ao Ca²⁺, além da PGI₂ também poder induzir a hiperpolarização da célula muscular lisa através da ativação de canais de K⁺ sensíveis à ATP (Figura 2) (PARKINGTON, 2004).

O EDHF também promove relaxamento da musculatura lisa vascular através da ativação de canais de K⁺ e conseqüente hiperpolarização da membrana celular (Figura 2), embora outros mecanismos ainda não conhecidos possam estar envolvidos (BRYAN *et al.*, 2005). Ressalta-se ainda que a vasodilatação ocasionada pelo EDHF é observada sem o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc. Ainda não se sabe ao certo a identidade química do EDHF, porém alguns estudos apontam os ácidos epoxieicosatrienólicos e moléculas como o monóxido de carbono e peróxido de hidrogênio como candidatos (VANHOUTTE, 2004).

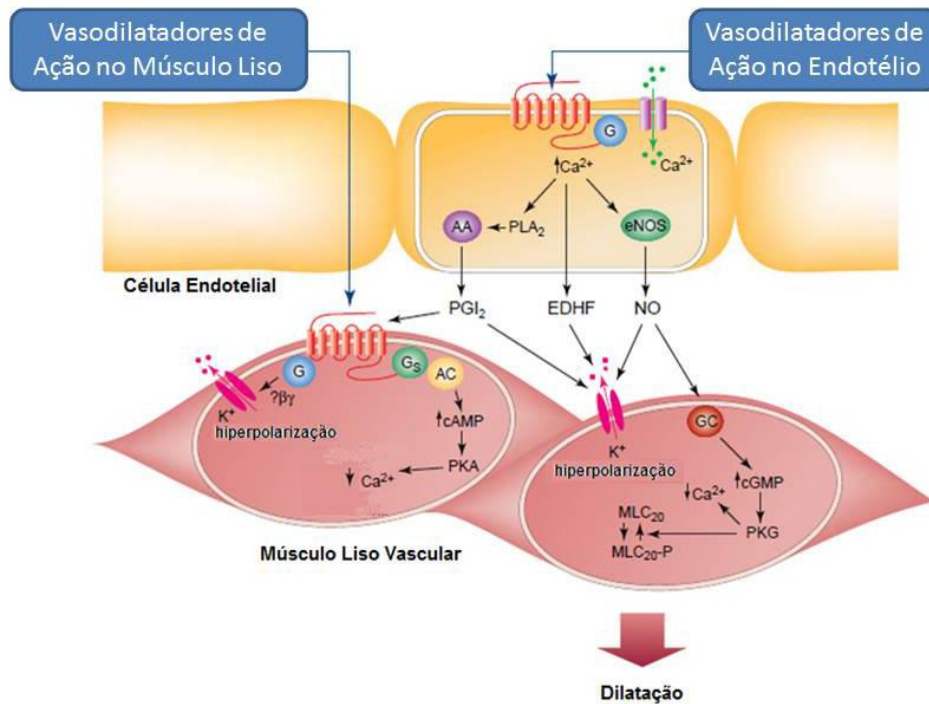


Figura 2: Mecanismo da vasodilatação causada pelo óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). AA, ácido araquidônico; PLA_2 , fosfolipase A_2 ; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; PKA, proteína quinase dependente de AMPc; AC, adenilato ciclase; GC, guanilato ciclase; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; PKG, proteína quinase dependente de GMPc; MLC, cadeia leve da miosina. (Modificado de MAGUIRE e DAVENPORT, 2005).

Além da resposta vasodilatadora observada através da ação dos fatores relaxantes derivados do endotélio, há também substâncias que atuam de forma direta na camada média vascular, ou seja, na musculatura lisa, levando à vasodilatação. São eles os fármacos bloqueadores de canais de Ca^{2+} do tipo L e os fármacos agonistas dos canais de K^+ . Os bloqueadores dos canais de Ca^{2+} do tipo L ligam-se à subunidade α_1 do canal, o que impede sua abertura, reduzindo a entrada de Ca^{2+} bem como a excitabilidade e contratilidade vascular. Como descrito anteriormente, a abertura dos canais de K^+ tem como resposta final a hiperpolarização da membrana celular devido a saída de K^+ do meio intracelular para o meio extracelular, com conseqüente relaxamento vascular (RANG & DALE, 2007; SOBEY, 2001).

Em condições fisiológicas há um equilíbrio preciso entre a produção e liberação tanto dos fatores vasoconstritores quanto dos fatores vasodilatadores. A atenuação dos efeitos vasodilatadores, como por exemplo, a redução da biodisponibilidade do NO, aliada ao aumento da produção dos fatores contráteis derivados do endotélio altera o equilíbrio hemodinâmico, sendo então caracterizada a disfunção endotelial. Esta disfunção favorece a ocorrência de vasoespasmos, trombooses, penetração de macrófagos, crescimento celular e reações inflamatórias que levam à aterosclerose (VANHOUTTE, 2004). A disfunção endotelial pode ser observada na HAS bem como em várias DCVs (DAVEL *et al.*, 2011).

Alguns mecanismos são propostos para explicar a disfunção endotelial, como a diminuição da liberação e a diminuição da sensibilidade da musculatura lisa aos fatores relaxantes derivados do endotélio, a disfunção na via de transdução de sinal dos fatores relaxantes endoteliais e o aumento na produção dos fatores contráteis derivados do endotélio (CARVALHO *et al.*, 2001). Outro mecanismo, porém não menos relevante, é a redução da biodisponibilidade de NO devido ao estresse oxidativo, o qual tem papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose e da HAS.

O estresse oxidativo é caracterizado por um desbalanço entre a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade dos mecanismos antioxidantes. As ROS são derivadas principalmente da NADPH oxidase, principal fonte de ânion superóxido (O_2^-) e da eNOS na sua forma desacoplada. O desacoplamento da eNOS ocorre em geral por déficit do substrato L-arginina ou de co-fatores, em particular, o BH_4 , processo que resulta no aumento de produção de peroxinitrito. Além disso, as ROS medeiam a ação vasoconstritora de hormônios, como por exemplo, endotelina (ET-1) e angiotensina II (RODRIGO *et al.*, 2013; STAPLETON *et al.*, 2008; KUNES *et al.*, 2004). Todos esses efeitos negativos originados do estresse oxidativo contribuem de forma significativa para a disfunção endotelial.

Os dados descritos acima indicam que as pesquisas pela busca de novas substâncias que atuem na regulação do tônus vascular e que corrijam e/ou previnam a disfunção endotelial são de extrema importância para o desenvolvimento de novas alternativas para o controle e prevenção das DCVs.

1.3. Importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos

Desde tempos imemoriais os povos primitivos já buscavam na natureza o alívio e a cura de doenças visando à manutenção da saúde. Com o passar dos anos, aliado aos avanços do conhecimento e tecnológico, descobriu-se que os produtos naturais representam fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo as plantas, as bactérias, os fungos, os insetos e os organismos marinhos, as principais (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

A maior parte dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foi desenvolvida por síntese química planejada a partir de seus derivados. Segundo revisão publicada por NEWMAN & CRAGG (2012), 1130 fármacos foram obtidos a partir de produtos naturais e seus derivados no período compreendido entre 1981 e 2010. Ressalta-se ainda o sucesso e a importância da química de produtos naturais na obtenção dessas substâncias. Como exemplos de fármacos oriundos de produtos naturais destacam-se a morfina (*Papaver somniferum*) e a azidovudina (AZT), esta última descoberta a partir das propriedades identificadas em nucleosídeos isolados de algas (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Entre os produtos naturais que serviram de fonte para a descoberta de fármacos utilizados no tratamento das doenças do sistema cardiovascular destacam-se a digoxina (isolada da espécie vegetal *Digitalis purpurea*), as estatinas (oriundas de fungos), o captopril (obtido do veneno de cobra jararaca *Jathropus jararaca*), o ácido acetilsalicílico (obtido a partir do salicina isolada da espécie vegetal *Salix alba*) e a reserpina (isolada da espécie vegetal *Rauwolfia serpentina*) (BUTLER, 2004; JUNIOR *et al.*, 2006).

O reino vegetal se destaca pelo importante papel na descoberta e desenvolvimento de fármacos, sendo considerado como um dos pilares da farmacoterapia. Porém vale a pena comentar que a variedade de moléculas, bem como suas complexidades químicas e estruturais particulares, inviabiliza a síntese de grande parte delas (JUNIOR *et al.*, 2006).

