



Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus Macaé*
Curso de Farmácia



NANASHARA FIGUEIREDO REIS

EFEITO VASODILATADOR DO BIFLAVONOIDE PODOCARPUSFLAVONA A
ISOLADO DA ESPÉCIE *Kielmeyera membranacea*

Macaé
2021

NANASHARA FIGUEIREDO REIS

EFEITO VASODILATADOR DO BIFLAVONOIDE PODOCARPUSFLAVONA A
ISOLADO DA ESPÉCIE *Kielmeyera membranacea*

Trabalho de Conclusão de Curso Apresentado ao
Curso de Farmácia do Centro Multidisciplinar UFRJ-
Macaé como um dos requisitos para obtenção do título
de farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Montani Raimundo

Macaé

2021

CIP - Catalogação na Publicação

RR375e Reis, Nanashara Figueiredo
 Efeito vasodilatador do biflavonoide
 podocarpusflavona A isolado da espécie K.
 membranacea / Nanashara Figueiredo Reis. -- Rio de
 Janeiro, 2021.
 50 f.

 Orientadora: Juliana Montani Raimundo .
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
 Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em
 Farmácia, 2021.

 1. Hipertensão. 2. Vasodilatação. 3. Óxido nítrico.
 4. Kielmeyera. 5. Podocarpusflavona A. I. Raimundo
 , Juliana Montani, orient. II. Título.

Nanashara Figueiredo Reis

Efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A isolado da espécie *K. membranacea*

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 08 de outubro de 2021.

Comissão avaliadora:

Prof^a. Dr^a. Juliana Montani Raimundo (Presidente da Banca)

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/5226925321575185>

Prof^a. Dr^a. Michelle Frazão Muzitano

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/6637126351943749>

Prof^a. Dr^a. Paula Lima do Carmo

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4689418225228922>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e por ter colocado pessoas iluminadas em meu caminho, sem Ele nada disso seria possível.

À minha querida mãe Ana Paula, que acreditou no meu sucesso, me apoiando, incentivando a estudar, e sempre me dando o suporte necessário. Dedico meu sucesso!

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Juliana Montani, por ter me recebido em seu laboratório e sua equipe, sempre me orientado com atenção, seriedade e dedicação. Obrigada pela confiança e por ter me acalmado ao longo desses anos, e principalmente pela enorme paciência na finalização deste projeto. Minha total admiração e respeito pela profissional que és.

Aos amigos e colegas de laboratório, grandes incentivadores e motivadores, em especial ao Prof. Dr. Leandro Louback, pelo conhecimento compartilhado, auxílio e convivência ao longo dos dias no laboratório, aos colegas que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Aos professores e mestres, que aceitaram o convite para participação da banca de avaliação deste trabalho.

Aos sobreviventes da turma de farmácia 2014.2, Isabela Souza, Bárbara Palermo, Thays Luiz e Gabriela Medina, pelo acolhimento, risadas, eventos científicos, churrascos, festas e principalmente pela motivação, apoio e amizade.

Aos amigos de Macaé, em especial minha amiga/irmã Taís Ortiz, por sempre estar ao meu lado, tantos nos momentos de alegria e nos difíceis, por me ouvir, ouvir e ouvir, por ter sido a melhor companheira de casa que eu poderia ter.

Às meninas da Garantia da Qualidade da Fiocruz pelo enorme carinho, incentivo e apoio nessa reta final.

Aos animais, minha gratidão e respeito!

Ao CNPq, pelo fomento.

Entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles
sufoquem os seus sonhos.

Alice no país das maravilhas.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo, sendo a hipertensão arterial sistêmica (HAS) considerada o principal fator de risco para estas doenças. Uma vez que a HAS é caracterizada por aumento do tônus vascular, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito vasodilatador do extrato hidroalcoólico de caule de *K. membranacea* (ECKM) e o mecanismo de ação do efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A, presente no extrato. A atividade vasodilatadora foi avaliada em aortas de ratos Wistar (200-260 g) preparadas para registro de tensão isométrica. Os anéis aórticos foram posicionados em cubas verticais preenchidas com solução Krebs-Henseilet continuamente oxigenada com mistura carbogênica, à 37 °C. A contração do músculo liso vascular foi induzida com 10 µM de fenilefrina, seguida da exposição a concentrações cumulativas do ECKM (0,1 a 30 µg/mL) ou da podocarpusflavona A (0,1 a 10 µg/mL). Foram realizados experimentos em aortas com e sem endotélio. A participação da via do óxido nítrico (NO) no efeito vasodilatador da podocarpusflavona A foi avaliada em anéis de aorta com endotélio pré-tratados com o inibidor da NO sintase N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 100 µM), com o inibidor da guanilato ciclase solúvel, 1H-(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ; 10 µM), ou com o inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) wortmannin (0,3 µM). Para avaliar a participação da prostaciclina (PGI₂), os anéis de aorta com endotélio foram pré-tratados com o inibidor da ciclooxigenase indometacina (10 µM). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA do Campus UFRJ-Macaé (MAC068). O ECKM e a podocarpusflavona A induziram vasodilatação de maneira dependente da concentração em aortas com endotélio. Foi observado relaxamento vascular de 78,7 ± 2,5% na concentração de 30 µg/mL de ECKM (P<0,05; n=6). A podocarpusflavona A, na concentração de 10 µg/mL, produziu relaxamento vascular de 77,2 ± 3,6% em aortas com endotélio (P<0,05; n=7). Em aortas sem endotélio, o ECKM e a podocarpusflavona A não alteraram o tônus vascular, indicando que a atividade vasodilatadora de ambos é dependente de fatores endoteliais. O pré-tratamento com L-NAME e ODQ inibiu o efeito vasodilatador do biflavonoide, demonstrando a participação da via NO/GMPc. Na presença de wortmannin, a curva concentração-resposta da podocarpusflavona foi deslocada para direita, indicando participação da via da PI3K na ativação da NO sintase. A indometacina não alterou o efeito vasodilatador do biflavonoide, indicando que a PGI₂ não está envolvida no efeito vasodilatador. Os resultados obtidos indicam que a podocarpusflavona A é um dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade vasodilatadora do ECKM, e que o seu mecanismo de ação envolve liberação endotelial de NO.

Palavras-chave: hipertensão, vasodilatação, óxido nítrico, *Kielmeyera*, podocarpusflavona A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do mecanismo de ativação da eNOS dependente ou independente de Ca^{2+}	18
Figura 2. Representação do mecanismo de ação do NO.....	19
Figura 3. Estrutura química dos flavonoides.....	21
Figura 4. Imagem da espécie <i>K. membranacea</i> presente Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.....	24
Figura 5. Estrutura química dos biflavonoides.....	25
Figura 6. Figura esquemática dos procedimentos para o registro de tensão isométrica de anéis de aorta isolados de ratos <i>Wistar</i>	29
Figura 7. Registro de tensão isométrica de anel aórtico pré-contraído com fenilefrina e exposto a concentrações cumulativas de podocarpusflavona A	33
Figura 8. Efeito vasodilatador do extrato hidroalcoólico do caule de <i>K. membranacea</i>	33
Figura 9. Efeito vasodilatador biflavonoide podocarpusflavona A.....	35
Figura 10. Participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A.....	37
Figura 11. Participação da via PI3K/Akt no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A.....	38
Figura 12. Participação da via PGI_2 no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade Biológica de espécies vegetais do gênero <i>Kielmeyera</i>	22
Tabela 2. Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência da podocarpusflavona A no EFKM e no ECKM.....	34

LISTA DE ABREVIÇÕES

- [Ca²⁺]_i** – Concentração intracelular de Ca²⁺
- Akt** – Proteína quinase B
- AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- BH₄** – Tetrahydrobiopterina
- CaMKII** – Proteína quinase II dependente da calmodulina
- CaMKII** – Proteína quinase II dependente da calmodulina
- CE₅₀** – Concentração eficaz média
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-DAD** – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodos
- DAG** – Diacilglicerol
- DCVs** – Doenças cardiovasculares
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- ECKM** – Extrato hidroalcoólico de caule de *Kielmeyera membranacea*
- EDHF** – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- EFKM** – Extrato hidroalcoólico de folhas de *Kielmeyera membranacea*
- eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial
- FAD** – Flavina adenina dinucleotídeo
- FMN** – Flavina mononucleotídeo
- GCs** – Guanilato ciclase solúvel
- GMPc** – Guanosina monofosfato cíclico
- HAS** – Hipertensão arterial sistêmica
- IP₃** – Inositol 1, 4, 5, trifosfato
- L-NAME** – N ω -nitro-L-arginina metil éster
- MLCK** – Quinase de cadeia leve de miosina
- NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal
- NO** – Óxido nítrico
- NOS** – Óxido nítrico sintase
- ODQ** – 1H-(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona
- PA** – Pressão arterial
- PDEs** – Fosfodiesterases
- PGI₂** – Prostaciclina
- PKA** – Proteína quinase dependente de AMPc
- PKC** – Proteína quinase dependente de GMPc
- PKG** – Proteína cinase dependente de GMPc
- RS** – Retículo sarcoplasmático
- SERCA** – Ca²⁺ ATPase de retículo sarcoplasmático

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Doenças cardiovasculares.....	13
1.2. Hipertensão arterial sistêmica.....	13
1.3. Regulação do tônus vascular.....	14
1.3.1. Endotélio vascular.....	15
1.3.1.1. Óxido nítrico.....	16
1.3.1.2. Prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	19
1.4. Potencial farmacológico de flavonoides para modulação da função vascular.....	20
1.5. <i>Kielmeyera membranacea</i>	22
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Material vegetal.....	28
4.2. Animais.....	28
4.3. Preparo dos anéis de aorta para registro de tensão isométrica.....	29
4.4. Avaliação do efeito vasodilatador do ECKM e da podocarpusflavona A...30	
4.5. Investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador da podocarpusflavona A.....	30
4.6. Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Efeito vasodilatador do ECKM e avaliação comparativa com o EFKM.....	32
5.2. Efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A.....	35
5.3. Análise do mecanismo de ação do efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A.....	36
5.3.1. Participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A.....	36
5.3.2. Avaliação da participação da PGI ₂ no efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A.....	39
6. CONCLUSÃO.....	41

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte em todo o mundo. Estima-se que, em 2016, 17,9 milhões de pessoas morreram em decorrência de DCVs, correspondendo a cerca de 31% de todas as causas de morte no mundo. A projeção é que, em 2030, esse quadro se agrave, chegando a 23,6 milhões de óbitos por ano (WHO, 2021).

No Brasil, em 2018, mais de 395 mil mortes foram decorrentes de DCVs, sendo estas doenças responsáveis por 6,5 vezes mais mortes que todas as infecções, incluindo a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SBC, 2020).

As DCVs são caracterizadas por desordens do coração e dos vasos sanguíneos, como distúrbios coronarianos, doença cerebrovascular, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca. Quatro em cada cinco mortes por DCVs estão associadas ao infarto agudo do miocárdio ou ao acidente vascular cerebral, sendo o acúmulo de gordura depositado nas paredes internas dos vasos sanguíneos a causa mais comum para essas desordens (WHO, 2021).

