



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
CURSO DE FARMÁCIA  
LABORATÓRIO INTEGRADO DE PESQUISA



# **Efeitos Vasculares do Extrato Hidroalcoólico e Frações das Folhas da *Vitex polygama* Cham. (Lamiaceae)**

Millena Campos Vidal

Macaé  
Novembro de 2013

**Millena Campos Vidal**

**TÍTULO: Efeitos Vasculares do Extrato Hidroalcoólico e Frações das Folhas da *Vitex polygama* Cham. (Lamiaceae)**

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):** Juliana Montani Raimundo

Macaé

Novembro de 2013

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, pela minha família, meus amigos, pelas oportunidades, desafios, pois sem Ele nada sou.

Agradeço aos meus pais, Luiz Fernando e Rosimar, por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, por sempre me proverem de ensinamentos para a vida e para todas as questões em meus momentos mais difíceis, sem que, para isso, exigissem nada em troca. Pai te devo tanto em troca e sou tão grata pelo exemplo que você é em minha vida, muito obrigado por acreditar e sempre incentivar meus sonhos. Mãe, não sei o que faria sem você, muito obrigado por iluminar meu caminho, por se preocupar para que eu estivesse sempre andando pelo caminho correto, pelo amor incondicional, você é meu abrigo, minha segurança!

À minha irmã, Nathalia, pela atenção, amizade e paciência, por sempre acreditar em mim. Saiba que se hoje estou comemorando esta vitória, é porque me espelhei nessa menina guerreira e forte que é você.

Aos meus avós João, Rosair, Nilza por serem meus referenciais de força e de fé e ao meu avô Heraldo que junto a Deus ilumina meus caminhos.

Ao meu Padrinho pelas sábias palavras, pelo incentivo, pela confiança, pelo amor, e por estar sempre ao meu lado, guiando os meus caminhos.

Ao meu cunhado Rômulo pelos momentos descontraídos e pela companhia.

Ao meu namorado e amigo Márcio Vinícius por todo amor, carinho, paciência, compreensão, incentivo e por acreditar em mim e me dar forças para continuar.

Aos meus cachorrinhos Negão, Nega, Dingo e Branquinha pela companhia e por me escutarem sem reclamar, risos!

À todos os meus familiares, que entenderam a importância deste momento de estudo, que por tantas vezes justificou a minha ausência. Em especial ao meu primo

Thiago, que foi a grande fonte de inspiração de todos esses anos.

Aos meus colegas de classe e em especial Márcio Vinícius, Rayssa Dias, Evelyn Reis, Thamiris Brandão, Marcelo Cerutti (Osama), muito obrigada por todos os momentos em que fomos estudiosos, brincalhões e cúmplices. Porque em vocês encontrei verdadeiros irmãos. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Aos meus colegas de laboratório Letícia Ferreira, Amélia Miranda, Bruno Meirelles, Gustavo, Elisaldo, Leandro, pela amizade, paciência, ensinamentos, companhia e pelo ambiente agradável. Em especial a Mestre Letícia Ferreira e a Doutoranda Amélia Miranda pelos ensinamentos e contribuições neste trabalho.

À professora Juliana Montani Raimundo que, com muita paciência e atenção, dedicou do seu valioso tempo para me orientar em cada passo deste trabalho.

Aos professores Samantha Monteiro Martins, Michelle Frazão Muzitano, Magdalena Nascimento Rennó, Leonardo Paes Cinelli, Daniel Karl Resende, Chaquip Daher Netto, Rita Cristina Azevedo Martins, André Gustavo Calvano Bonavita, Daniela de Borba Gurpilhares, Denise Oliveira Guimarães, Paula Lima do Carmo pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha futura vida profissional.

Ao Laboratório de Produtos Naturais (LaProN), em especial as professoras Michelle Frazão Muzitano, Ivana Correa Ramos Leal, Denise Oliveira Guimarães e ao aluno Alexandre Carneiro, pelos extratos e frações que me foram cedidos.

Aos animais, minha gratidão e respeito!