Segundo KENNEDY & WIGHTMANN (2011) é notável que as plantas vivam em seus microambientes particulares extremamente ricos em substâncias químicas, favorecendo, em termos evolutivos, a seleção natural de espécies fitoquímicas, ou

seja, de metabólitos secundários ou especiais, como também são conhecidos. Ao contrário dos metabólitos primários, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas, os metabólitos secundários desempenham uma série de funções protetoras, de defesa e podem gerenciar o relacionamento interplantas. Além dessas funções, os metabólitos secundários também modificam a relação entre as plantas e os organismos mais complexos, como por exemplo, herbívoros, no chamado papel de deterrência onde muitas substâncias são amargas e/ou tóxicas, atuando como agonistas ou antagonistas do sistema neurotransmissor ou formando análogos estruturais de hormônios endógenos (BARREIRO & BOLZANI, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2002).

Além dos metabólitos secundários estarem associados a inúmeras funções biológicas diretamente relacionadas à sobrevivência das plantas no meio ambiente, são responsáveis pelos efeitos terapêuticos das plantas medicinais e de grande importância para o desenvolvimento de fármacos.

Entre os metabólitos com destaque para ações no sistema cardiovascular estão as substâncias fenólicas, as quais representam um grupo heterogêneo de metabólitos secundários que são amplamente presentes na dieta humana, principalmente provenientes de alimentos e bebidas derivados de plantas, como frutas, nozes, chás e vinhos (CURIN & ANDRIANTSITOHAIANA, 2005). A característica química dessas substâncias é a presença de um ou mais anéis aromáticos ligados ao menos por um radical hidroxila e/ou outros substitutos, podendo ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

As propriedades bioativas das substâncias fenólicas incluem atividade antioxidante e de eliminação de radicais livres; modulação da produção de NO a partir do endotélio vascular, interferindo com mecanismos que possam levar a inflamação e apoptose das células endoteliais, contribuindo então, para a prevenção da disfunção endotelial; atividade anti-inflamatória; e atividade vasodilatadora. Entre os constituintes deste destacam-se os flavonoides, representando mais da metade das substâncias fenólicas (POURREZA, 2013; CURIN & ANDRIANTSITOHAIANA, 2005).

Baseado em estudos com modelos animais e em dados epidemiológicos, é possível afirmar que a ingestão diária e contínua de flavonoides está associada à redução do risco de DCVs, relacionada a seus efeitos protetores antitrombótico, anti-

isquêmico, antioxidante e vasorelaxante (KHALIL & SULAIMAN, 2010; MIDDLETON *et al.*, 2000; JENDEKOVA *et al.*, 2006).

1.4. Biodiversidade do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba: espécie vegetal *Kielmeyera membranacea*

O Brasil é reconhecido internacionalmente como detentor da maior biodiversidade do mundo, abrigando, segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (DCB), entre 15 a 20 % de toda biodiversidade mundial, além de ser o país com o maior número de espécies endêmicas (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Essa enorme biodiversidade do Brasil pode ser considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, tornando-se necessária a preservação e o avanço das pesquisas científicas para a descoberta de novos candidatos a fármacos.

No norte do estado do Rio de Janeiro, englobando áreas dos municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã, está situado o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA da Restinga de Jurubatiba). O PARNA da Restinga de Jurubatiba foi criado em 1998 e é a maior área de restinga pertencente a uma Unidade de Conservação no Estado, abrangendo uma área total de 148,6 km², sendo 44 km de praias e 18 lagoas (ICMBIO, 2014).

A restinga é considerada um bioma litorâneo e sua formação vegetal compreende florestas, moitas e campos que crescem sobre as planícies arenosas costeiras. Devido às condições ecológicas deste bioma, a colonização de grande parte das espécies vegetais terrestres é imposta a um árduo processo de seleção natural, tendo em vista as grandes amplitudes de temperatura, os períodos de seca, os ventos constantes carregados com sal, fenômeno denominado “spray” marinho, os elevados níveis de salinidade do substrato arenoso e a pronunciada escassez de nutrientes (ESTEVES, 2011).

Muitas espécies vegetais são encontradas no PARNA da Restinga de Jurubatiba e algumas delas apresentam atividades biológicas já descritas, como a *Eugenia uniflora* (pitanga), com propriedades antifúngica, antioxidante e hipotensora (CARVALHO *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2013; CONSOLINI & SARUBBIO, 2002); *Byrsonima sericea* (murici), utilizada com finalidade de proteção gástrica (RODRIGUES *et al.*, 2012); *Anacardium occidentale* (cajueiro) com propriedade

antioxidante (LIMA *et al.*, 2014); e *Schinus terebinthifolius* (aroeira), apresentando atividades antiparasitária, antidepressiva, antimicrobiana e antioxidante (MORAIS *et al.*, 2014; PICCINELLI *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2013; MASSRY *et al.*, 2009). Algumas espécies são utilizadas com a finalidade de paisagismo como é o caso dos abaneiros, conhecido popularmente como manga – da – praia (*Clusia hilariana*), cactos (*Melocactus violaceus*), lírio azul (*Neomarica caerulea*) e de trepadeiras (*Mandevilla moricandiana*) (ESTEVES, 2011).

A espécie selecionada para este trabalho foi a *Kielmeyera membranacea*, pertencente à ordem Malpighiales, família Calophyllaceae, gênero *Kielmeyera*. Esta ordem é uma das maiores e mais diversas do clado das rosídeas e inclui o grupo dos clusióides, representado pelas famílias Clusiaceae, Calophyllaceae, Bonnetiaceae, Hypericaceae e Podostemaceae (RUHFEL *et al.*, 2011).

Os gêneros da família Calophyllaceae são de ampla distribuição, sendo frequentemente encontrados nas Américas Latina e Central, além de na África Central e Ásia (MOBOT, 2014). Já foram identificados 14 gêneros e aproximadamente 476 espécies pertencente a esta família no mundo (WURDACK e DAVIS, 2009). No Brasil, já foram catalogados 8 gêneros - *Calophyllum* L., *Caraipa* Aubl., *Clusiella* Planch & Triana, *Haploclathra* Benth., *Kielmeyera* Mart. & Zucc., *Mahurea* Aubl., *Marila* Sw. e *Neotatea* Maguire- e 81 espécies, sendo 59 endêmicas (REFLORA, 2014).

Entre as atividades biológicas já estudadas para espécies de gêneros da família Calophyllaceae encontrados no Brasil, citam-se o tratamento de lesões cutâneas provocadas por leishmaniose (*Calophyllum inophyllum*), atividades anti-ulcerosa (*Calophyllum brasiliense*), antibiótica (*Kielmeyera variabilis*) e antiinflamatória (*Haploclathra paniculata*), além de efeitos citotóxicos (TIUMAN *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2012; LEMOS *et al.*, 2012; SUFFREDINI *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2014). Já foram descritas atividades protetoras contra a disfunção endotelial de espécies não encontradas no Brasil, como a *Mammea neurophyllae* *Calophyllum flavoramulum*, pelo mecanismo de inibição da formação dos produtos finais da glicação avançada (DANG *et al.*, 2014; FERCHICHI *et al.*, 2012).

O gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul, sendo a maior parte das 47 espécies descritas na literatura encontradas exclusivamente no Brasil (SADDI, 1982). É amplamente encontrado em todas as regiões do país, principalmente na

região sudeste, e em diversos domínios fitogeográficos, como na floresta Amazônica, em cerrados, caatingas e Mata Atlântica (restinga) (REFLORA, 2014).

Na medicina popular, muitas espécies do gênero *Kielmeyera* são utilizadas no tratamento de diversas doenças tropicais, como malária, esquistossomose, leishmaniose e infecções fúngicas e bacterianas (ZAGOTO *et al.*, 2006). Cita-se também que algumas espécies deste gênero já foram estudadas quanto à sua atividade biológica, destacando as espécies *K. coriacea*, *K. variabilis*, *K. aureovinosa*, *K. neglecta* e *K. rugosa*.