Os principais fatores de risco para as DCVs podem ser classificados em modificáveis e não modificáveis. Dentre os fatores de risco não modificáveis estão aqueles que não podem ser alterados, como o gênero, a idade, e a genética. Entre os fatores de risco modificáveis estão as dietas não saudáveis, sedentarismo, uso de tabaco e uso abusivo de álcool (BOURBON *et al.*, 2016; COWLEY, 2006). Esses fatores de risco podem ocasionar a elevação da pressão arterial (PA), hiperlipidemia, hiperglicemia e/ou obesidade do indivíduo, agregando um maior risco para o desenvolvimento de DCVs (OPAS, 2019). Destaca-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS) como o principal fator de risco modificável para DCVs (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020).

1.2. Hipertensão arterial sistêmica

A HAS é uma doença multifatorial definida pelo aumento sustentado da PA, sendo esta igual ou maior a 140/90 mmHg (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020). A causa exata da HAS na maioria dos casos é desconhecida, porém

sabe-se que diversos fatores podem influenciar a elevação da PA, como fatores genéticos, sedentarismo, fumo, estresse e consumo excessivo de sal (BRASIL, 2019). De acordo com o Ministério da Saúde, por meio de dados apresentados em 2018 pelo Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), a prevalência da HAS está nitidamente relacionada com a idade, sendo 49,5% na faixa etária de 55 a 64 anos, e subindo para 60,9% na faixa etária acima de 65 anos.

A HAS pode ser controlada com ações terapêuticas, sendo essas medidas não medicamentosas e medicamentosas. Como medidas não medicamentosas são recomendadas mudanças no estilo de vida, como manter uma alimentação saudável, praticar atividade física regularmente, controlar o consumo de álcool e reduzir do uso de sal. O tratamento medicamentoso deve ser individualizado, com o uso de fármacos anti-hipertensivos que promovem a redução e o controle da PA. O estágio da doença e os fatores de riscos apresentados pelo paciente são determinantes na escolha entre um tratamento monoterápico ou politerápico (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020; BOURBON *et al.*, 2016).

Os fármacos anti-hipertensivos exercem seus efeitos por diferentes mecanismos, os quais resultam direta ou indiretamente na modulação do tônus vascular. Atualmente as principais classes dos medicamentos utilizados são: diuréticos, inibidores da enzima conversora da angiotensina, antagonistas dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, agonistas α 2-adrenérgicos de ação central, antagonistas dos receptores α -adrenérgicos, inibidores diretos da renina, antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II e vasodilatadores diretos (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020).

1.3. Regulação do tônus vascular

A modulação do estado contrátil do músculo liso vascular é de grande importância para o controle do fluxo sanguíneo no corpo humano e para a regulação da PA. O tônus vascular é controlado por mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, dentre eles os neurotransmissores, hormônios e fatores derivados do endotélio (MAGUIRE e DAVENPORT, 2005; GUYTON e HALL, 2011).

A regulação do tônus do músculo liso vascular está diretamente relacionada com a concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pode ocorrer

através da liberação do Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático (RS) ou pelo influxo de Ca^{2+} extracelular através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, sendo estes eventos produzidos pela ativação de receptores por agonistas e/ou despolarização da membrana. Com a formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina e a ativação da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), a miosina é fosforilada, permitindo assim a sua interação com o filamento de actina e a contração do músculo liso vascular (GUYTON e HALL, 2011; JACKSON, 2000).

O mecanismo de vasoconstrição induzido por agonistas envolve a produção de segundos mensageiros, como o inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). Por exemplo, a fenilefrina é um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, os quais são acoplados à proteína Gq e quando ativados levam à produção de IP_3 e DAG a partir da ativação da fosfolipase C. O IP_3 age em receptores localizados no RS e promove a liberação de Ca^{2+} , enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) (MAGUIRE e DEVENPORT, 2005).

Para que ocorra o relaxamento da musculatura lisa vascular são necessárias a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a desfosforilação da miosina pela fosfatase da cadeia leve de miosina. A vasodilatação pode ser mediada por mecanismos independentes e dependentes do endotélio vascular, como a abertura de canais de K^+ e a ativação da produção óxido nítrico (NO), respectivamente (GUYTON e HALL, 2011; MAGUIRE e DEVENPORT, 2005)

1.3.1. Endotélio vascular

O endotélio vascular é composto por uma monocamada de células epiteliais localizado na parede vascular e possui diversas funções (GUYTON e HALL, 2011). Dentre elas, constituir uma barreira protetora semipermeável entre o plasma e o líquido extravascular, controlar a passagem de moléculas, manter o equilíbrio entre fatores anti- e pró-inflamatórios, participar da cascata de coagulação e da angiogênese, além de ter um importante papel na regulação do tônus vascular. Estas funções são exercidas como resposta a estímulos neuro-humorais e físicos, através da síntese e liberação de mediadores químicos (MICHEL e VANHOUTTE, 2010; CARAMORI e ZAGO, 2000).

O endotélio modula o tônus vascular através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio e fatores constritores derivados do endotélio (FURCHGOTT e

VANHOUTTE, 1989). Em 1977, descobriu-se que o endotélio exercia o controle do tônus vascular através da liberação de substâncias vasoativas. Enquanto estudavam o efeito vasodilatador promovido pela acetilcolina, Furchgott e Zawadzki descobriram a existência de um importante fator de relaxamento vascular derivado do endotélio, que posteriormente foi identificado como sendo o NO (CARAMORI e ZAGO, 2000). Além do NO, o endotélio também libera outros fatores vasodilatadores, incluindo a prostaciclina (PGI_2) (FÉLETOU e VANHOUTTE, 2011) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (VANHOUTTE, 2004).

Os principais fatores vasoconstritores sintetizados e liberados pelo endotélio são a angiotensina II, a prostaglandina $F_{2\alpha}$, o tromboxano A_2 e a endotelina 1 (DAVIGNON e GANZ, 2004). O efeito vasoconstritor da angiotensina II ocorre pela ativação dos receptores AT1, presentes no músculo liso vascular. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ e o tromboxano A_2 são substâncias derivadas do ácido araquidônico e, assim como a endotelina 1, agem em seus receptores específicos presentes na musculatura lisa causando vasoconstrição (CARVALHO *et al.*, 2011; QIN e ZHOU, 2015)

O endotélio é um importante regulador da homeostase vascular, e a perda dessa ação protetora resulta no aumento da propensão à vasoconstrição, inflamação, proliferação celular e trombose, contribuindo assim, para o desencadeamento e o agravamento das DCVs (DAVIGNON e GANZ, 2004; DAVEL *et al.*, 2011). A disfunção endotelial está envolvida nas alterações vasculares associadas à HAS, onde há um aumento dos fatores endoteliais vasoconstritores e/ou diminuição dos fatores vasodilatadores, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e redução da biodisponibilidade de NO (KONUKOGLU e UZUN, 2016).

1.3.1.1. Óxido nítrico

A biossíntese do NO ocorre através da conversão de L-arginina em L-citrulina, catalisada por uma enzima dimérica denominada NO sintase (NOS). Esse processo é realizado em duas etapas: primeiro ocorre a hidroxilação da L-arginina à Nw-hidroxi-L-arginina, que em seguida é oxidada à L-citrulina e NO. Para a ativação da NOS é necessária a presença da L-arginina como substrato e diversos co-fatores como oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH_4) (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

Existem três isoformas conhecidas da NOS: NO sintase induzível (iNOS), cuja expressão gênica é ativada em resposta a estímulos inflamatórios e de citocinas; NO sintase endotelial (eNOS), presente em células endoteliais vasculares; e em células neuronais encontra-se a NO sintase neuronal (nNOS). A eNOS e a nNOS são constitutivas e dependentes do complexo Ca^{2+} /calmodulina para sua ativação (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

No endotélio, a ativação da eNOS ocorre mediante o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por agonistas como a acetilcolina, histamina, ou pelo estresse de cisalhamento (Figura 1). Este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gera a formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina, e este se liga ao seu domínio na eNOS facilitando o fluxo de elétrons da NADPH e dos demais cofatores a partir do domínio redutase para o heme oxigenase, catalisando a produção de NO (MICHEL e VANHOUTTE, 2010).

Também é possível regular a função da eNOS de forma independente da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, através da fosforilação dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷, Ser⁶³⁵ e Ser⁶¹⁷ e consequente aumento da atividade da enzima. Por outro lado, a fosforilação dos resíduos de Ser¹¹⁶, Thr⁴⁹⁵ e Tyr⁶⁵⁹ leva à inibição da enzima (Figura1). A eNOS pode ser fosforilada por diversas quinases, como a proteína quinase B (Akt), a quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) e a proteína quinase ativada por AMPc (AMPK). Um dos principais mecanismos de fosforilação que levam ao aumento da atividade da eNOS é a ativação da via fosfatilinositol-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt). Esta via pode ser ativada por estímulos de receptores de membrana, como os receptores de estrogênio, de insulina e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), além do estresse de cisalhamento (MICHEL e VANHOUTTE, 2010; VANHOUTTE *et al.*, 2016).

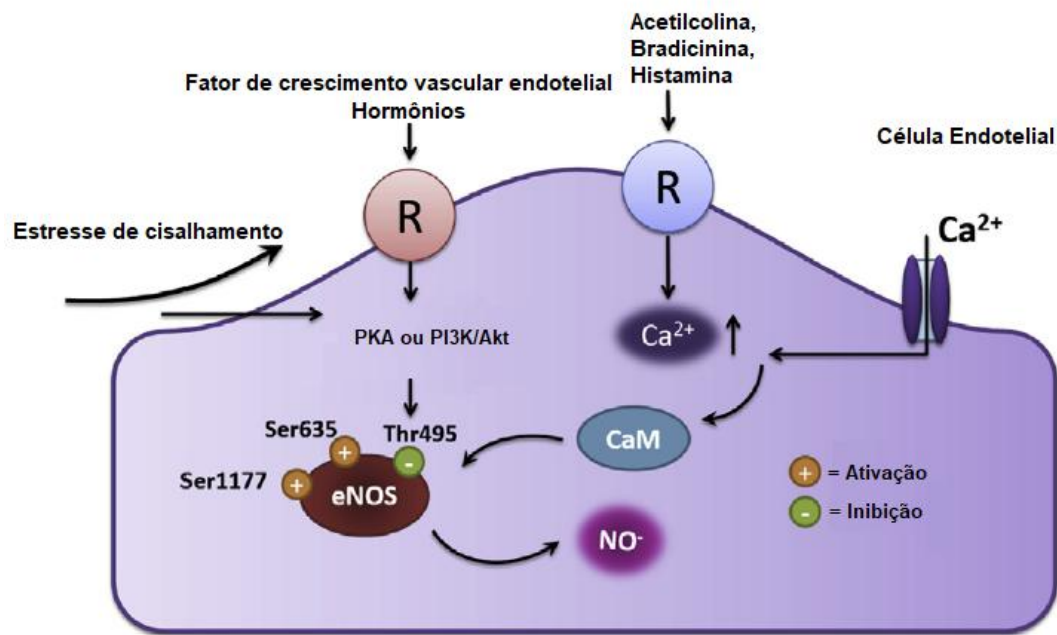


Figura 1: Representação do mecanismo de ativação da eNOS dependente ou independente de Ca^{2+} . eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; CaM: calmodulina; NO: óxido nítrico; PKA: proteína quinase dependente de AMPc (Adaptado de VANHOUTTE *et al.*, 2016).