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

**A estrada do sucesso é uma reta, pois tem uma curva chamada fracasso, um trevo chamado confusão, faróis de advertência chamada família, pneus furados chamados inveja. Se você tiver um estepe chamado determinação, um motor chamado fé, um motorista chamado Jesus, você chegará a um lugar chamado vitória.**

*(Autor desconhecido)*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Múltiplos efeitos vasculares do NO produzido nas células endoteliais.....	4
Figura 2: Mecanismo da vasodilação causada pelo NO, Prostaciclina e EDHF. ....	5
Figura 3: Relaxamento do músculo liso vascular mediado pelo GMPc.....	5
Figura 4: A disfunção endotelial.....	8
Figura 5: Polifenóis com atividade vasodilatadora. ....	11
Figura 6: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba .....	13
Figura 7: Flor de Tarumã ( <i>Vitex polygama</i> Cham) .....	16
Figura 8: Procedimento para o teste de vasodilação em anéis de aorta de ratos Wistar machos.....	22
Figura 9: Registros representativos do teste para avaliar a integridade endotelial. Em A, aorta com endotélio e em B, aorta sem endotélio. ....	23
Figura 10: Registro representativo de um experimento de registro de tensão isométrica de anel de aorta com endotélio pré-contraído com fenilefrina e exposto às concentrações crescentes de extrato bruto hidroalcoólico de folhas de <i>V. polygama</i> (EVP).....	25
Figura 11: Efeito vasodilatador de EVP em anéis de aorta com endotélio .....	26
Figura 12: Efeito vasodilatador do EVP em anéis de aorta com e sem endotélio. ....	27
Figura 13: Efeito da Fração Hexânica do EVP em anéis de aorta com endotélio .....	28
Figura 14: Efeito da Fração Diclorometânica do EVP em anéis de aorta com endotélio.....	29
Figura 15: Efeito da Fração em Acetato de Etila do EVP em anéis de aorta com endotélio.....	29
Figura 16: Efeito da Fração Butanólica do EVP em anéis de aorta com endotélio. ...	30
Figura 17: Efeito da Fração Aquosa residual do EVP em anéis de aorta com endotélio.....	30
Figura 18: Comparação do efeito vasodilatador do EVP e suas frações em anéis de aorta com endotélio.....	31

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de <i>Vitex polygama</i> .....	21
--	----

## LISTA DE ABREVIações

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** – Concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>

**20E**- 20- hidroxiecdisona

**AC**- Adenilato ciclase

**Ach** – Acetilcolina

**AcOEt** - Acetato de etila

**AMPc** – adenosina monofosfato cíclico ou monofosfato de adenosina cíclico

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**BH<sub>4</sub>**- tetrabiopterina

**BuOH** - Butanol

**CBC** - Convenção da Diversidade Biológica

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

**CF** - Compostos fenólicos

**CI<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória de 50%

**DAG** – Diacilglicerol

**DCM** - Diclorometano

**DCV** – Doenças Cardiovasculares

**DE**- Disfunção Endotelial

**EDRF**- “Endothelium-Derived Relaxing Factor” ou Fator Relaxante Derivado do Endotélio

**eNOS** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

**EVP** – Extrato Bruto Hidroalcoólico das Folhas de *Vitex polygama*

**GCs** – Guanilato ciclase solúvel

**GMPc** – Monofosfato de guanosina cíclico

**HAS**- Hipertensão Arterial Sistêmica

**Hex** - Hexano

**IP** – receptor de prostaciclina

**IP<sub>3</sub>** – Inositol 1, 4, 5, trifosfato

**LaProN**- Laboratório de Produtos Naturais

**L-NAME**- L-N<sup>G</sup>-Nitroarginina metil éster



**L-NMMA**- N<sup>G</sup>- monometil-L-arginina

**MeOH** – metanol

**MLC** – Cadeia Leve de Miosina

**MS** - Metabólito secundário

**NO** – Óxido Nítrico ou “Nitric Oxide”

**NOS** – Óxido Nítrico Sintase

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

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

**PGI<sub>2</sub>** – Prostaciclina

**Phe** – Fenilefrina

**PIP<sub>2</sub>** – Fosfolípídeos fosfatidil-inositol bifosfato

**PKA** – proteína cinase dependente de AMPc

**PKC** – Proteína cinase C

**PKG** – Cinase dependente de GMPc

**PLC**- Fosfolipase C

**Res** - Resveratrol

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**RS** – Retículo sarcoplasmático