A espécie *K. coriacea* é relatada por ter um potencial antidepressivo, visto que o extrato hidroalcoólico do caule, inibe a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (OBICI *et al.*, 2008). Estudos sugerem que a fração em diclorometano do caule de *K. coriacea* pode ser uma importante alternativa terapêutica no tratamento de transtornos da ansiedade e do pânico (BIESDORF *et al.*, 2012). O extrato etanólico e a fração ciclohexânica desta espécie também apresentaram atividades antioxidante e antifúngica contra *T. rubrum* (AQUINO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009). O fracionamento cromatográfico das frações mais potentes da espécie *K. variabilis* conduziu à identificação de 3 flavonoides com atividade antioxidante (COQUEIRO *et al.*, 2013). Os extratos das espécies *K. aureovinosae* e *K. neglecta* (extrato etanólico e fração em acetato de etila) apresentaram atividade antibiótica e citotóxica, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012), e a fração em diclorometano da espécie *K. rugosa* demonstrou atividade antitumoral sem substancial toxidez (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

As espécies do gênero *Kielmeyera* também têm sido estudadas quanto a sua composição química, marcada caracteristicamente pela presença de xantonas e cumarinas. Também já foram isolados antraquinonas, triterpenos, esteroides e flavonoides glicosídicos (NOGUEIRA *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2009).

Algumas substâncias já foram isoladas, como por exemplo, 4-alquilcumarinas, 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas, sendo estas duas últimas extraídas de folhas de *K. rugosa* (NOGUEIRA *et al.*, 2009). A composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* também varia de acordo com o ambiente em que se localiza, onde em espécies encontradas no cerrado a classe das xantonas predomina e, por outro lado, em espécies de restinga predominam 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas (SOBRAL *et al.*, 2009).

Em estudos com animais, as atividades biológicas e farmacológicas das xantonas já tem sido demonstradas, inclusive com efeitos benéficos em algumas DCV, incluindo isquemia, aterosclerose, HAS e trombose. Atividades antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica e vasorelaxante já são consideradas efeitos protetores provocados por essas substâncias contra as DCV. Ressalta-se, em particular, que o antagonismo dos inibidores endógenos da NOs provocado pelas xantonas pode representar a base para a melhoria da função endotelial (DE – JIAN *et al.*, 2004).

Já foram descritas também, atividades farmacológicas das cumarinas, como por exemplo, ações antioxidante, antiplaquetária, antiinflamatória e hipotensiva (FARZAEI *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por DANG *et al.*, 2014, tanto o extrato metanólico quanto a fração em diclorometano do caule da espécie *Mammea neurophylla*, demonstraram atividade, *in vitro*, de prevenção da inflamação em células endoteliais com redução da vasoconstrição e o fracionamento conduziu ao isolamento da 4-fenil- e 4-(1-acetoxipropil) cumarinas como potentes inibidores da formação de produtos finais de glicação avançada (DANG *et al.*, 2014). Ressalta-se ainda que uma série de potentes inibidores da colesterol aciltransferase, potentes agentes terapêuticos para o tratamento da aterosclerose, tem em sua base a 4-fenilcumarina (OGINO *et al.*, 2011) (Figura 3).

A espécie *Kielmeyera membranacea*, objeto deste estudo, é endêmica do Brasil, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, sendo seu domínio fitogeográfico a Mata Atlântica, em especial a Restinga (REFLORA, 2013) (Figura 4). Para esta espécie ainda não há relatos na literatura sobre suas propriedades químicas e biológicas, tornando então, este estudo pioneiro em relação à atividade biológica desta espécie, com ênfase na atividade vasodilatadora.

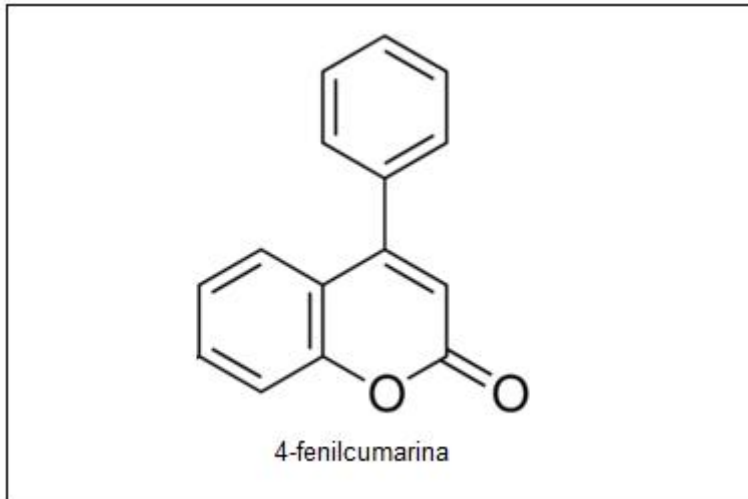


Figura 3: Estrutura base de potentes agentes terapêuticos para o tratamento da aterosclerose.

A



B



Figura 4. Em A, fotografia de *Kielmeyera membranacea* (Retirado de Herbário IAC – SP, 2014). Em B, mapa representativo do domínio fitogeográfico da espécie *K. membranacea* (Retirado de Flora do Brasil, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

As DCVs são a primeira causa de morte no mundo, constituindo assim um grave problema de saúde pública. Estas doenças, assim como fatores de risco como HAS, obesidade e diabetes, são caracterizadas pela presença de alterações vasculares, as quais têm um importante papel fisiopatológico. Portanto, é de grande interesse a descoberta de novas substâncias que possam prevenir e/ou tratar as disfunções vasculares relacionadas às DCVs.

O Brasil, com toda sua biodiversidade e, em especial o estado do Rio de Janeiro, com sua localização geográfica privilegiada, tornam-se promissoras fontes para a descoberta de novas substâncias de origem natural. Na região norte deste estado, localiza-se a Restinga de Jurubatiba com inúmeras espécies já catalogadas, como é o exemplo da *Kielmeyera membranacea*, espécie selecionada para ser estudada quanto aos seus efeitos vasculares. Não há relatos na literatura, até o presente momento, sobre atividades biológicas desta espécie, porém há estudos que comprovam atividade antioxidante de outras espécies do gênero *Kielmeyera*. Além disso, o *screenig* de vários extratos de plantas presentes no PARNA da Restinga de Jurubatiba quanto aos efeitos no músculo liso vascular, realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa, mostrou que a espécie vegetal *Kielmeyera membranacea* apresenta potencial atividade vasodilatadora (FERREIRA, 2013).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Investigar os efeitos vasculares do extrato etanólico e frações das folhas de *K. membranacea*.

Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito vasodilatador do extrato etanólico das folhas de *K. membranacea*.
- Determinar a importância do endotélio vascular para o efeito do extrato, assim como a participação da via NO/GMPc.
- Avaliar os efeitos das frações do extrato etanólico de folhas de *K. membranacea*, a fim de sugerir as classes de substâncias responsáveis pelo efeito vascular do extrato bruto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório Integrado de Pesquisa, Pólo Universitário. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética com Animais de Experimentação do Centro de Ciências da Saúde (CEUA/CCS) da UFRJ, sob protocolo MACAÉ01. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura e umidade controladas, em um ciclo de 12h/12h claro/escuro e água e ração foram disponibilizadas sem restrição.

4.1. Material vegetal

Folhas da espécie *Kielmeyera membranacea* foram coletadas no PARNA de Jurubatiba no município de Carapebus – RJ (22°16'S/41°39'W). A coleta e a identificação botânica foram realizadas pela Prof^a. Dr^a. Tatiana Ungaretti Paleo Konno e uma exsicata foi deposita no Herbário do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (RFA38752).

4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto e suas frações

Todos os extratos e frações utilizados nos experimentos foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais (LaProN), Campus UFRJ-Macaé.

Após a seleção do material, este foi pesado e seco em estufa com circulação de ar com temperatura ajustada para 40 °C, a fim de evitar reações de hidrólise e/ou crescimento bacteriano. A secagem foi considerada completa quando o peso da amostra se tornou constante. As folhas de *K. membranacea* foram pulverizadas em liquidificador convencional, aumentando assim a área de superfície de contato para o processo de extração.

Foram pesados 426,64 g de folhas secas para a obtenção do extrato bruto de *K. membranacea* (EKM). Para o processo de maceração e rotaevaporação foram utilizados apenas 50,35 g de folhas de *K. membranacea*, previamente secas e pulverizadas, utilizando-se etanol absoluto como solvente, em temperatura ambiente. As frações do extrato bruto foram obtidas através de partição líquido-líquido utilizando solventes com polaridade crescente: hexano PA (Hex), diclorometano PA (CH₂Cl₂), acetato de etila PA (AcOEt) e butanol PA (BuOH). Foram utilizados 6,19 g do EKM ressuspendido em 100 ml de metanol-água (MeOH:H₂O) 9:1.