O NO produzido nas células endoteliais rapidamente se difunde para o músculo liso vascular, onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), promovendo o aumento da concentração intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Este nucleotídeo cíclico ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (Figura 2), que por sua vez promove o relaxamento vascular através de diversos mecanismos que envolvem: o aumento do efluxo de Ca^{2+} pela ativação da Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática (PMCA); a diminuição da liberação de Ca^{2+} do RS através da inibição da formação de IP_3 ou inibição do seu receptor no RS; o sequestro de Ca^{2+} pelo RS através da ativação da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA). Outro mecanismo de ação da PKG é a promoção do relaxamento vascular através da hiperpolarização da membrana plasmática, que ocorre com a abertura dos canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} , o que impede o influxo de Ca^{2+} a partir dos canais de Ca^{2+} tipo L. Este último mecanismo também pode ser realizado por ação direta do NO. A ação do GMPc é finalizada quando o mesmo é hidrolisado pelas enzimas fosfodiesterases (PDEs) (MAGUIRE e DAVENPORT, 2005).

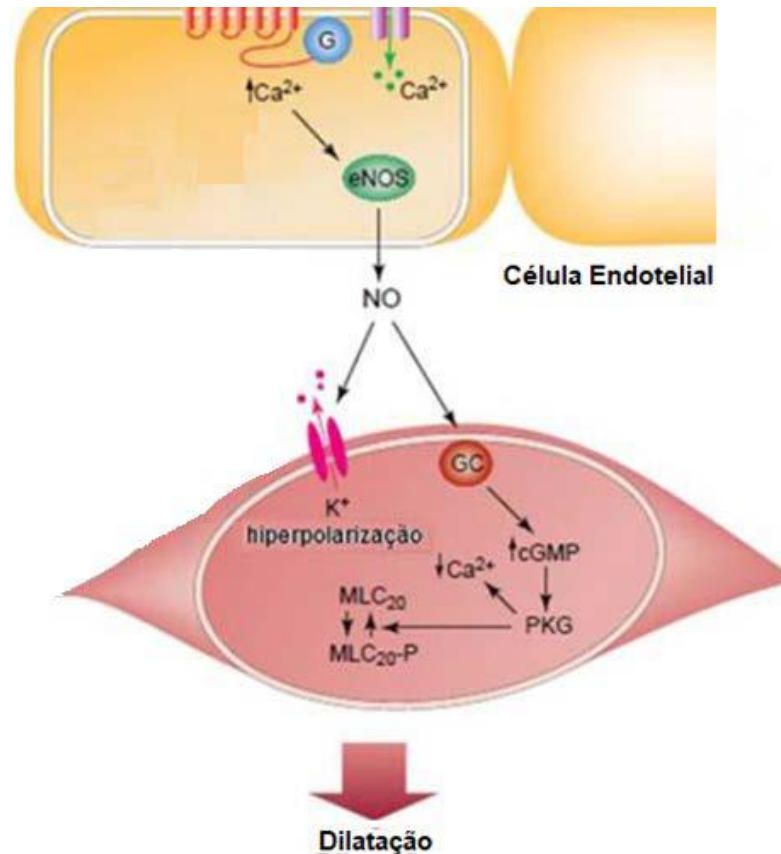


Figura 2: Representação do mecanismo de ação vasodilatador do óxido nítrico (NO). eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; PKG: proteína quinase dependente de GMPc; GC: guanilato ciclase solúvel; cGMP-monofosfato cíclico de guanosina; MLC: cadeia leve de miosina (Adaptado de VANHOUTTE *et al.*, 2016).

1.3.1.2. Prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio

A PGI_2 é um eicosanoide produto da via da ciclooxygenase produzido a partir do ácido araquidônico. Este, por sua vez, é produzido pela ação da enzima fosfolipase A_2 a partir dos fosfolipídios de membrana, em resposta a diversos fatores, como o estresse de cisalhamento e mediadores produzidos por plaquetas ativadas (FÉLETOU e VANHOUTTE, 2011).

A vasodilatação produzida pela PGI_2 ocorre com o estímulo de receptores acoplados a proteína G_s presentes na musculatura lisa vascular, que ativam a adenilato ciclase, levando ao aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este nucleotídeo cíclico ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que atua de forma semelhante a PKG, reduzindo a $[Ca^{2+}]_i$ através de vários mecanismos: bloqueia o receptor IP_3 inibindo a liberação de Ca^{2+} do RS; aumenta a captação de $[Ca^{2+}]_i$ pelo RS; e promove o efluxo de Ca^{2+}

(LUCAS *et al*, 2000; MAGUIRE e DAVENPORT, 2005). Além disso, a PGI₂ atua na abertura de diversos canais de K⁺, o que leva à hiperpolarização da membrana celular, resultando no fechamento dos canais de Ca²⁺ tipo L, e por consequência, na inibição do influxo de Ca²⁺ (FÉLETOU e VANHOUTTE, 2011; JACKSON, 2000)

Diferente do NO e da PGI₂, a ação vasodilatadora do EDHF acontece sem o aumento dos níveis dos nucleotídeos cíclicos. O relaxamento vascular promovido pelo EDHF ocorre através da ativação dos canais de K⁺ no músculo liso vascular, com consequente hiperpolarização da membrana (BUSSE *et al.*, 2002). A exata identidade química desses compostos ainda é desconhecida, porém os ácidos epoxieicosatrienóicos e moléculas como monóxido de carbono e peróxido de hidrogênio são possíveis candidatos (FLEMING, 2016; KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019).

A contribuição das respostas mediadas pelo EDHF aumenta à medida que diminui o calibre do vaso, além dos leitos vasculares coronários e renais, onde o EDHF desempenha um papel importante mesmo em artérias de condução (BUSSE *et al.*, 2002).

1.4. Potencial farmacológico de flavonoides para modulação da função vascular

Ao longo dos anos, os produtos naturais demonstraram sua relevância como fonte de medicamentos inovadores para doenças transmissíveis e não transmissíveis (THOMFORD *et al.*, 2018). O medicamento mais vendido dos últimos 25 anos continua sendo proveniente de um produto natural: a atorvastatina, utilizada no tratamento da hiperlipidemia (CRAGG e NEWMAN, 2020). Cragg e Newman (2020) demonstraram que houve uma queda na quantidade de pesquisas de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais, entretanto, a aprovação de medicamentos baseados em estruturas provenientes de produtos naturais permaneceu igual nos últimos cinco anos.

Estima-se que existam mais de 28.000 espécies de plantas com propriedades medicinais, sendo a maior parte ainda não estudada (ROYAL BOTANIC KEW GARDENS, 2017). Dentre os produtos naturais de origem vegetal, os metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos se destacam pela diversidade de

substâncias como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides e taninos (SOARES, 2002).

Os flavonoides são derivados de flavona e seu esqueleto básico consiste em dois anéis fenólicos A e B e um anel C. Algumas classes apresentam um grupo carbonila na posição C4 do anel C (Figura 3), como as isoflavonas e flavanonas. As atividades biológicas dos flavonoides estão diretamente relacionadas com a diversidade de suas estruturas químicas obtida durante a biossíntese com reações de esterificação, hidroxilação, glicosilação, entre outras (DEWICK, 2002; HARBORNE, 1994).

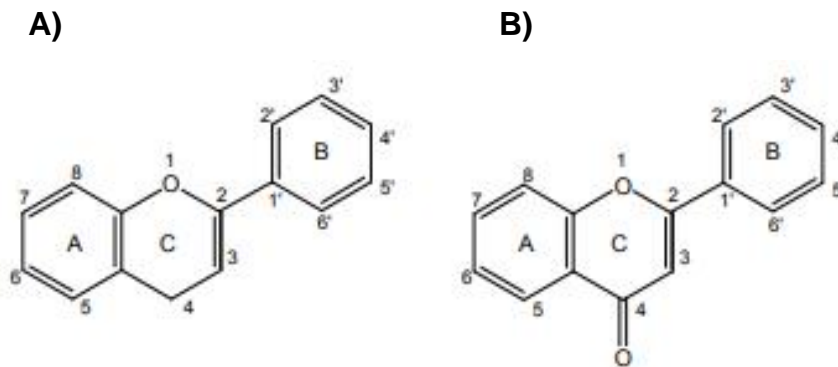


Figura 3: A) Estrutura química básica dos flavonoides. **B)** Estrutura química da flavona, classe de flavonoides que possuem o grupo carbonila no C4 (Adaptado DEWICK, 2002).

Um estudo de coorte observou uma associação inversa entre o consumo de chá verde, uma bebida rica em polifenóis, com as causas e mortalidade por DCVs (KURIYAMA *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos presentes no vinho tinto, como o resveratrol, provocam o aumento da expressão e da atividade da eNOS em células endoteliais (WALLERATH *et al.*, 2003).

Os flavonoides apresentam diversas atividades no sistema cardiovascular, entre elas: anti-inflamatória (MADESWARAN *et al.*, 2012; KARLSON *et al.*, 2007); antiagregante plaquetária (WU *et al.*, 2007); antioxidante (MIRSAFAEI *et al.*, 2020; VÁZQUEZ *et al.*, 2013) e vasodilatadora (LIU *et al.*, 2014; KAMKAEW *et al.*, 2019; SAPONARA, 2006). Os flavonoides podem produzir efeito vasodilatador através de diferentes mecanismos, por exemplo, pela ativação da produção NO pelas células endoteliais e por ação direta nas células do músculo liso vascular (KAMKAEW *et al.*, 2019).

1.5. *Kielmeyera membranacea*

O Brasil é o país que abriga a maior biodiversidade do planeta, representando 20-22% do total das espécies de plantas conhecidas no mundo, tendo cerca de 32.715 espécies de angiospermas (DUTRA *et al.*, 2016). No norte do Estado do Rio de Janeiro, o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba é um local de grande riqueza florística (LACERDA e ESTEVES, 2000), onde destacamos a espécie *Kielmeyera membranacea* Casar. (Calophyllaceae).

O gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul, sendo a maior parte das 48 espécies descritas na literatura encontradas apenas no Brasil. Espécies desse gênero são amplamente encontradas em todas as regiões do país, com uma proporção substancial no Sudeste (FLORA, 2019).