**VOC** – Canais de cálcio dependentes de voltagem.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Doenças cardiovasculares .....	1
1.2 Regulação do tônus vascular: aspectos fisiológicos e .....	2
alterações patológicas .....	2
1.3 Produtos naturais como fonte de novos fármacos .....	8
1.4 Biodiversidade Brasileira: Potencial da Restinga de Jurubatiba.....	12
1.4.1 A espécie <i>Vitex polygama</i> .....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Objetivo Geral .....	19
3.2 Objetivos Específicos .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	20
4.1 Obtenção do Material Vegetal .....	20
4.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto e Frações.....	20
4.3 Preparo dos anéis de aorta para registro de tensão isométrica .....	21
4.4 Avaliação dos efeitos vasculares de EVP e suas frações .....	23
4.5 Análise Estatística .....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1 Avaliação do efeito vasodilatador do EVP .....	25
5.1.1 Importância do endotélio para o efeito vasodilatador do EVP .....	26
5.2 Efeitos das frações do EVP no músculo liso vascular .....	28
6. CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
ANEXOS .....	41
Apresentações em Congressos.....	41

## RESUMO

### Efeitos Vasculares do Extrato Hidroalcoólico e Frações das Folhas de *Vitex polygama* Cham. (Lamiaceae)

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. Uma característica comum destas doenças é a alteração da função vascular, com disfunção endotelial e aumento do tônus vascular. Do ponto de vista clínico, seria de grande valia a identificação de novas substâncias que pudessem prevenir e/ou tratar a disfunção vascular presentes nas doenças cardiovasculares. Os produtos naturais são uma tradicional fonte de fármacos já que representam uma grande diversidade química e o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, localizado no Norte Fluminense, é considerado uma fonte de novos produtos bioativos devido a sua riqueza florística. Entre as espécies lá encontradas, destaca-se a *Vitex polygama* (Lamiaceae). Os estudos sobre as atividades farmacológicas desta espécie são escassos e os seus efeitos sobre o sistema cardiovascular ainda não foram investigados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Vitex polygama* (EVP) no músculo liso vascular e identificar as frações responsáveis pela atividade do extrato bruto. O efeito vasodilatador do extrato e de suas frações foi avaliado através do registro de tensão isométrica de artéria aorta isolada de ratos Wistar machos. A contração do músculo liso vascular foi induzida com 10  $\mu$ M de fenilefrina e em seguida concentrações crescentes do extrato ou frações foram testadas (0,1-300  $\mu$ g/ml). Foram utilizados anéis aórticos com e sem endotélio, o qual foi considerado íntegro quando o relaxamento induzido pela acetilcolina (10 mM) foi superior a 80%. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA-CCS/UFRJ (MACAÉ01). O EVP provocou relaxamento de forma dependente da concentração em aortas com endotélio. O efeito vasodilatador do extrato foi parcialmente inibido em aortas sem endotélio, indicando que a ação do extrato parece envolver a liberação de fatores endoteliais e um efeito direto no músculo liso vascular em altas concentrações. A fração em acetato de etila e a fração diclorometânica também produziram relaxamento vascular de aortas com endotélio com potência máxima de  $88 \pm 5,8$  e  $59,4 \pm 3,3\%$  ( $P < 0,05$ ) respectivamente. Portanto estas frações parecem ser responsáveis pelo efeito do EVP.

**Palavras-chave:** aorta; vasodilatação; disfunção vascular; produtos naturais; *Lamiaceae*; Restinga de Jurubatiba.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares (DCV) são causadas por distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos, e incluem doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, doença cardíaca congênita e insuficiência cardíaca (WHO, 2013).