4.3. Preparo dos anéis de aorta para registro de tensão isométrica

Ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 280 g, foram eutanasiados através do deslocamento cervical após a administração de anestésico geral. A porção torácica da aorta foi retirada e transferida imediatamente para uma cuba contendo solução de Krebs-Henseilet com pH 7,4 (em mM: NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11) para dissecação, ou seja, remoção do tecido conjuntivo adjacente. A aorta então foi cortada em cilindros de aproximadamente 3 mm de comprimento para a obtenção dos anéis aórticos, que foram posicionados em cubas verticais de 10 mL preenchidas com a mesma solução de Krebs-Henseilet, continuamente oxigenada por uma mistura carbogênica composta de 95% de O_2 e 5% de CO_2 , à uma temperatura constante de 37 °C. Uma das extremidades do tecido era conectada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments), e os sinais gerados eram digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise através do programa LabChart Pro (ADInstruments). Durante o período de estabilização da preparação, 90 minutos, a solução nutritiva era substituída nos tempos de 20, 40 e 60 minutos. Após o período de equilíbrio, a integridade do endotélio vascular era verificada a partir da contratatura induzida pela fenilefrina (Phe; 10 μM) seguida da adição de 10 μM de acetilcolina (ACh; 10 μM). O endotélio foi considerado íntegro quando o relaxamento em resposta à ACh foi igual ou superior a 80%. Em alguns experimentos foi realizada a remoção mecânica do endotélio utilizando-se uma cânula, sendo confirmada pela ausência de relaxamento (ou inferior 10%) frente à ACh (Figura 5).

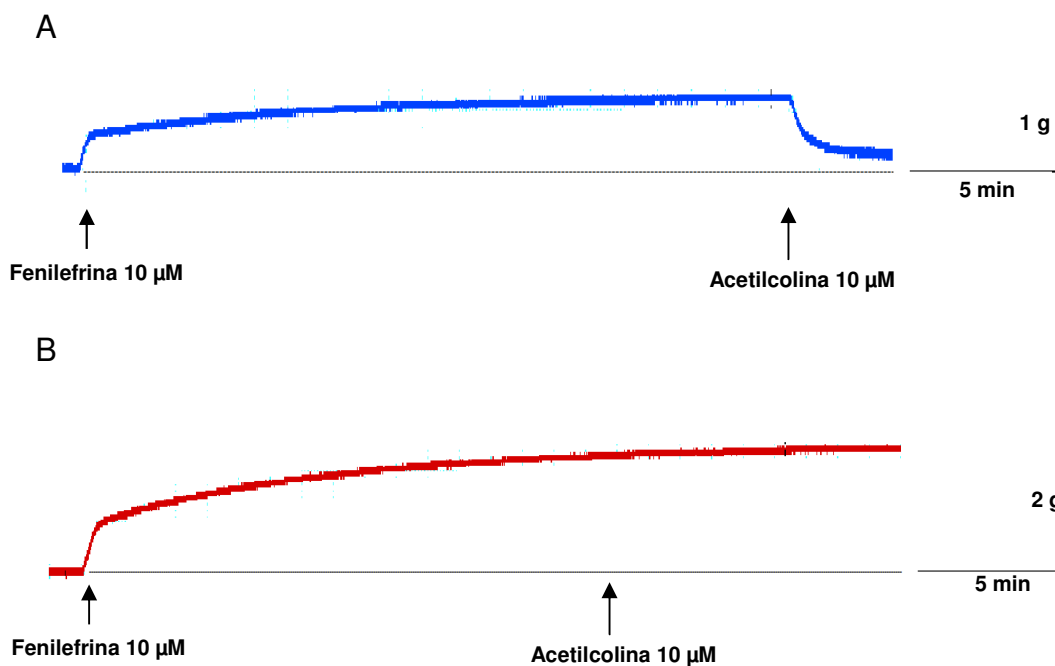


Figura 5: Registros representativos do teste para avaliação da integridade do endotélio. Em A, aorta com endotélio e em B, aorta sem endotélio.

4.4. Avaliação do efeito vasodilatador do extrato bruto e de suas frações

O EKM e suas frações foram solubilizados em DMSO, em soluções estoques de 10 e 50 mg/mL. Em estudo controle realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa, foi possível observar que este solvente não alterou a atividade vascular na concentração máxima utilizada (0,65%).

Após o período de equilíbrio da preparação, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10 μM de fenilefrina e, estabelecido o platô, foram adicionadas concentrações crescentes cumulativas do extrato ou frações (1-100 μg/mL).

4.5. Investigação do envolvimento do endotélio e da via do NO/GMPc no efeito vasodilatador

Para determinar o papel do endotélio no efeito vasodilatador, o extrato também foi testado em anéis de aorta sem endotélio. O envolvimento da via NO/GMPc foi investigado através do pré-tratamento das aortas, 15 minutos antes da indução da contratatura com Phe, com L-N^G-Nitroarginina metil éster(L-NAME; 100

μM), inibidor da NO sintase, ou 1H-[1,2,4] Oxadiazol [4,3-a] quinoxalino-1-um (ODQ; 10 μM), inibidor da GCs.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. Para os experimentos com anéis de aorta, os resultados foram expressos como percentual de relaxamento da contratatura induzida pela fenilefrina. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Para múltiplas comparações foi utilizado o teste análise de variância (One-way - ANOVA) seguido do pós teste Dunnett ou Newman-Keuls. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do efeito vasodilatador do EKM

Para a avaliação do efeito vasodilatador do EKM, foram utilizados anéis de aorta com endotélio preparados para registro de tensão isométrica. A contração do músculo liso vascular foi induzida após adição de 10 μ M de Phe e, após a observação do platô de contração, foram adicionadas concentrações cumulativas do EKM (Figura 6). O relaxamento da musculatura lisa vascular provocado pelo EKM é dependente da concentração, sendo de $70,5 \pm 8,0\%$ na concentração de 30 μ g/mL ($P < 0,05$; Figura 7). A concentração necessária para reduzir a contratatura induzida por fenilefrina em 50% (CI_{50}) foi de $3,2 \pm 0,1$ μ g/mL.

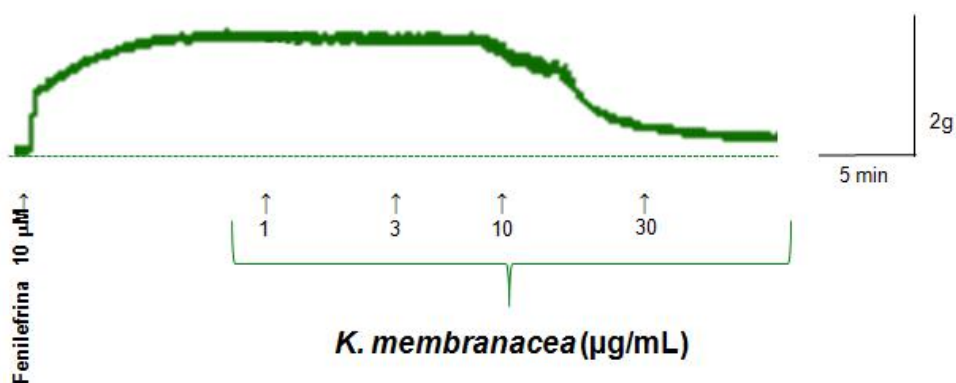


Figura 6. Registro típico da resposta contrátil a 10 μ M de fenilefrina seguido da exposição a concentrações crescentes do extrato bruto de folhas de *K. membranacea* em aorta com endotélio.

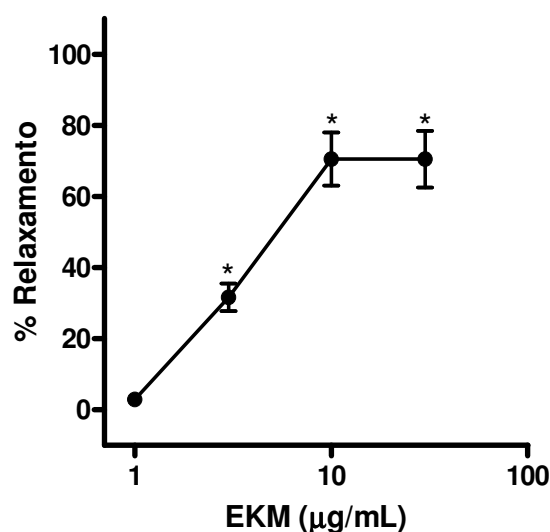


Figura 7: Efeito vasodilatador de EKM em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 7 experimentos. * $P < 0,05$ comparado ao controle.