Diversas espécies do gênero *Kielmeyera* possuem ampla utilização popular para o tratamento de doenças tropicais, como leishmaniose, esquistossomose, e infecções fúngicas e bacterianas (ZAGOTO *et al.*, 2006). Entretanto, há pouco estudo para atividades cardiovasculares realizados com as espécies do gênero, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade Biológica de espécies vegetais do gênero *Kielmeyera*

Espécie	Parte Vegetal	Atividade Biológica	Referências
<i>K. aureovinosae</i>	Folha	Antibiótica	CARVALHO <i>et al.</i> , 2012
<i>K. coriacea</i>	Caule	Antidepressiva	OBICI <i>et al.</i> , 2008
<i>K. coriacea</i>	Casca da raiz	Antitumoral	MESQUITA <i>et al.</i> , 2001
<i>K. coriacea</i>	Galho	Antiprotozoário	CALEARE <i>et al.</i> , 2013
<i>K. coriacea</i>	Caule	Ansiolítica	BIESDORF <i>et al.</i> , 2012
<i>K. coriacea</i>	Folha	Antifúngica	CORTEZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. coriacea</i>	Casca	Antioxidante e Antibiótica	AQUINO <i>et al.</i> , 2013
<i>K. coriacea</i>	Folha	Antitumoral	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2014
<i>K. neglect</i>	Folha	Citotóxica	SOUZA <i>et al.</i> , 2012

<i>K. rugosa</i>	Caule	Antitumoral	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013
<i>K. rugosa</i>	Caule	Anti-hiperalgésica e Anti-inflamatória	MELO <i>et al.</i> , 2014
<i>K. variabilis</i>	Caule	Antibiótica	PINHEIRO <i>et al.</i> , 2003
<i>K. variabilis</i>	Folha	Antioxidante	COQUEIRO <i>et al.</i> , 2013

A composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* também tem sido estudada, sendo já identificada a presença de substâncias com atividades biológicas como esteroides (Sousa *et al.*, 2012), cumarinas (NOGUEIRA *et al.*, 2009), xantonas e terpenos (SOBRAL *et al.*, 2009). Também foram identificados 3 flavonoides derivados da quercetina na espécie *K. variabilis* com atividade antioxidante: quercitrina, hiperosídeo, e isoquercitrina (COQUEIRO *et al.*, 2016). A quercitrina apresenta um efeito vasodilatador (CALDERONE *et al.*, 2004), o hiperosídeo é um flavonoide glicosilado com atividade vasodilatadora dependente do endotélio (TAUBERT *et al.*, 2002), enquanto que e o isoquercitrina induz vasodilatação de forma dependente e independente do endotélio (JUNIOR *et al.*, 2016).

A espécie *K. membranacea* é encontrada nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, e embora não haja relato do seu uso na medicina tradicional, possui dois nomes populares: Pau-mandioca e Pequiá-amarelo. Essa espécie apresenta porte arbustivo e flores hermafroditas, folhas de coloração verde-escuro, forma elíptica, bordos lisos e consistência coriácea (Figura 3) (CORREA *et al.*, 2013; FLORA, 2019).



Figura 4: Imagem da espécie *K. membranacea* presente Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. (Fotografia realizada pelo laboratório Integrado de Pesquisa do Campus UFRJ-Macaé, 2013)

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato hidroalcoólico de folhas de *K. membranacea* (EFKM) apresenta intenso efeito vasodilatador em aortas isoladas de ratos (PAES, 2017). O estudo fitoquímico da fração em diclorometano do EFKM resultou na identificação do biflavonoide podocarpusflavona A (Figura 6A) (ARAUJO *et al.*, 2021). A podocarpusflavona A também já foi identificada na fração em acetato de etila do extrato etanólico das folhas da espécie *K. variabilis* (COQUEIRO *et al.*, 2013).

Os biflavonoides apresentam diversas propriedades biológicas, tais como: antibacteriana (LEE *et al.*, 2020), antitumoral (LI *et al.*, 2019), anti-hiperlipidêmica (LIAN *et al.*, 2018), anti-inflamatória (BANERJEE *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2019) e antioxidante (YAMAGUCHI *et al.*, 2005; WATERMAN *et al.*, 2017). A podocarpusflavona A é um derivado natural do biflavonoide amentoflavona (Figura 5B), onde um grupo hidroxila é substituído por um grupo metoxila (YU *et al.*, 2017). A amentoflavona é considerada um dímero de apigenina e apresenta diversas atividades biológicas, inclusive, efeitos terapêuticos no sistema cardiovascular (QIN *et al.*, 2018).

A podocarpusflavona A ainda é pouco estudada quanto aos seus efeitos biológicos, sendo descritas na literatura as atividades antibacteriana (BLAGA *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2021), inibidora de fosfodiesterase (CHAABI *et al.*, 2007), antimelanoma (MENG *et al.*, 2020) e anti-leishmania (MERCADO-CAMARGO *et al.*, 2020).

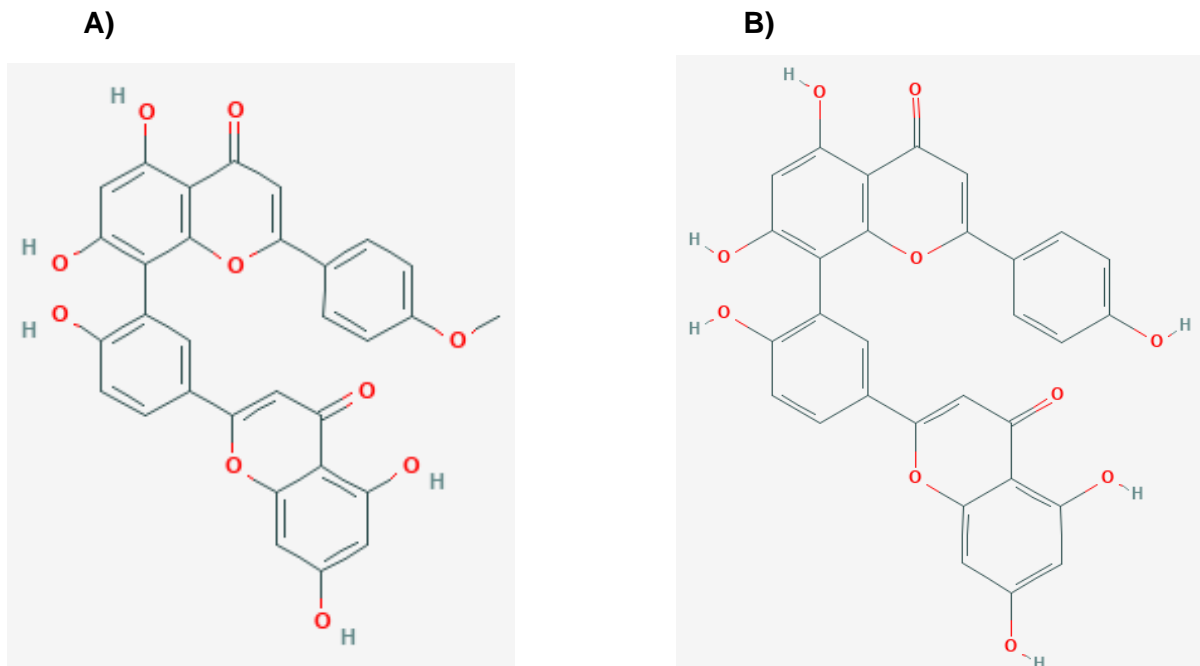


Figura 5: Estrutura química dos biflavonoides. Em A, estrutura química do biflavonoide podocarpusflavona A e em B, estrutura química do biflavonoide amentoflavona (PubChem, 2021).

Não há relatos na literatura sobre os efeitos cardiovasculares da podocarpusflavona A, despertando, portanto, o interesse em investigar se este biflavonoide possui atividade vasodilatadora e contribui para o efeito do EFKM.

2. JUSTIFICATIVA

As DCVs são a principal causal de morte no Brasil e no mundo (WHO, 2020), sendo caracterizadas por alterações vasculares morfológicas e/ou funcionais, como a disfunção endotelial (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020). Além disso, constituem um grande custo para o sistema de saúde pública, atingindo R\$ 37,1 bilhões no ano de 2015 (SIQUEIRA *et al.*, 2017), sendo indispensável a pesquisa e descoberta de novas substâncias que possam tratar e/ou prevenir o seu desenvolvimento.

Uma grande quantidade de medicamentos foi sintetizada ou isolada a partir de produtos naturais, incluindo medicamentos usados para o tratamento de DCVs (THOMFORD *et al.*, 2018). Entre eles estão o ácido acetilsalicílico, obtido a partir da salicina isolada da espécie vegetal *Salix alba* (JUNIOR *et al.*, 2006) e a digoxina, isolada da espécie vegetal *Digitalis purpurea* (Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda, 2018), ambos incluídos na relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) (BRASIL, 2021).

Considerando o potencial farmacológico dos flavonoides para a prevenção e tratamento de DCVs (CIUMĂRNEAN *et al.*, 2020) e o potente efeito vasodilatador descrito para o extrato hidroalcolico das folhas de *K. membranacea* (PAES, 2017), é de grande interesse a investigação do efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A. Este flavonoide ainda não havia sido identificado na espécie *K. membranacea* e não há descrição de efeitos cardiovasculares na literatura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a atividade vasodilatadora de produtos bioativos obtidos da espécie *K. membranacea* em aortas isoladas de ratos *Wistar*.

3.2. Objetivos específicos

- a) Investigar o efeito vasodilatador do extrato hidroalcolico do caule de *K. membranacea* e analisar comparativamente com o efeito o extrato hidroalcolico de folhas;
- b) Investigar o efeito vasodilatador da podocarpusflavona A, assim como seu mecanismo de ação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Os produtos vegetais utilizados nesse trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Bioativos do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé. A espécie vegetal *K. membranacea* foi coletada em dezembro de 2014 no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, sob licença SISBIO 39673-2. A identificação botânica foi realizada pela Dr^a Tatiana Ungaretti Paleo Konno e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Código botânico RFA38752).

Após coleta do material, este foi seco à temperatura ambiente, triturado, pesado e submetido à extração por maceração. Para o processo de extração utilizou-se etanol:água (7:3) em temperatura ambiente até o esgotamento total do material vegetal. Os extratos hidroalcoólicos da folha (EFKM) e do caule (ECKM) de *K. membranacea* foram filtrados após o término da extração e concentrados em um rotaevaporador sob pressão reduzida resultando nos extratos brutos.

A análise do ECKM e do EFKM por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicou a presença de um pico na região correspondente a substância podocarpusflavona A. O EFKM foi submetido à partição líquido/líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades: hexano PA, diclorometano PA, acetato de etila PA e butanol PA. A fração em diclorometano foi submetida a separação por CLAE com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD), onde foi identificado apenas um constituinte majoritário. Para identificar este constituinte, a fração foi submetida ao processo de fracionamento por cromatografia em coluna com sephadex LH-20, onde isolou-se o biflavonoide podocarpusflavona A, que foi identificado com base na análise dos dados de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e no perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD. O isolamento e identificação do flavonoide foram realizados pelo aluno Marlon Heggdorne de Araújo, em sua tese de doutorado.

4.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos, pesando entre 200-280 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório

Integrado de Pesquisa com controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12h/12h, com livre acesso à água e alimentação.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética com Animais de Experimentação do Campus UFRJ-Macaé, sob protocolo MAC068.

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

Os animais foram eutanasiados em câmara com atmosfera saturada com isoflurano. A porção torácica da aorta foi cuidadosamente dissecada e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (Composição: 118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 1,2 mM MgSO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 25 mM NaHCO_3 e 11 mM glicose), onde os tecidos conjuntivo e adiposo foram retirados e aorta foi dividida em 4 anéis com aproximadamente 3 mm de comprimento.

Os anéis da aorta foram posicionados entre duas hastes de aço inoxidável, sendo uma delas conectada a um transdutor de tensão isométrica, (MLT0201; ADInstruments, Bella Vista, New South Wales, Austrália) e colocados em cubas contendo 10 mL de solução Krebs Henseleit mantida constantemente gaseificada por uma mistura composta por 95% de O_2 e 5% de CO_2 , e aquecida a 37 °C (Figura 6). Os sinais gerados pelo transdutor foram digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise com o programa LabChart Pro (ADInstruments).