As DCV constituem um grave problema de saúde pública, uma vez que são a principal causa de morte no mundo, representando cerca de 17,1 milhões de óbitos por ano. Estima-se que em 2030, 23,6 milhões de pessoas devam morrer em decorrência dessas enfermidades (WHO, 2013).

Os principais fatores de risco para as DCV incluem hipertensão arterial sistêmica (HAS), hipercolesterolemia, hiperglicemia, sobrepeso e obesidade, histórico familiar, além de hábitos como fumo, baixa ingestão de frutas e verduras e sedentarismo (WORLD, 2013). A HAS é uma doença crônica de etiologia multifatorial e constitui o maior e mais prevalente fator de risco para o desenvolvimento de DCV. Aproximadamente 9,4 milhões de mortes por ano, ou 16,5% de todas as mortes, podem ser atribuídas à HAS (LIM *et al.*, 2012).

As DCV são caracterizadas pela presença de alterações vasculares morfológicas e/ou funcionais como disfunção endotelial, aumento do tônus e da permeabilidade vascular, maior expressão de moléculas de adesão e proliferação de células musculares lisas (CARVALHO *et al.*, 2001; DAVEL *et al.*, 2011). Estas alterações vasculares também estão presentes em fatores de risco para o desenvolvimento das DCV, como HAS, obesidade e diabetes e, portanto, representam um alvo terapêutico de interesse tanto para a prevenção como para o tratamento das DCV.

## 1.2 Regulação do tônus vascular: aspectos fisiológicos e alterações patológicas

A regulação do tônus do músculo liso vascular baseia-se em forças sinérgicas e antagônicas que regulam a concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) e/ou a sensibilidade do meio intracelular ao  $Ca^{2+}$ . As forças sinérgicas atuam de forma a elevar a  $[Ca^{2+}]_i$  e/ou sensibilizar o meio intracelular ao  $Ca^{2+}$ , promovendo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) pela cinase da cadeia leve da miosina, permitindo a interação com os filamentos de actina, produzindo assim efeitos vasoconstritores. As forças antagônicas reduzem a  $[Ca^{2+}]_i$  e/ou dessensibilizam o meio intracelular ao  $Ca^{2+}$ , levando a defosforilação da MLC pela fosfatase da cadeia leve de miosina, produzindo efeitos vasodilatadores (LUCAS *et al.*, 2000; PONTES, 2010). Essas forças são moduladas pela ação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores que podem atuar diretamente no músculo liso vascular ou indiretamente através da liberação de fatores endoteliais.