5.2. Importância do endotélio e da via NO/GMPc para o efeito vasodilatador do EKM

Para avaliar a importância da participação dos fatores endoteliais no relaxamento provocado pelo EKM, foram realizados experimentos com anéis de aorta sem endotélio. Observa-se que a ausência do endotélio inibiu completamente a atividade vasodilatadora do EKM, como é mostrado na figura 8. Com base nesses resultados, sugere-se que o mecanismo pelo qual o EKM provoca o efeito vasodilatador envolve a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio. Diante disso, foram feitos experimentos para investigar a participação da via do NO no efeito de EKM, uma vez que este é o principal fator vasodilatador liberado pelo endotélio. O relaxamento provocado pelo EKM foi completamente inibido após o pré-tratamento com L-NAME e com ODQ, confirmado a participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador do extrato (Figura 8).

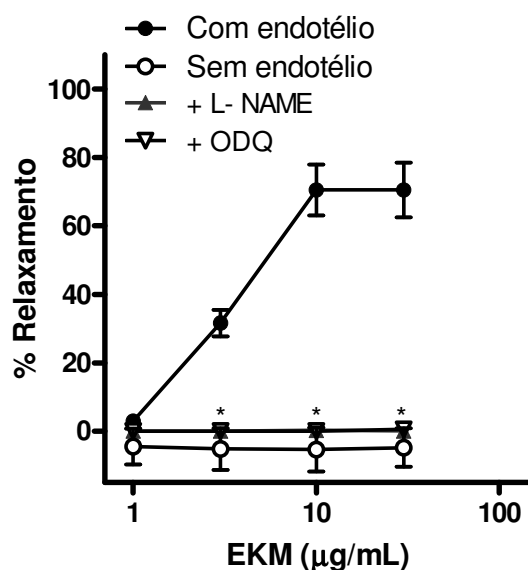


Figura 8. Curva concentração-resposta para EKM em aortas sem endotélio e em aortas com endotélio na ausência e presença de L-NAME (100 µM) ou ODQ (10 µM). Os dados representam a média ± E.P.M. de 6 – 7 experimentos. *P<0,05 comparado a com endotélio.

O NO promove vasodilatação pela estimulação da GCs, que por sua vez aumenta os níveis de GMPc com posterior ativação da PKG, proteína responsável pela diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , além de poder também ativar os canais de K^+ , o que gera hiperpolarização da membrana celular levando a vasodilatação (VANHOUTTE, 2001; CARVALHO *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual EKM ativa a via do NO ainda precisa ser determinada, assim como a participação de outros fatores derivados do endotélio, como a PGI_2 , no efeito vasodilatador. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que é pouco provável a ação do EKM esteja relacionado a uma ação direta na musculatura lisa vascular, visto que o relaxamento foi completamente inibido após a remoção do endotélio.

Além do potente efeito vasodilatador, DUTRA *et al.*, 2012 mostraram que o EKM apresenta atividade antioxidante utilizando-se o método de DPPH, com concentração eficaz média (CE_{50}) de $6,9 \pm 3,5$ µg/mL. O extrato foi mais potente que o controle positivo *Gingko biloba* EGB761, que apresentou CE_{50} de $30,6 \pm 5,7$ µg/mL ($P < 0,05$).

Estes resultados em conjunto indicam que o EKM apresente propriedades farmacológicas interessantes que podem reduzir a disfunção vascular presente nas

DCVs, já poderia reduzir o estresse oxidativo através da atividade antioxidante e provocar relaxamento vascular através da ativação da produção de NO.

5.3. Efeitos das frações do EKM no músculo liso vascular

As frações do EKM foram testadas com a finalidade de sugerir as possíveis classes de metabólitos secundários responsáveis pela atividade vasodilatadora do extrato, além de direcionar as etapas posteriores de fracionamento. A partição líquido-líquido do extrato bruto originou quatro frações (hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica) que foram testadas em aortas com endotélio. A fração hexânica (Fr Hex) não apresentou efeito vasodilatador significativo. Este resultado sugere que não há substâncias com potencial ação vasodilatadora nesta fração (Figura 9).

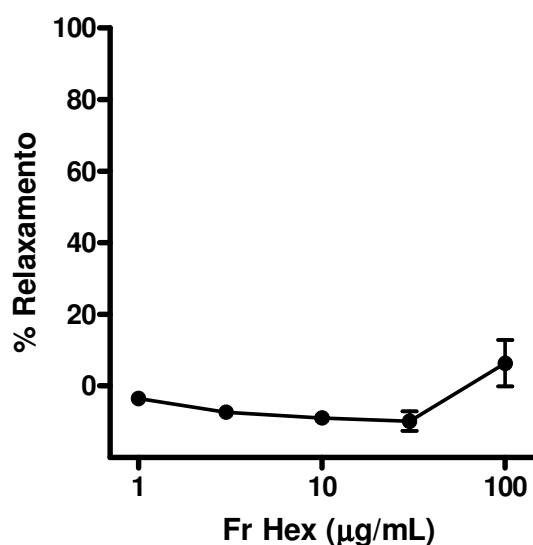


Figura 9. Efeito da fração hexânica (Fr Hex) do extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 4 experimentos.

A fração em diclorometano (Fr CH_2Cl_2) provocou um intenso e significativo relaxamento de $77,7 \pm 0,9\%$ na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 10). A sua concentração inibitória média (CI_{50}) foi calculada em $67,3 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$, valor significativamente maior quando comparado a CI_{50} do extrato bruto.

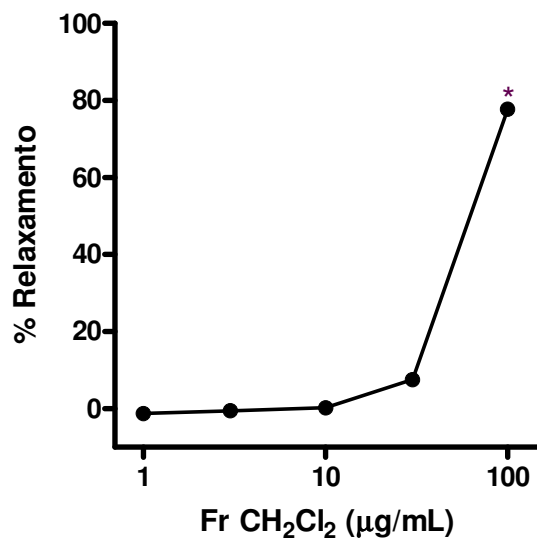


Figura 10. Efeito vasodilatador da fração diclorometânica (Fr CH₂Cl₂) do extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 experimentos. *P<0,05 comparado ao controle.

De forma semelhante, a fração em acetato de etila (Fr AcOEt) provocou intenso relaxamento nos anéis aórticos a partir da concentração de 10 µg/mL. Com 30 µg/mL, foi observado relaxamento de 79,1 \pm 5,0% (Figura 11). A CI₅₀ da Fr AcOET foi calculada em 11,3 \pm 2,3 µg/mL.

A fração butanólica (Fr BuOH) também provocou intenso relaxamento vascular, sendo este significativo a partir da concentração de 3 µg/mL. Na concentração de 30 µg/mL, foi observado relaxamento de até 85,2 \pm 1,3% (Figura 12). A CI₅₀ da fração butanólica foi de 1,7 \pm 0,4 µg/mL.

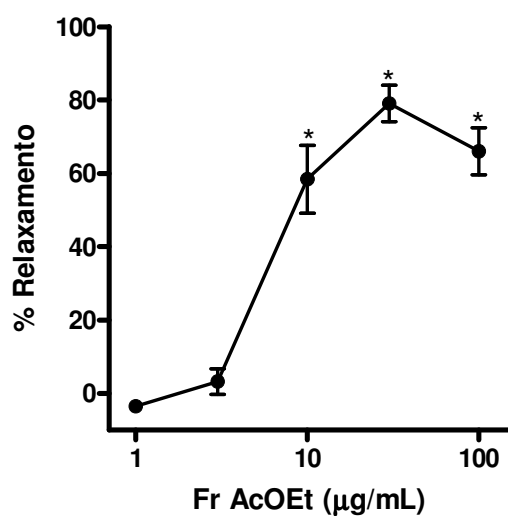


Figura 11. Efeito vasodilatador da fração em acetato de etila (Fr AcOEt) do extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 6 experimentos. *P<0,05 comparado ao controle.