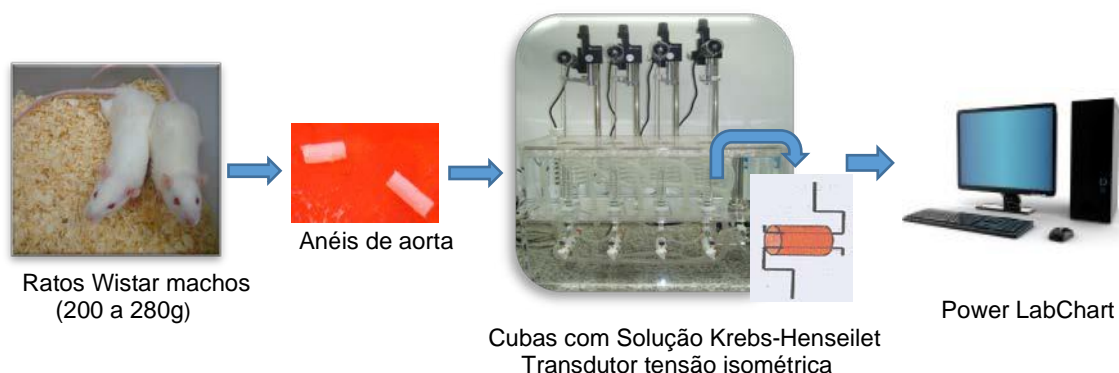


Figura 6: Figura esquemática dos procedimentos para o registro de tensão isométrica de anéis de aorta isolados de ratos *Wistar*.

Após o período de estabilização (90 minutos) da preparação a uma tensão de 1 g, foi verificada a integridade do endotélio. Induziu-se a contração do músculo liso vascular com a adição de 10 μM de fenilefrina na cuba, e após atingido o platô foram

adicionados 10 μM de acetilcolina, um vasodilatador dependente de endotélio. O endotélio foi considerado íntegro apenas quando o relaxamento promovido pela acetilcolina foi igual ou superior a 75%. Também foram utilizados anéis sem endotélio, cuja remoção foi realizada de forma mecânica e confirmada com relaxamento em resposta à acetilcolina igual ou inferior a 10%. Após o teste, realizou-se a troca da solução Krebs-Henseleit 3 vezes, de 10 em 10 minutos, para que a tensão retornasse ao estado basal (FERREIRA *et al.*, 2016).

4.4. Avaliação do efeito vasodilatador do ECKM e da podocarpusflavona A

Após a avaliação da integridade do endotélio, os anéis com e sem endotélio foram submetidos a uma nova contração induzida com 10 μM de fenilefrina e, estabelecido o platô, foram adicionadas concentrações cumulativas do ECKM (0,1 a 30 μM) ou da podocarpusflavona A (0,1 a 10 μM).

O ECKM e a podocarpusflavona A foram solubilizados em DMSO e em estudo controle realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa observou-se que este solvente não afetou a atividade vascular na concentração máxima utilizada (0,14%).

4.5. Investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador da podocarpusflavona A

Para avaliar o mecanismo de ação do efeito vasodilatador da podocarpusflavona A, foram utilizados anéis de aorta com endotélio pré-tratados por 15 minutos com diferentes inibidores.

O inibidor da NOS N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 100 μM) foi utilizado para avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora, enquanto para se verificar o envolvimento da GCs utilizou-se o inibidor 1H-(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ; 10 μM). O inibidor da PI3K wortmannin (0,3 μM) foi utilizado para avaliar o envolvimento da via PI3K/Akt na ativação da eNOS. Com o objetivo de analisar a participação da via PGI₂ utilizou-se a indometacina (10 μM), um inibidor da enzima ciclooxigenase (FERREIRA *et al.*, 2016).

4.6. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm E.P.M e representam o percentual de relaxamento em relação a contratatura máxima induzida por 10 μ M de fenilefrina. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). A concentração eficaz média (CE_{50}) do ECKM e da podocarpusflavona A foi determinada através de regressão não linear. Para múltiplas comparações foi utilizado o teste análise de variância (One-way – ANOVA), seguido de pós-teste Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que na HAS o tônus vascular encontra-se aumentado e a função endotelial alterada, novos fármacos que possam reduzir o tônus vascular e atenuar a disfunção endotelial são de interesse para prática clínica. Neste contexto, os metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais são fontes importantes de novas substâncias com ação no sistema cardiovascular (CRAGG e NEWMAN, 2020; PANCHER, 2016).

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o EFKM apresenta efeito vasodilatador em aorta isolada de ratos Wistar (PAES, 2017). O presente trabalho fez um estudo comparativo do efeito vasodilatador descrito previamente para o extrato de folhas com o efeito do extrato obtido do caule da planta. Além disso, investigou o efeito e o mecanismo de ação da biflavonoide podocarpusflavona A, o qual foi identificado nos dois extratos. Até onde sabemos, esta é a primeira descrição do efeito vasodilatador da podocarpusflavona A.

5.1. Efeito vasodilatador do ECKM

Para a avaliação do efeito vasodilatador do ECKM foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio preparados para registro de tensão isométrica. Na Figura 7 é possível observar um registro representativo de um experimento realizado com anel de aorta com endotélio (A) e outro realizado com aorta sem endotélio (B). A contração do músculo liso vascular foi induzida com a adição de 10 μM de fenilefrina e, após atingido o platô, foram adicionadas concentrações cumulativas do ECKM (1 a 30 $\mu\text{g/mL}$).

O ECKM promoveu relaxamento da musculatura lisa vascular de forma dependente da concentração, sendo de $78,7 \pm 2,5 \%$ ($P < 0,05$) na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Em aortas sem endotélio o efeito vasodilatador do ECKM foi totalmente inibido (Figura 8). Resultados similares foram descritos para o EFKM, o qual também somente apresentou atividade vasodilatadora em aortas com endotélio, com relaxamento máximo de $88,3 \pm 3,8 \%$ na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (PAES, 2017).

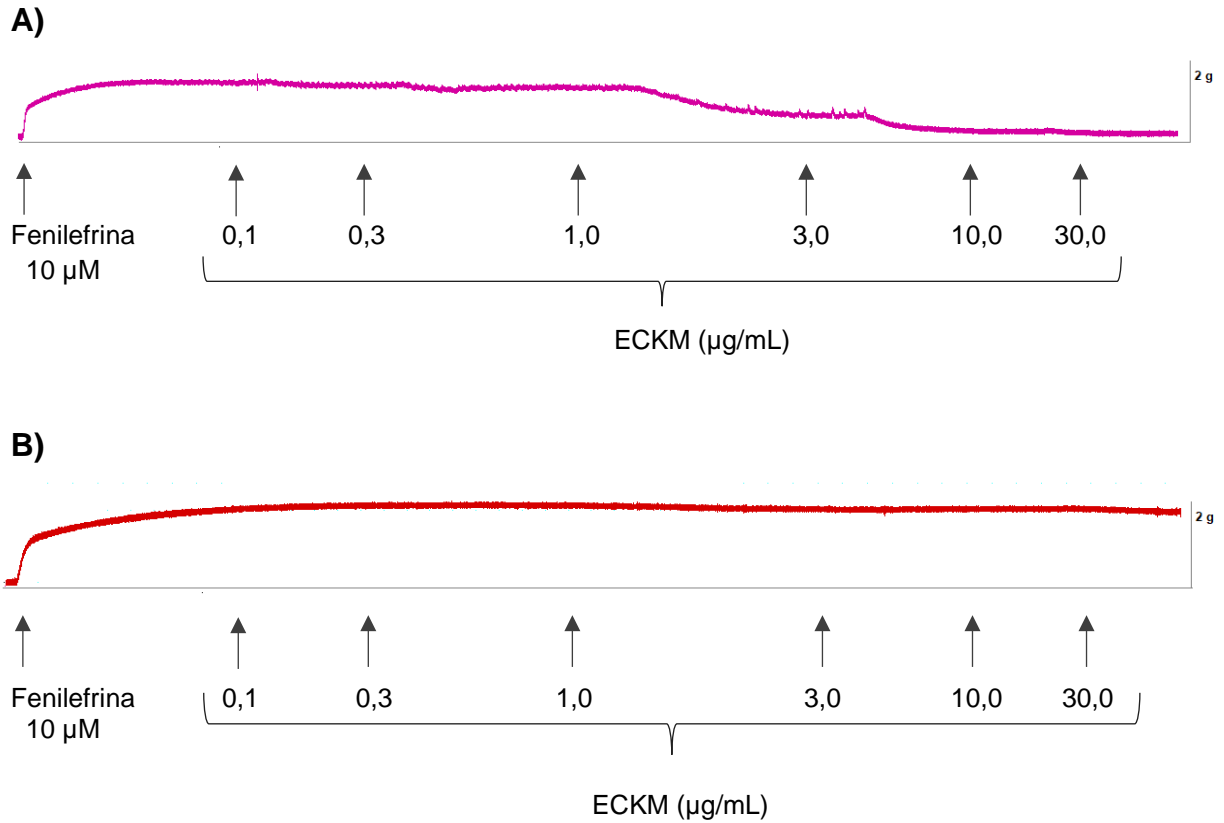


Figura 7: Registro de tensão isométrica de anel aórtico pré-contraído com fenilefrina e exposto a concentrações cumulativas de ECKM. Em A, aorta com endotélio íntegro e em B, anel sem endotélio.

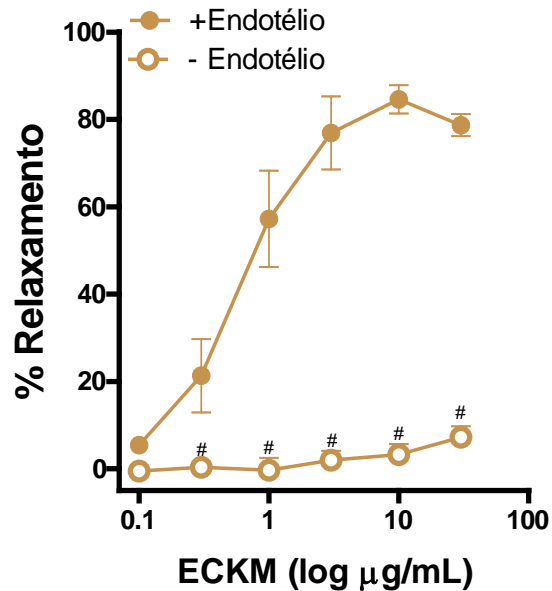


Figura 8: Efeito vasodilatador do extrato hidroalcoólico do caule de *K. membranacea*. Curvas concentração-resposta em anéis de aorta com ($n=6$) e sem endotélio ($n=8$) para o ECKM. Os dados representam a média \pm E.P.M. # $P<0,05$ comparado a + endotélio.

Os produtos naturais de origem vegetal apresentam efeito vasodilatador através de diversos mecanismos que podem ser dependentes e/ou independentes do endotélio (LUNA-VÁZQUEZ *et al.*, 2013). Para os flavonoides estão descritos mecanismos que envolvem uma ação direta no músculo liso vascular, como a ativação dos canais de K⁺, o bloqueio dos canais de Ca²⁺ tipo L e a inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (LIU *et al.*, 2014; SAPONARA *et al.*, 2009), e mecanismos dependentes do endotélio. A maior parte dos flavonoides exerce seus efeitos vasculares de forma dependente do endotélio através da via NO/GMPc (CIUMĂRNEAN *et al.*, 2020).