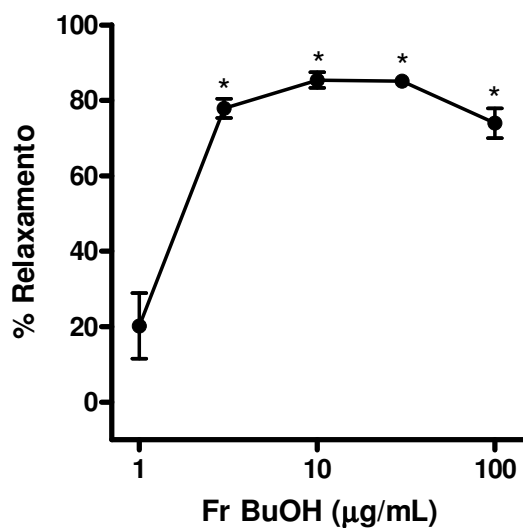


Figura 12. Efeito vasodilatador da fração butanólica (Fr BuOH) do extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 7 experimentos. *P<0,05 comparado ao controle.

A tabela 1 compara as CI_{50} e o relaxamento máximo obtidos com o extrato e suas frações. Pode-se observar que a fração butanólica foi a mais potente em produzir relaxamento vascular, inclusive mais potente que o extrato bruto. Em relação ao relaxamento máximo, a fração butanólica e a fração em acetato de etila foram superiores em comparação ao extrato bruto e às outras frações.

Em conjunto, estes resultados indicam que substâncias presentes nas frações butanólica e em acetato de etila são responsáveis pelo efeito vasodilatador do EKM.

Tabela 1. Concentração inibitória média (CI_{50}) e relaxamento máximo para o extrato etanólico de folhas de *K. membranacea* e suas frações.

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Relaxamento máximo (%)
EKM	3,2 \pm 0,5*	70,5 \pm 8,0**
Fr Hex	-	-
Fr CH₂Cl₂	67,3 \pm 0,7*	77,7 \pm 1,5**
Fr AcOEt	11,3 \pm 2,3*	79,1 \pm 5,0
Fr BuOH	1,7 \pm 0,4	85,4 \pm 2,0

*P<0,05, comparado a Fr BuOH

**P<0,0001, comparado a Fr AcOEt e Fr BuOH

Os solventes utilizados na partição líquido-líquido do EKM extraem diversas substâncias e esta extração baseia-se na polaridade das mesmas. As substâncias preferencialmente extraídas pelo solvente butanol são flavonoides glicosilados, saponinas e taninos, enquanto o solvente acetato de etila extrai, preferencialmente, flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e cumarinas simples (FILHO & YUNES, 1997; SIMÕES *et al.*, 2010).

A análise por métodos espectrométricos do EKM e frações ainda não foi finalizada, não sendo possível determinar quais são as substâncias responsáveis pelos efeitos observados. Porém, com base na literatura e nos resultados obtidos neste trabalho, os prováveis constituintes ativos para a atividade vasodilatadora são as saponinas, taninos e flavonoides (PENSO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2014; VELAYUTHAM *et al.*, 2012; AVIRAM e ROSENBLAT, 2013).

Em um estudo realizado por SHEN *et al.*, 2014, a Ft1, uma saponina bioativa extraída de folhas de *Panax notoginseng*, causou relaxamento da musculatura lisa vascular dependente do endotélio, o qual foi abolido pelo L-NAME e ODQ. Resultado semelhante a esse também foi obtido neste estudo, onde a presença desses dois inibidores aboliu, completamente, o efeito vasodilatador provocado pelo EKM.

AVIRAM & ROSENBLAT (2013) demonstraram que taninos presentes na romã possuem elevadíssima atividade antioxidante, promovendo atenuação do desenvolvimento da aterosclerose. Como já discutido acima, o EKM também apresentou uma potente atividade antioxidante.

Por fim, a importância dos flavonoides no tratamento das DCVs é bastante descrito na literatura. Atividade antioxidante, ativação das vias NO/GMPc e PGI₂/AMPc, ativação dos canais de K⁺ e bloqueio dos canais de Ca⁺² tipo L são mecanismos de ação descritos na literatura para os efeitos vasculares dos flavonoides (AHMAD *et al.*, 2013; VÁZQUEZ *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação do EKM e de suas frações ainda precisa ser determinado, assim como as substâncias responsáveis pela atividade vasodilatadora observada. É importante ressaltar que este é o primeiro estudo que descreve a ação de produtos bioativos isolados da espécie *K. membranacea* no sistema cardiovascular.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O relaxamento vascular causado pelo EKM é dependente da concentração e do endotélio;
- ✓ O mecanismo de ação do EKM envolve a via NO/GMPc. A participação de outros fatores derivados do endotélio ainda precisa ser determinada;
- ✓ As frações BuOH e AcOET provocaram intenso relaxamento vascular e parecem ser responsáveis pelo efeito vasodilatador do EKM;
- ✓ A fração BuOH foi mais potente que o EKM e as demais frações;
- ✓ Sugere-se que as substâncias de elevada polaridade sejam responsáveis pelo efeito vasodilatador provocado pela fração BuOH;
- ✓ A espécie *Kielmeyera membranacea* pode ser considerada uma fonte promissora de substâncias com efeito vasodilatador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD A., KHAN R. M. A., ALKHARFY K. M.. Effects of selected bioactive natural products on the vascular endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, V. 61, P. 111 – 121, 2013.

AMARAL R. R., FERNANDES C. P., CAMEL O. P., TIETBOHL L. A. C., SANTOS M. G., CARVALHO J. C. T., ROCHA L.. Essential oils from fruits with different colors and leaves of *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira: An endemic species from brazilian atlantic forest. *Biomed Research International*, 2012.

AQUINO F. J. T., MARTINS C. M., MORAIS S. A. L., CUNHA L. C. S., ALOISE G. R. G., CHANG R., OLIVEIRA A., MORAES T. S., CUNHA W. R., MARTINS C. H. G.. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kielmeyera coriacea* Mart. and Zucc. *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 7, N° 37, P. 2722 – 2728, 2013.

AVIRAM M., ROSENBLAT M.. Pomegranate for your cardiovascular health. *Rambam Maimonides Medical Journal*, V. 4, N° 2, 2013.

BARREIRO, E.J., BOLZANI, V.S.. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, V.32, N.3, 2009.

BOLIVAR J. J.. Essential Hypertension: An Approach to Its Etiology and Neurogenic Pathophysiology. *International Journal of Hypertension*, V. 2013, Article ED. 547809, 2013.

BRYAN R. M., YOU JUNPING., GOLDING E. M., MARRELLI S. P.. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: A cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*, V. 102, N° 6, P. 1261 – 1277, 2005.

BUTLER M.S.. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, V.67, P.2141-2153, 2004.

CARVALHO A. P., MIRANDA O. P., JULIÃO L. S., OLIVEIRA G. M. A. M., GOMES M.. Plant extract obtained from *Kielmeyera aureovinosa* which has antibiotic activity, isolated chemical compound, compositions comprising same, uses thereof and methods for preventing and treating bacterial infections. *Organização Mundial da Propriedade Intelectual*, N° 174622, 2012.

CARVALHO M.H.C., NIGRO D., LEMOS V.S., TOSTES R.C.A., FORTES Z.B.. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*, V.8, N.1, P. 76-88, 2001.

CARVALHO P. F. Z., TOMAZETT P. K., SANTOS S. C., FERRI P. H., BORGES C. L., MARTINS W. S., SOARES C. M. A., PEREIRA M.. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* induced by oenothain B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BioMed Central Microbiology*, V. 13, P. 1 – 16, 2013.

COELHO T.H., OLIVEIRA S.M., MOREIRA A.L.. Regulação do tono vascular. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2003.

CONSOLINI A. E., SARUBBIO M. G.. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 81, N° 1, P. 57 – 63, 2002.

COQUEIRO A., REGASINI L. O., SKRZEK S. C., QUEIROZ M. M., SILVA D. H., DA SILVA BOLZANI V.. Free radical scavenging activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). *Molecules*, V. 18, N° 2, P. 2376 – 2385, 2013.

CURIN Y., ANDRIANTSITOHAIANA R.. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological Reports*, V. 57, P. 97 – 107, 2005.

DANG B. T., GÉNY C., BLANCHARD P., ROUGER C., TONNERRE P., CHARREAU B., RAKOLOMALALA G., RANDRIAMBOAVONJY J. I., LOIRAND G., PACAUD P., LITAUDON M., RICHOMME P., SÉRAPHIN D., DERBRÉ S.. Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia Journal*, V. 96, P. 65 – 75, 2014.

DAVEL A.P., WENCESLAU C.F., AKAMINE E.H., XAVIER F.E., COUTO G.K., OLIVEIRA H.T., ROSSONI L.V.. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, V.44, P. 920-932, 2011.

DE-JIAN J., ZHONG D., YUAN - JIAN L.. Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Reviews*, V. 22, N° 2, P. 91 – 102, 2004.

DIAS R. G., NEGRÃO C. E., KRIEGER M. H.. Nitric oxide and the cardiovascular system: Cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 2009.

DINIZ T. F., PEREIRA A. C., CAPETTINI L. S. A., SANTOS M. H., NAGEM T. J., LEMOS V. S., CORTES S. F.. Mechanism of the vasodilator effect of mono-

oxygenated xanthenes: A structure-activity relationship study. *Planta Médica*, V. 79, P. 1495 – 1500, 2013.

DUTRA A. R., MELLO R. J., MONTANI J., KONNO T. U. P., MUZITANO M. F., GUIMARÃES D. O., LEAL I. C. R.. Avaliação da atividade antioxidante de espécies vegetais da Restinga de Jurubatiba. Livro de Resumos, II Jornada Fluminense de Produtos Naturais, Arraial do Cabo, P. 56, 2012.

ESTEVES, F.A.. Do índio goitacá à economia do petróleo: uma viagem pela história e ecologia da maior restinga protegida do Brasil. Ed. Essentia. 2011.

FARZAEI M. H., ABBASABADI Z., ARDEKANI M. R., RAHIMI R., FARZAEI F.. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, V. 33, N° 6, P. 815 – 826, 2013.

FERCHICHI L., DREBRÉ S., MAHMOOD K., TOURÉ K., GUILLET D., LITAUDON M., AWANG K., HADI A. H., LE RAY A. M., RICHOMME P.. Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry*, V. 78, P. 98 – 106, 2012.

FERREIRA L. L.D.M..Efeito vasodilatador de espécies de plantas presentes no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ), com ênfase em *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio De Janeiro - *Campus Macaé*, 2013.

FIGUEROA E. O., SILVA L. C. N., MELO C. M., NEVES J. K., SILVA N. H., PEREIRA V. R, CORREIA M. T.. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. *The Scientific World Journal*, V. 2013, P. 1 – 7, 2013.

FILHO V. C., YUNES R. A.. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, V. 21, N° 2, P. 99 – 105, 1997.

FÖRSTERMANN U., SESSA W.C.. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, V. 33, ED. 7, P. 829 – 837, 2012.

FURCHGOTT R.F., VANHOUTTE P.M.. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, V.3.1989.

FURUUCHI R., SAKAI H., HOROKAWA N., WATANABE Y., YOKOYAMA T., HIRAYAMA M.. Antihypertensive effect of boysenberry seed polyphenols on

spontaneously hypertensive rats and identification of orally absorbable proanthocyanidins with vasorelaxant activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, V. 76, N° 9, P. 1694 – 1701, 2012.

GOMES F. S., PROCÓPIO T. F., NAPOLEÃO T. H., COELHO L. C., PAIVA P. M.. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, V. 114, N° 3, P. 672 – 679, 2013.

GUYTON A. C., HALL J. E.. *Tratado de Fisiologia médica*, 12° Edição. Editora Elsevier Brasil, Capítulo 8, P. 57, 2011.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que-fazemos/visitacao/ucs-abertas-avisitacao/2593-parque-nacional-da-restinga-de-jurubatiba.html>>. Acesso em: 05/03/2014.

JENDEKOVÁ L., KOISOVÁ S., ANDRIANTSITOHAIANA R., PECHÁNOVÁ O.. The time-dependent effect of Provinols on brain NO synthase activity in L-NAME-induced hypertension. *Physiological Research*, V. 55, P. S31 – 37, 2006.

JUNIOR C. V., BOLZANI V. S., BARREIRO E. J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, V.29, N.2, P.326-337, 2006.

KHALIL M. I., SULAIMAN S. A.. The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, V. 7, P. 315 – 321, 2010.

KENNEDY D. O., WIGHTMAN E. L.. Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *American Society for Nutrition*, V. 2, P. 32 – 50, 2011.

KUNEŠ J., HOJNÁ S., KADLECOVÁ M., DOBEŠOVÁ Z., RAUCHOVÁ H., VOKURKOVÁ M., LOUKOTOVÁ J., PECHÁNOVÁ O., ZICHA J.. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: The role of relative NO deficiency. *Physiological Research*, V. 53, P. S23 – S34, 2004.

LEMOS L.M., MARTINS T. B., TANAJURA G. H., GAZONI V. F., BONALDO J., STRADA C. L., SILVA M. G., DALL’OGLIO E. L., DE SOUZA JÚNIOR P. T., MARTINS D. T.. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal Ethnopharmacology*, V. 141, N° 1, P. 432 – 439, 2012.

LIM S.S., VOS, T., FLAXMAN, A.D., DANAEI, G., SHIBUYA, K., ADAIR-ROHANI, H.. A comparative risk assessment of burden of disease and injury

attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*, V. 380, ED.9859, P.2224–2260, 2012.

LIMA A. C., SOARES D. J., SILVA L. M., FIGUEIREDO R. W., SOUZA P. H., MENEZES E. A.. In vitro bio accessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, V. 161, P. 142 – 147, 2014.

LIU J., WANG Y., QIU L., YU Y., WANG C.. Saponins of *Panax notoginseng*: chemistry, cellular targets and therapeutic opportunities in cardiovascular diseases. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, V. 23, N° 4, P. 23 – 539, 2014.

LUCAS K.A., PITARI, G.M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K.P., WALDMAN, S.A.. Guanylylcyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, V. 52, P.375–413, 2000.

MAGUIRE, J. J., DAVENPORT, A. P.. Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCR_S. *Trends in Pharmacological Sciences*, V.26, N.9, 2005.

MASHOUR N.H., LIN G. I., FRISHMAN W. H.. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease: clinical considerations. *Archives of International Medicine*, V.158, P.2225-2234, 1998.

MASSRY K. F. E., GHORAB A. H. E., SHAABAN H. A., SHIBAMOTO T.. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 57, N° 12, P. 5265 – 5270, 2009.

MICHEL C. C.. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, V.30, N°.12, P. 2541-2546, 1998.

MIDDLETON E. JR., KANDASWAMI C., THEOHARIDES T. C.. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, V. 52, N° 4, P. 673 – 751, 2000.

MOBOT. Missouri Botanical Garden. 2014. Disponível em: <<http://www.mobot.org>>. Acesso em: 15/04/2014.

MORAIS T. R., COSTA – SILVA T. A., TEMPONE A. G., BORBOREMA S. E., SCOTTI M. T., SOUZA R. M., ARAUJO A. C., OLIVEIRA A., MORAIS S. A., SARTORELLI P., LAGO J. H.. Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius*(Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules*, V. 19, N° 5, P. 5761 – 5776, 2014.

MOREIRA M. E., PEREIRA R. G., DIAS SILVA M. J., DIAS D. F., GONTIJO V. S., GIUSTI – PAIVA A., VELOSO M. P., DORIGUETTO A. C., NAGEM T. J., DOS SANTOS M. H.. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the 2,8-Dihydroxy-1,6-Dimethoxyxanthone from *Haploclathra paniculata* (Mart) Benth (Guttiferae). *Journal of Medicinal Food*, 2014.

MORGADO M., CAIRRÃO E., SANTOS – SILVA A. J., VERDE I.. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cellular and Molecular Life Science*, DOI 10.1007/s00018-011-0815-2, 2011.

NEWMAN D. J.; CRAGG G. M.. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod*, V.75, P. 311–335, 2012.

NOGUEIRA P. C. L., ANDRADE M. S., ANDRADE L. M., MORAES V. R. S., RIBEIRO A. S., BITTRICH V., AMARAL M. C. E., FERREIRA A. G., ALCÂNTARA G. B., LEÃO K.V., ALVES P. B.. Chemical constituents from *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 36, P. 921 – 924, 2009.