Ambos os extratos de *K. membranacea* atuam através da ativação da síntese de fatores vasodilatadores derivados do endotélio. Entretanto, quando comparada a CE₅₀ dos extratos em aortas com endotélio, observa-se uma diferença entre os resultados. O EFKM apresentou CE₅₀ de 3,2 ± 0,5 µg/mL (PAES, 2017), enquanto o ECKM apresentou CE₅₀ de 0,6 ± 0,1 µg/mL, indicando que o extrato de caule apresenta maior potência vasodilatadora. Esta diferença provavelmente está relacionada ao perfil químico dos extratos, pois apesar de pertencerem à mesma espécie vegetal, sabe-se que existem diversos metabólitos secundários entre as diferentes partes de uma planta (BORGES e AMORIM, 2020).

Quando analisados por CLAE, EFKM e ECKM apresentaram um perfil cromatográfico diferente. Por exemplo, o biflavonoide podocarpusflavona A está presente em maior quantidade no extrato das folhas, como mostrado na Tabela 2 (ALVES, 2018). Portanto, a maior potência vasodilatadora do ECKM parece estar relacionada à presença de outro(s) metabólito(s) secundário(s).

Tabela 2 - Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência da podocarpusflavona A no EFKM e no ECKM

Amostra	Área	Concentração (µg/mg de extrato)
ECKM	40645	1,4025
EFKM	405163	6,5919

5.2. Efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A

A podocarpusflavona A promoveu relaxamento da musculatura lisa vascular de forma dependente da concentração em anéis de aorta com endotélio, com efeito máximo de $77,2 \pm 3,6$ % na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, equivalente a $18,1 \mu\text{M}$, e CE_{50} de $1,8 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ (Figura 9).

Até onde sabemos, esta é a primeira descrição da atividade vasodilatadora da podocarpusflavona A. Um estudo identificou a presença deste biflavonoide na espécie *Allanblackia monticola* e demonstrou que o extrato bruto de suas folhas produz um efeito vasodilatador dependente da concentração em anéis aórticos. No entanto, a podocarpusflavona A não foi estudada isoladamente (AZEBAZE *et al.*, 2007).

Para avaliar a participação do endotélio na resposta vasodilatadora da podocarpusflavona A, foram realizados experimentos em anéis de aorta sem endotélio. A remoção do endotélio inibiu completamente a ação da podocarpusflavona A, demonstrando que a ação vasodilatadora depende da presença do endotélio, como observado para os extratos de folha e de caule.

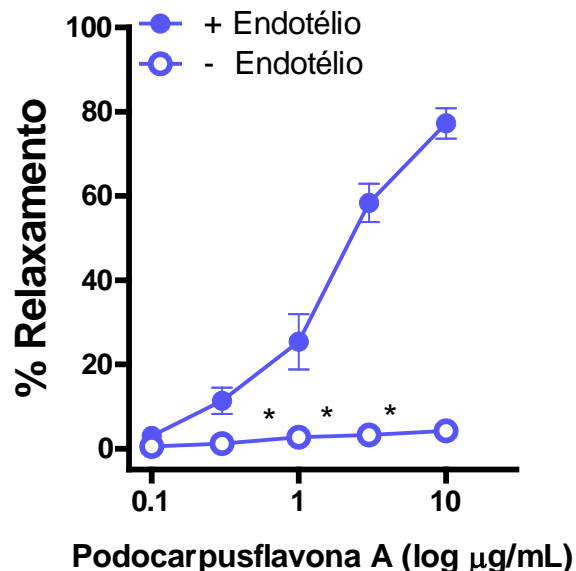


Figura 9: Efeito vasodilatador biflavonoide podocarpusflavona A. Curvas concentração-resposta em anéis de aorta com ($n= 10$) e sem endotélio ($n= 6$). * $P<0,05$ comparado ao endotélio.

5.3. Análise do mecanismo de ação do efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A

A significativa contribuição do endotélio para o efeito vasodilatador da podocarpusflavona A indica que o efeito vasodilatador é mediado por fatores derivados do endotélio. Portanto, o estudo do mecanismo de ação foi realizado em anéis de aorta com endotélio pré-tratados durante 15 minutos com diferentes inibidores farmacológicos, focando na via NO/GMPc e na via da PGI₂.

5.3.1. Participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A

Para investigação da participação da via do NO/GMPc no efeito vasodilatador da podocarpusflavona A, anéis de aorta com endotélio foram pré-tratados com L-NAME, inibidor da eNOS, ou com ODQ, inibidor da GCs.

O relaxamento promovido pela podocarpusflavona A foi completamente inibido na presença de L-NAME ou de ODQ ($P < 0,05$; Figura 10), indicando que a via NO/GMPc é crucial no efeito vasodilatador da podocarpusflavona A. De forma semelhante, a via NO/GMPc é a principal responsável pelo efeito vasodilatador do EFKM (PAES, 2017), corroborando a participação da podocarpusflavona A no efeito do extrato.

O NO se difunde rapidamente para o músculo liso vascular promovendo a vasodilatação através da ativação da GCs, que aumenta os níveis de GMPc com posterior ativação da PKG, resultando no relaxamento do músculo liso vascular (LUCAS *et al.*, 2000; VANHOUTTE, 2016).

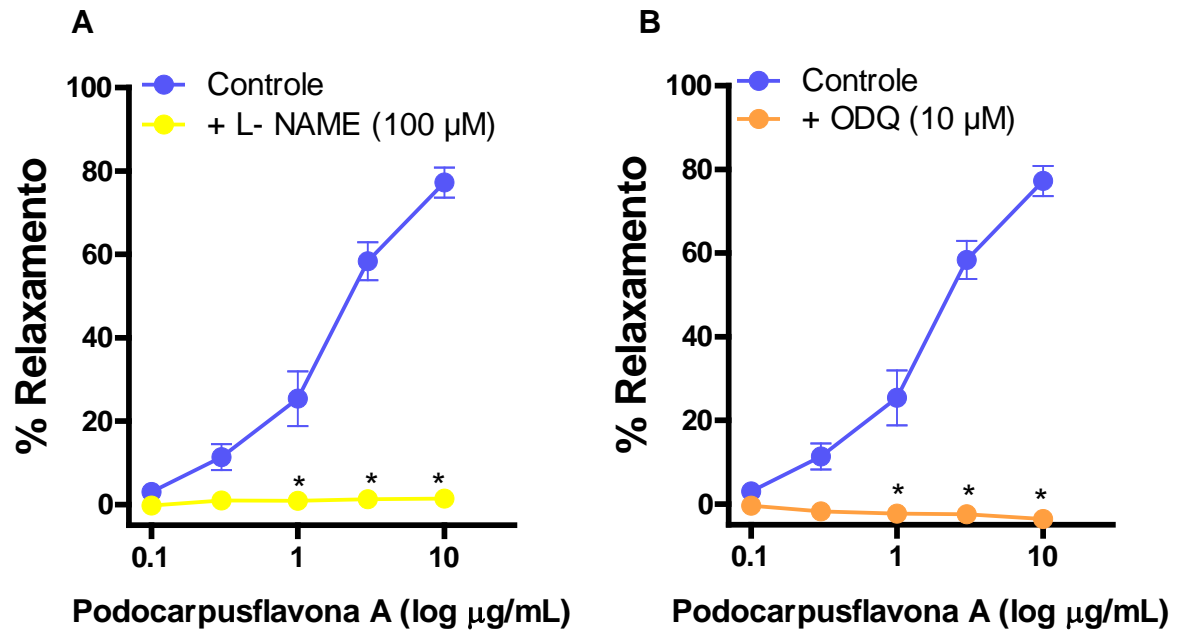


Figura 10: Participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A. Curvas concentração-resposta para podocarpusflavona A em aortas com endotélio na ausência (n= 10). Em A, anéis na presença de L-NAME (A; n= 6) e em B, anéis na presença de ODQ (B; n= 6). *P<0,05 comparado ao controle.

Além da podocarpusflavona A, outros flavonoides, como a luteolina e apigenina apresentam atividade vasodilatadora através do mesmo mecanismo de ação, pela via NO/GMPc (KAMKAEW *et al.*, 2019). A amentoflavona, precursora da podocarpusflavona A, também exerce efeito vasodilatador em aortas torácica de ratos, de forma dependente do endotélio e com envolvimento do NO (XU e YIN, 2009). Outro estudo mostrou que o ginkgetin, um biflavonoide presente na espécie *Ginkgo biloba*, é capaz de regular os níveis de NO em aortas torácicas de ratos com aterosclerose, estimulando o aumento da expressão da eNOS (LIAN *et al.*, 2018).

Sabe-se que a ativação da eNOS pode ocorrer mediante a ligação do complexo Ca^{2+} /calmodulina à enzima, como resultado do aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Entretanto, outra via importante de ativação da eNOS é a via PI3K/Akt, a qual promove a ativação da eNOS por meio da fosforilação do resíduo Ser¹¹⁷⁷. A fosforilação deste resíduo torna a eNOS mais sensível ao complexo Ca^{2+} /calmodulina e como consequência ocorre um aumento na produção de NO, mesmo em baixa concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012). Então, em seguida foi avaliada a participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS através do pré-tratamento de anéis de aorta com endotélio com o wortmannin, inibidor da PI3K.

Na presença de wortmanin, o relaxamento máximo induzido pela podocarpusflavona A não foi alterado. Entretanto, houve um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, o que resultou em aumento da CE_{50} de $1,8 \pm 0,8$ para $5,0 \pm 0,9$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Estes resultados indicam que o mecanismo de ativação eNOS envolve parcialmente a via PI3K/Akt.

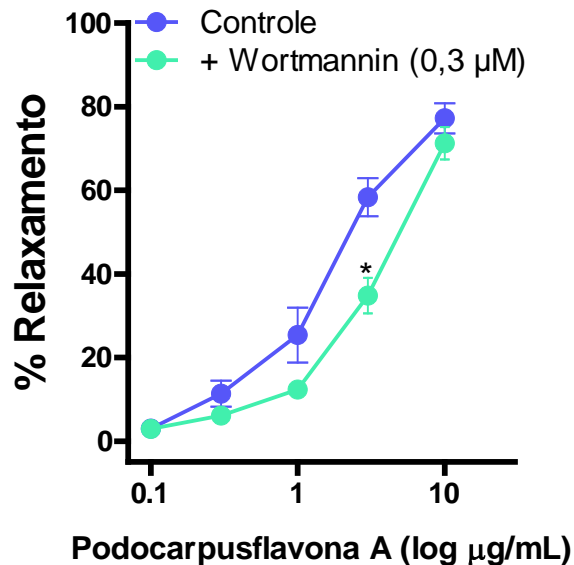


Figura 11: Participação da via PI3K/Akt no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A. Curvas concentração-resposta para podocarpusflavona A em aortas com endotélio na ausência (n= 10) e presença de wortmannin (n= 6). *P<0,05 comparado ao controle.

Outros flavonoides também ativam a produção de NO através da via PI3K/Akt, como a apigenina (CHEN *et al.*, 2010), a genisteína (PROSSNITZ e ARTERBURN, 2015) e os flavonóides totais do *Astragalus*, presentes na raiz da espécie *Astragalus alleviate* (LIU *et al.*, 2018).