OBICI S., OTOBONE F. J., SELA V. R. S., ISHIDA K., SILVA J. C., NAKAMURA C. V., CORTEZ D. A. G., AUDI E. A.. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 115, P. 131 – 139, 2008.

OGINO M., FUKUI S., NAKADA Y., TOKUNOH R., ITOKAWA S., KAKOI Y., NISHIMURA S., SANADA T., FUSE H., KUBO K., WADA T., MARUI S.. Discovery of a potent and orally available acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor as an anti-atherosclerotic agent: (4-phenylcoumarin)acetanilide derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V. 59, N° 10, P. 1268 – 1273, 2011.

OGUT O., BROZOVICH F. V.. Regulation of force in vascular smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, V. 35, P. 347 – 355, 2003.

OLIVEIRA A. C., BRITTO A. C., HENRIQUES R. M., CARDOSO G. M., ANJOS C. S., JESUS A. M., COSTA E. V., MORAES V. R., NOGUEIRA P. C., BEZERRA D. P.. In vivo growth inhibition of sarcoma 180

by *Kielmeyera rugosa* Choisy (Calophyllaceae). Natural Product Research, V. 27, Nº 23, P. 2248 – 2250, 2013.

OLIVEIRA D. M., BASTOS D.H.M.. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. Química Nova, V. 34, N. 6, P. 1051-1056, 2011.

ORALLO F.. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. Pharmacol. Ther., V. 69, N. 3, P. 153-171, 1996.

PARKINGTON H. C., COLEMAN H. A., TARE M.. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. Pharmacological Research, V. 49, P. 509 – 514, 2004.

PENSO J., CORDEIRO K. C., DA CUNHA C. R., DA SILVA CASTRO P. F., MARTINS D. R., LIÃO L. M., ROCHA M. L., DE OLIVEIRA V.. Vasorelaxant activity of 7- β -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. European Journal of Pharmacology, V. 773, P. 75 – 80, 2014.

PICCINELLI A. C., SANTOS J. A., KONKIEWITZ E. C., OESTERREICH S. A., FORMAGIO A. S., CRODA J., ZIFF E. B., KASSUYA C. A.. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. Nutritional Neuroscience, 2014.

PIMENTEL S.. Canais e transportadores de Cálcio. Faculdade de Medicina do Porto, 22/04/2003.

POURREZA N.. Phenolic compounds as potential antioxidant. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, V. 8, P. 149 – 150, 2013.

RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON G.. RANG & DALE Farmacologia 7º ED., Rio de Janeiro, Elsevier Editora LTDA, Capítulo 22, P. 271, 2012.

RASTALDO R., PAGLIARO P., CAPPELLO S., PENNA C., MANCARDI D., WESTERHOF N., LOSANO G.. Nitric oxide and cardiac function. Life Science, V. 81, ED. 10, P. 779 – 793, 2007.

REFLORA. Listas de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 15/04/2014.

RODRIGO R., LIBUY M., FELIÚ F., HASSON D.. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. Disease Markers, V. 35, ED. 6, P. 773 – 790, 2013.

RODRIGUES P. A., MORAIS S. M., SOUZA C. M., MAGALHÃES D. V., VIERIRA I. G., ANDRADE G. M., RAO V. S., SANTOS F. A.. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, V. 84, N° 1, P. 113 – 122, 2012.

RUHFEL B. R., BITTRICH V., BOVE C. P., GUSTAFSSON M. H. G., PHILBRICK C. T., RUTISHAUSER R., XI Z., DAVIS C. C.. Phylogeny of the clusioid clade (MALPIGHIALES): Evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany*, V. 98, N° 2, P. 306 – 325, 2011.

SADDI N.. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). Tese de PhD. University of Reading, UK, 1982.

SALUK-JUSZCZAK J.. Anthocyanins as components of functional food for cardiovascular risk prevention. *Postepy Hig Med Dosw*, V. 64, P. 451 – 458, 2010.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2014. Disponível em: <<http://socios.cardiol.br/noticias/2010/21072010.asp>>. Acesso em: 14/05/2014.

SHEN K., LEUNG S. W., JI L., HUANG Y., HOU M., XU A., WANG Z., VANHOUTTE P. M.. Notoginsenoside Ft1 activates both glucocorticoid and estrogen receptors to induce endothelium-dependent, nitric oxide-mediated relaxations in rat mesenteric arteries. *Biochemical Pharmacology*, V. 88, N° 1, P. 66 – 74, 2014.

SILVA F. M., DE PAULA J. E., ESPINDOLA L. S.. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses*, V. 52, N° 6, P. 511 – 517, 2009.

SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R. (ORGS). *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 6ª Edição. Rio Grande do Sul. Editora UFRGS, 2010.

SOBEY C. G.. Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, V. 21, P. 28 – 38, 2001.

SOBRAL I. S., SOUZA – NETA L. C., COSTA G. A. N., GUEDES M. L. S., MARTINS D., CRUZ F. G.. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, V. 19, N° 3, P. 686 – 689, 2009.

SOCERJ. Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. 2009. Disponível em: <<http://www.rbconline.org.br/artigo/analise-do-tratamento-da-sindrome-coronariana-aguda-em-centro-cardiologico-do-norte-fluminense-analysis->

of-treatment-of-acute-coronary-syndrome-at-a-cardiology-center-in-northern-rio-de-janeiro-stat/>. Acesso em: 15/05/2014.

SONG B., WANG Z., LIU Y., XU S., HUANG G., XIONG Y., ZHANG S., XU L., DENG X., GUAN S.. Immunosuppressive activity of daphnetin, one of coumarin derivatives, is mediated through suppression of NF- κ B and NFAT signaling pathways in mouse T cells. PLoS One, V. 9, N° 5, 2014.

SOUZA Z. L., DE OLIVEIRA F. F., DA CONCEIÇÃO A. O., SILVA L. A., ROSSI M. H., SANTOS J. S., ANDRIOLI J. L.. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, V. 10, P. 11 – 20, 2012.

STAPLETON P. A., JAMES M. E., GOODWILL A. G., FRISBEE J. C.. Obesity and vascular dysfunction. Pathophysiology, V. 15, P. 79 – 89, 2008.

SUFFREDINI I. B., PACIENCIA M. L., VARELLA A. D., YOUNES R. N.. Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, V. 10, N° 6, P. 400 – 402, 2006.

TAIZ L., ZEIGER E.. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc Sunderland, ED. 3ª.P. 283-308, 2002.

TIUMAN T. S., SANTOS A. O., UEDA – NAKAMURA U., FILHO B. P. D., NAKAMURA C. V.. Recent advances in leishmaniasis treatment. International Journal of Infectious Diseases, V. 15, P. e525 – e532, 2011.

TSAI S.C., LIANG Y.H., CHIANG J. H., LIU F. C., LIN W. H., CHANG S. J., LIN W. Y., WU C. H., WENQ J. R.. Anti-inflammatory effects of *Calophyllum inophyllum* L. in RAW264.7 cells. Oncology Reports, V. 28, N°3, P. 1096 – 1102, 2012.

VANHOUTTE P. M.. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. Journal of Clinical Investigation, V. 107, N° 1, P. 23 – 5, 2001.

VANHOUTTE P. M.. Endothelium – dependent hyperpolarizations: The history. Pharmacological Research, V. 49, P. 503 – 508, 2004.

VÁZQUEZ F. J. L., ALVARADO C. I., MOLINA A. R., MOLINA I. R., SÁNCHEZ A. R.. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. Molecules, V. 18, P. 5814 – 5857, 2013.

VELAYUTHAM R., SANKARADOSS N., AHAMED K. F.. Protective effect of tannins from *Ficus racemosa* in hypercholesterolemia and diabetes induced vascular

tissue damage in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, V. 5, N° 5, P. 367 – 373, 2012.

WHO. Cardiovascular Diseases. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 23 de julho de 2013.

WORLD HEART FEDERATION. Disponível em:<<http://www.world-heart-federation.org>>Acesso em: 14 de maio de 2014.

WURDACK K. J., DAVIS C. C.. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. American Journal of Botany, V. 96, N° 8, P. 1551 – 1570, 2009.

ZAGO A.S., ZANESCO A.. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. Arq. Bras. Cardiol, V.87, N.6, P. E264-E270, 2006.

ZAGOTO J. N., BRACHT A., PAGADIGORRIA C. L., ISHII – IWAMOTO E. L., CORTEZ D. A., YAMAMOTO N. S.. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver. Journal of Ethnopharmacology, V. 105, N° 1 – 2, P. 47 – 54, 2006.