Como foi observado somente um pequeno deslocamento da curva concentração-resposta da podocarpusflavona A, sem alteração do efeito máximo, na presença de wortmannin, a ativação da eNOS parece ser mediada principalmente por mecanismos dependentes do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012). Este aumento poderia ser provocado, por exemplo, pela ativação de receptores endoteliais que levam o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como o receptor muscarínico M3 e o receptor de histamina H1 (MAGUIRE e DAVENPORT, 2005). Mais estudos são necessários para identificar quais receptores estão envolvidos no efeito vasodilatador da podocarpusflavona A.

5.3.2. Avaliação da participação da PGI₂ no efeito vasodilatador da Podocarpusflavona A

A PGI₂ é outro vasodilatador derivado do endotélio que possui um papel importante na manutenção da homeostasia vascular (FURGHOGOTT e VANHOUTTE, 1989). Portanto, além de avaliar o envolvimento do NO, investigou-se também a participação da PGI₂, no mecanismo de ação da podocarpusflavona A. Para isto usou-se anéis de aorta com endotélio pré-tratados com indometacina, um inibidor da ciclooxigenase.

Como mostrado na Figura 12, a exposição prévia dos anéis de aorta à indometacina não inibiu o efeito vasodilatador da podocarpusflavona A e apresentou uma CE₅₀ de $1,55 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$, indicando que a PGI₂ não está envolvida no mecanismo de ação do biflavonoide.

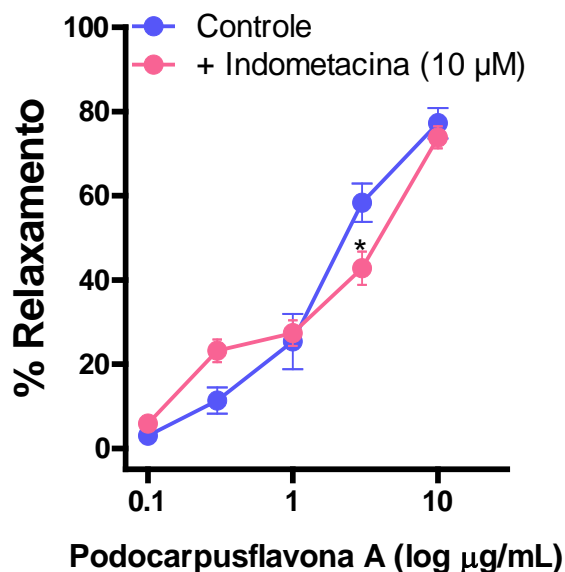


Figura 12: Participação da via PGI₂ no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A. Curvas concentração-resposta para podocarpusflavona A em aortas com endotélio na ausência (n= 10) e presença de indometacina (n= 7) *P<0,05 comparado ao controle.

5.3.3. Outros possíveis mecanismos de ação da podocarpusflavona A

Além de fatores vasodilatadores derivados do endotélio, outro mecanismo pode estar envolvido na ação da podocarpusflavona A. Os níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc são determinados pela sua taxa síntese pela GC e pela adenilato ciclase, respectivamente, e pela sua taxa de hidrólise pelas PDEs

(LUCAS *et al.*, 2000). Chaabi e colaboradores (2007) mostraram que a podocarpusflavona A é um potente inibidor das PDEs 1, 2, 4 e 5, com concentração inibitória média (CI_{50}) variando entre 0,5 e 1,2 μ M. A PDE 1, a qual degrada AMPc e GMPc, a PDE4, específica para AMPc, e a PDE5, específica para GMPc, estão presentes no músculo liso vascular (LUCAS *et al.*, 2000). Como os nucleotídeos cíclicos tem papel importante na modulação do tônus vascular, a inibição destas enzimas pode contribuir para o efeito vasodilatador deste biflavonoide.

Portanto, novos estudos ainda precisam ser realizados para se estabelecer todos os mecanismos envolvidos no efeito vasodilatador do biflavonoide podocarpusflavona A.

6. CONCLUSÃO

- ✓ O ECKM provocou intenso relaxamento vascular de forma dependente da do endotélio, sendo mais potente que o EFKM;
- ✓ O biflavonoide podocarpusflavona A produziu intenso relaxamento vascular em aortas com endotélio, sendo este efeito mediado pelo NO e sem participação da PGI₂;
- ✓ A ativação da produção endotelial de NO envolve parcialmente a via PI3K/Akt;
- ✓ O biflavonoide podocarpusflavona A é um dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade vasodilatadora do ECKM e do EFKM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N. S. Identificação de flavonoides e quantificação de podocarpusflavona a em diferentes extratos de *Kielmeyera membranacea*. **Relatório apresentado como requisito para aprovação na Disciplina de Iniciação Científica**, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

ANDERSEN, O. M., MARKHAM, K. R. Flavonoids – **Chemistry, Biochemistry and Applications**, CRC Taylor Francis, 2006.

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.

ARAUJO, M. H. D., SIMÃO, T. L. B. V., KONNO, T. U. P., GUIMARÃES, D. O., LEAL, I. C. R., LASUNSKAIA, E., MUZITANO, M. F. Anti-mycobacterial and anti-inflammatory activity of restinga plants: a dual approach in searching for new drugs to treat severe tuberculosis. **Rodriguésia**, v. 72, p. 1-13, 2021.

AZEBAZE, A. G. B., DONGMO, A. B., MEYER, M., OUAHOUBO, B. M. W., VALENTIN, A., LAURE NGUEMFO, E., VIÉRLING, W. Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 23-30, 2007.

BANERJEE, T., VALACCHI, G., ZIBOH, V. A., VAN DER VLIET, A. Inhibition of TNF α -induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF- κ B activation in A549 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 238, n. 1, p. 105-110, 2002.

BORGES, L. P., AMORIM, V. L., Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BOURBON, M., MIRANDA, N., VICENTE, A.M., RATO, Q. **Doenças Cardiovasculares: sabe como prevenir?** Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3447/3/Doen%C3%A7as%20Cardiovasculares.pdf>> Acesso em: out. 2019.

BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/assistencia-farmaceutica-no-sus/renome>>. Acesso em: agosto de 2021.

BUSSE, R., EDWARDS, G., FÉLÉTOU, M., FLEMING, I., VANHOUTTE, P.M., WESTON, A.H. EDHF: bringing the concepts together. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 8, p. 374-380, 2002.

CALDERONE, V., CHERICONI, S., MARTINELLI, C., TESTAI, L., NARDI, A., MORELLI, I., MARTINOTTI, E. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 370, n. 4, p. 290-298, 2004.

CARAMORI, P. A., ZAGO, A.J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 15, n. 2, p. 163-172, 2000.

- CARVALHO, M. H. C., NIGRO, D., LEMOS, V. S., TOSTES, R. D. C. A., & FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 8, p. 76-88, 2011
- CHAABI, M., ANTHEAUME, C., WENIGER, B., JUSTINIANO, H., LUGNIER, C., and LOBSTEIN, A. Biflavones of *Decussocarpus rospigliosii* as phosphodiesterases inhibitors. **Planta Medica**, v. 73, p. 1284-1286, 2007.
- CHEN, C. C., KE, W. H., CENG, L. H., HSIEH, C. W., & WUNG, B. S. Calcium-and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin. **Life Sciences** v. 87, n. 23-26, p. 743-749, 2010.
- CIUMĂRNEAN, N, L., MILACIU, M. V., RUNCAN, O., VESA, Ș. C., RĂCHIȘAN, A. L., NEGREAN, V., PERNÉ, M. G., DONCA, V. I., ALEXESCU, T. G., PARA, I., DOGARU, G. The effects of flavonoids in cardiovascular diseases. **Molecules**, v. 25, n.18, 2020.
- 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.
- CORTEZ, D.A.G., YOUNG, M.C.M., MARSTON, A., WOLFENDER, J.L. e HOSTETTMANN, K. Xanthonés, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v.47, n.7, p. 1367-1374, 1998.
- COWLEY, A.W.J. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 11, p. 829-84, 2006.
- 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.
- DAVIGNON, J., GANZ, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, p. III-27-III-32Du, 2004.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**, 3rd Edition, 2009.
- DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p. 4–29, 2016.
- EBEIGBE, A. B., ARISHE O.O. Mechanisms of vasodilation induced by medicinal plants: a mini-review. **Tropical Journal of Natural Product Research** v.1, n. 3, p. 97-99, 2017
- FÉLETOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 545-562, 2009.

- FÉLÉTOU, M., HUANG, Y., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011.
- FÉLÉTOU, M., VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H985–H1002, 2006.
- FERNANDEZ-TENORIO, M., PORRAS-GONZALEZ, C., CASTELLANO, A., DEL VALLE-RODRIGUEZ, A., LOPEZ-BARNEO, J., URENA, J. Metabotropic regulation of RhoA/Rho-Associated kinase by L-type Ca²⁺ channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. **Circulation Research**, v. 108, n. 11, p. 1348–1357, 2011
- FERREIRA, L. L. D. M., GOMES, M. V., PAES, B. M., DO CARMO, P. L., KONNO, T. U. P., DE ASSIS ESTEVES, F., ... RAIMUNDO, J. M. The hydroalcoholic extract of leaves of *Mandevilla moricandiana* induces NO-mediated vascular relaxation. **Planta medica**, v. 83, n. 01/02, p. 63-69, 2017.
- FIGUEIREDO, C. R., MATSUO A. L., MASSAOKA M. H., GIROLA N., AZEVEDO R. A., RABAÇA A. N., FARIAS C. F., PEREIRA F. V., MATIAS N. S., SILVA L. P., RODRIGUES E. G., LAGO J. H. G., TRAVASSOS L. R., SILVA R. M. G. Antitumor activity of *Kielmeyera coriacea* leaf constituents in experimental melanoma, tested *in vitro* and *in vivo* in syngeneic mice. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 429-436, 2014.
- FLEMING, I. The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling. **Vascular Pharmacology**, v. 86, p. 31–34, 2016
- FÖRSTERMANN, U., SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v.33, n.7, p.829-837, 2012.
- FURCHGOTT R, F., VANHOUTTE P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v.3, p.2007-2018, 1989.
- GILES, T. D., SANDER G. E., NOSSAMAN B. D., KADOWITZ P. J. Impaired vasodilatation in the pathogenesis of hypertension: Focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 198-205, 2012.
- GUYTON, A. C., HALL J. E. **Tratado de Fisiologia Médica, 12ª edição**. Editora Elsevier Brasil, p. 551, 2011.
- HARBORNE, J.B. **Comparative biochemistry of flavonoids**. Academic Press Inc., London. 1967.
- HUMPHREY, J. D., HARRISON, D. G., FIGUEROA, C. A., LACOLLEY, P., LAURENT, S. Central artery stiffness in hypertension and aging: a problem with cause and consequence. **Circulation Research**, v. 118, n. 3, p. 379-381, 2016.
- JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, 173–178, 2000.
- 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.

- JUNIOR, A. G., REIS, R. P., ASSREUY, J., DA SILVA-SANTOS, J. E. Nitric oxide and Kir6. 1 potassium channel mediate isoquercitrin-induced endothelium-dependent and independent vasodilation in the mesenteric arterial bed of rats. **European journal of pharmacology**, v. 788, p. 328-334, 2016.
- KAMKAEW, N., PARACHA, T. U., INGKANINAN, K., WARANUCH, N., CHOOTIP, K. Vasodilatory effects and mechanisms of action of *Bacopa monnieri* active compounds on rat mesenteric arteries. **Molecules**, v. 24, n.12, 2019.
- KARLSEN, A., RETTERSTØL, L., LAAKE, P., PAUR, I., KJØLSRUD-BØHN, S., SANDVIK, L., BLOMHOFF, R. Anthocyanins inhibit nuclear factor-κB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p.1951-1954, 2007
- KATZ, L., BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 43, p.155-176, 2016.
- KHAN, M. T. H., ORHAN, I., ŞENOL, F. S., KARTAL, M., ŞENER, B., DVORSKÁ, M., ŠLAPETOVÁ, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, 2009
- KONUKOGLU, D., UZUN, H. Endothelial dysfunction and hypertension. **Hypertension: From Basic Research to Clinical Practice**, p. 511–540, 2016.
- KRÜGER-GENGE, A., BLOCKI, A., FRANKE, R. P., JUNG, F. Vascular endothelial cell biology: an update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4411, p.1-21, 2019.
- KURIYAMA, S., SHIMAZU, T., OHMORI, K., KIKUCHI, N., NAKAYA, N., NISHINO, Y., TSUJI, I. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. **JAMA**, v. 296, n. 10, p. 1255-1265, 2006.
- LACERDA, L.D., ESTEVES, F.A. **Restingas brasileiras: quinze anos de estudo**. In: Esteves, F. E Lacerda, L.D. (Eds). *Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras*. NUPEM/UFRJ-RJ. 2000.
- LECOUR, S., LAMONT, K.T. Natural polyphenols and cardioprotection. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1191-1199, 2011.
- LEE, J., KIM, M., JEONG, S. E., PARK, H. Y., JEON, C. O., PARK, W. Amentoflavone, a novel cyanobacterial killing agent from *Selaginella tamariscina*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 2020.
- LEMO, L.M., MARTINS, T. B., TANAJURA, G. H., GAZONI, V. F., BONALDO, J., STRADA, C. L., SILVA, M. G., DALL'OGGIO, 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.
- LI, A., LI, S., ZHANG, Y., XU, X., CHEN, Y., LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047, 2014.
- LI, M., LI, B., XIA, Z. M., TIAN, Y., ZHANG, D., RUI, W. J., XIAO, F. J. Anticancer effects of five biflavonoids from *Ginkgo biloba* L. male flowers in vitro. **Molecules**, v. 24, n. 8, 2019.

LIAN, N., TONG, J., LI, W., WU, J., LI, Y. Ginkgetin ameliorates experimental atherosclerosis in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.102, p. 510-516, 2018.

LIU, Q., ZHANG, L., SHAN, Q., DING, Y., ZHANG, Z., ZHU, M., MAO, Y. Total flavonoids from *Astragalus alleviate* endothelial dysfunction by activating the Akt/eNOS pathway. **Journal of International Medical Research** v. 46, n. 6, p. 2096-2103, 2018.

LIU, Y., NIU, L., CUI, L., HOU, X., LI, J., ZHANG, X., ZHANG, M. Hesperetin inhibits rat coronary constriction by inhibiting Ca^{2+} pinflux and enhancing voltage-gated k^+ channel currents of the myocytes. **European Journal of Pharmacology**, v.735, p.193–201, 2014.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.D.; NAGEM, T.J.; PINTO A.D.S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2010.

LUCAS, K.A., PITARI, G.M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K.P., WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 375–413, 2000.

MAGUIRE, J.J., DAVENPORT, A.P. Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRS. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 9, 2005.

MENG, H., PANG, Y., LIU, G., LUO, Z. TAN, H., LIU, X. Podocarpusflavone A inhibits cell growth of skin cutaneous melanoma by suppressing STAT3 signaling. **Journal of Dermatological Science**, v.100, n.3, p. 201-208, 2020.

MERCADO-CAMARGO, J., CERVANTES-CEBALLOS, L., VIVAS-REYES, R., PEDRETTI, A., SERRANO-GARCÍA, M. L., GÓMEZ-ESTRADA, H. Homology modeling of leishmanolysin (gp63) from *Leishmania panamensis* and molecular docking of flavonoids. **ACS omega**, v.5, p.14741-14749, 2020.

MESQUITA, M. L., ARAÚJO, R. M., BEZERRA, D. P., BRAZ FILHO, R., DE PAULA, J. E., SILVEIRA, E. R., ESPINDOLA, L. S. Cytotoxicity of d-tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 623-630, 2010.

MICHE, L T., VANHOUTTE, P.M. Cellular signaling and NO production. **European Journal of Physiology**, v. 459, p. 807–816, 2010.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; **Podocarpusflavone A**, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5320644>. Acesso em: 01 jun. 2021.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; **Amentoflavone**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amentoflavone>. Acesso em: agosto de 2021.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v.83, n.3, p.770-803, 2020.

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.

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, CALEARE, A., LAZARIN-BIDÓIA, D., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., DE OLIVEIRA SILVA, S., NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera coriácea*. **Parasitology International**, v. 62, p. 405–411, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Doenças Cardiovasculares**. Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não transmissíveis e Saúde Mental, 2016. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839> Acesso em: outubro 2019.

PAES, B. M. **Investigação do potencial farmacológico de *Kielmeyera membranacea* para a redução da disfunção vascular**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

PANCHE, A. N., DIWAN, A. D., CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PARKINGTON, H. C., COLEMAN, H. A., TARE M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 509-514, 2004.

PINHEIRO, L., NAKAMURA, C.V., FILHO, B.P.D., FERREIRA A.G., YOUNG M.C.M., CORTEZ D.A.G. Antibacterial Xanthenes from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.4, p.549-552, 2003.

PROSSNITZ, E. R., & ARTERBURN, J. B. International union of basic and clinical pharmacology. XCVII. G protein–coupled estrogen receptor and its pharmacologic modulators. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 3, p. 505-540, 2015.

QIN B., ZHOU J. Src family kinases (SFK) mediate angiotensin II-induced myosin light chain phosphorylation and hypertension. **Plos One**, v. 10, n. 5, 2015.

QIN, L., ZHAO, Y., ZHANG, B., LI, Y. Amentoflavone improves cardiovascular dysfunction and metabolic abnormalities in high fructose and fat diet-fed rats. **Food & function**, v. 9, n. 1, p. 243-252, 2018.

ROHDE, L. E. P., MONTERA, M. W., BOCCHI, E. A., CLAUSELL, N. O., ALBUQUERQUE, D. C. D., RASSI, S., MARTINS, W. D. A. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 3, p. 436-539, 2018.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Estado das Plantas do Mundo**, 2 ed. Disponível em: <<http://www.kew.org/>> Acesso em: setembro 2019.

SAFAR, M. E., ASMAR, R., BENETOS, A., BLACHER, J., BOUTOUYRIE, P., LACOLLEY, P. Interaction between hypertension and arterial stiffness: an expert reappraisal. **Hypertension**, v. 72, n. 4, p. 796-805, 2018.

SANTOS, R. A. O., OLIVEIRA, C. P., OLIVEIRA, G. A., ROSÁRIO, A. Use of medicinal plants as coping strategies of the most common diseases in the southern state of Roraima. **Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia, Porto Alegre/RS**, 2013.

SAPONARA, S., TESTAI, L., IOZZI, D., MARTINOTTI, E., MARTELLI, A., CHERICONI, S., CALDERONE, V. Naringenin as large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 8, p. 1013–1021, 2009.

SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D., KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v.359, p. 843-5, 1992.

SIQUEIRA, A. D. S. E., SIQUEIRA-FILHO, A. G. D., LAND, M. G. P. Analysis of the economic impact of cardiovascular diseases in the last five years in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n.1, p. 39-46, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Cardiômetro da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/default.asp>>. Acesso em: outubro de 2020.

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. 11, n. 20, p. 11-20, 2012.

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.

TAUBERT, D., BERKELS, R., KLAUS, W., ROESEN, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 701-713, 2002.

THOMFORD, N., SENTHEBANE, D., ROWE, A., MUNRO, D., SEELE, P., MAROYI, A., DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.6, 2018.

TOUYZ, R. M., ALVES-LOPES, R., RIOS, F. J., CAMARGO, L. L., ANAGNOSTOPOULOU, A., ARNER, A., MONTEZANO, A. C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529-539, 2018.

TRAD, R.J. 2020. *Kielmeyera in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6855>>. Acesso em: setembro. 2021

VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 6, p. 503-508, 2004.

VANHOUTTE, P. M., ZHAO, Y., XU, A., LEUNG, S. W. S. Thirty years of saying NO. **Circulation Research**, v. 119, n. 2, p. 375-396, 2016

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.

WAIB, P. H., BURINI, R. C. Fundamentos bioquímicos da modulação do tono vascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 56, n. 5, p. 407-412, 1991

WALLERATH, T., POLEO, D., LI, H., FÖRSTERMANN, U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 3, p. 471-478, 2003.

WANG, Y., REN, Y., XING, L., DAI, X., LIU, S., YU, B., WANG, Y. Endothelium-dependent vasodilation effects of Panax notoginseng and its main components are mediated by nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n.6, p. 3998–4006, 2016

WATERMAN, M. J., NUGRAHA, A. S., HENDRA, R., BALL, G. E., ROBINSON, S. A., KELLER, P. A. Antarctic moss biflavonoids show high antioxidant and ultraviolet-screening activity. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 8, p. 2224-2231, 2017.

WEISS, A., BELOOSESKY Y., GROSSMAN A., SHLESINGER A., KOREN-MORAG N., GROSSMAN E. The association between orthostatic hypertension and all-cause 72 mortality in hospitalized elderly persons. **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 13, p. 239-243, 2016.

WORLD HEART FEDERATION (WHF). WHAT IS CARDIOVASCULAR DISEASE? Disponível em: < <https://world-heart-federation.org/world-heart-day/cvd-causes-conditions/what-is-cvd/>> Acesso em: outubro 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cardiovascular Diseases. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1. Acesso em: agosto 2020.

XU, L., YIN, M. H. Experiment study on vasodilative effects of amentoflavone ethyl acetate extract of *Selaginella tamariscina*. **Journal of Medical Science Yanbian University**, v. 4, 2009.

YAMAGUCHI, L. F., VASSÃO, D. G., KATO, M. J., DI MASCIO, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 6, n.18, p. 2238-2247, 2005.

YAO, L. H., JIANG, Y. M., SHI, J. 2, TOMAS-BARBERAN, F. A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

YU, S., YAN, H., ZHANG, L., SHAN, M., CHEN, P., DING, A., LI, S. F. Y. A review on the phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of amentoflavone, a naturally-occurring biflavonoid. **Molecules**, v. 22, n. 229, p. 1-23, 2017.

YUGAR-TOLEDO, J.C., CESTÁRIO, E.E.S., JOSÉ FERNANDO VILELA-MARTIN, J.F., Hipertensão e acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 25, n.4, p. 130-135, 2019.

ZAGO, A. S., ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. E264-E270, 2006.

ZHANG, H., LIU, H., CHEN, Y., ZHANG, Y. The curcumin-induced vasorelaxation in rat superior mesenteric arteries. **Annals of Vascular Surgery**, v. 48, p. 233–240, 2018.

ZHANG, L., LIU, J., GENG, T. Ginkgetin aglycone attenuates the apoptosis and inflammation response through nuclear factor-kB signaling pathway in ischemic-reperfusion injury. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 8078-8085, 2019.