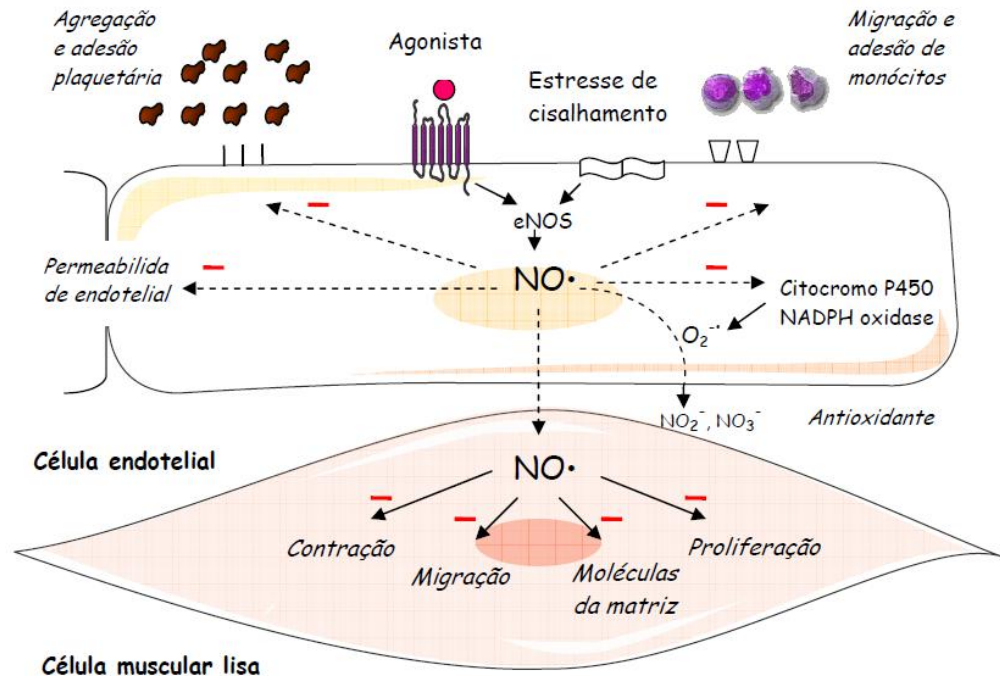
A contração do músculo liso vascular pode ocorrer devido à despolarização da membrana ou à ativação de receptores de membrana por agonistas (ORALLO, 1996; RANG & DALE, 2007). A geração de um potencial de membrana despolarizante promove o influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOC), sendo os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L a via mais importante de influxo de  $Ca^{2+}$ . Entretanto, a  $[Ca^{2+}]_i$  também pode ser elevada devido à liberação desse íon do retículo sarcoplasmático (RS), que atua como um reservatório intracelular de  $Ca^{2+}$  (BOLTON *et al.*, 1999; PONTES, 2010). Diversos receptores presentes na membrana plasmática quando ativados por agonistas, como endotelina-1, angiotensina II e noradrenalina, levam ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , e vasoconstrição. Por exemplo, a ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, acoplados a proteína  $G_q$ , por agonistas como a fenilefrina (Phe), promove a ativação da fosfolipase C (PLC) com consequente hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato ( $PIP_2$ ), gerando inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  pode se ligar a receptores presentes no RS e assim provocar a liberação do  $Ca^{2+}$  armazenado e o DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que é capaz de fosforilar várias proteínas citoplasmáticas e de membrana, como os canais de  $Ca^{2+}$  tipo L, levando ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  (COELHO *et al.*, 2002).

Várias vias de sinalização estão envolvidas no relaxamento vascular e o endotélio vascular tem papel crucial nesta função. O endotélio consiste em uma monocamada de células que cobre a membrana basal de todos os vasos sanguíneos. Constitui um órgão endócrino bastante importante, de vasta distribuição e de localização estratégica, que favorece o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; RATTMANN, 2009; PONTES, 2010). Ele exerce papel fundamental na regulação do tônus vascular, atuando não somente como barreira passiva entre o plasma e o líquido extravascular, mas também na proteção contra o desenvolvimento de lesões vasculares. Também atua no controle do tráfego de pequenas e grandes moléculas, na inibição da agregação plaquetária, na proliferação das células musculares lisas, além de manter a estrutura da parede vascular (RANG & DALE, 2007; MASI e SILVA, 2009).

A importância do endotélio no controle do tônus vascular foi demonstrada pelos pesquisadores Furchgott e Zawadzki em 1980, que relataram a dependência do endotélio íntegro para a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh). O efeito vasodilatador mediado pelo endotélio vascular é decorrente da liberação de vários vasodilatadores, denominados fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), que incluem prostaciclina ( $PGI_2$ ), óxido nítrico (NO) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (HIGASHI *et al.*, 2009). Esses fatores são secretados mediante a ativação de receptores endoteliais específicos por diversos agonistas, como acetilcolina, histamina e insulina. Além dos estímulos químicos, o estresse de cisalhamento ou *shear stress* também é um importante estímulo físico capaz de gerar a síntese e a liberação de mediadores vasorelaxantes (MATLUNG, 2009). Entre os fatores contráteis liberados pelo endotélio, os principais são prostaglandina  $H_2$ , tromboxano  $A_2$ , angiotensina II, endotelina-1 e espécies reativas de oxigênio (ROS) (CARVALHO *et al.*, 2001).

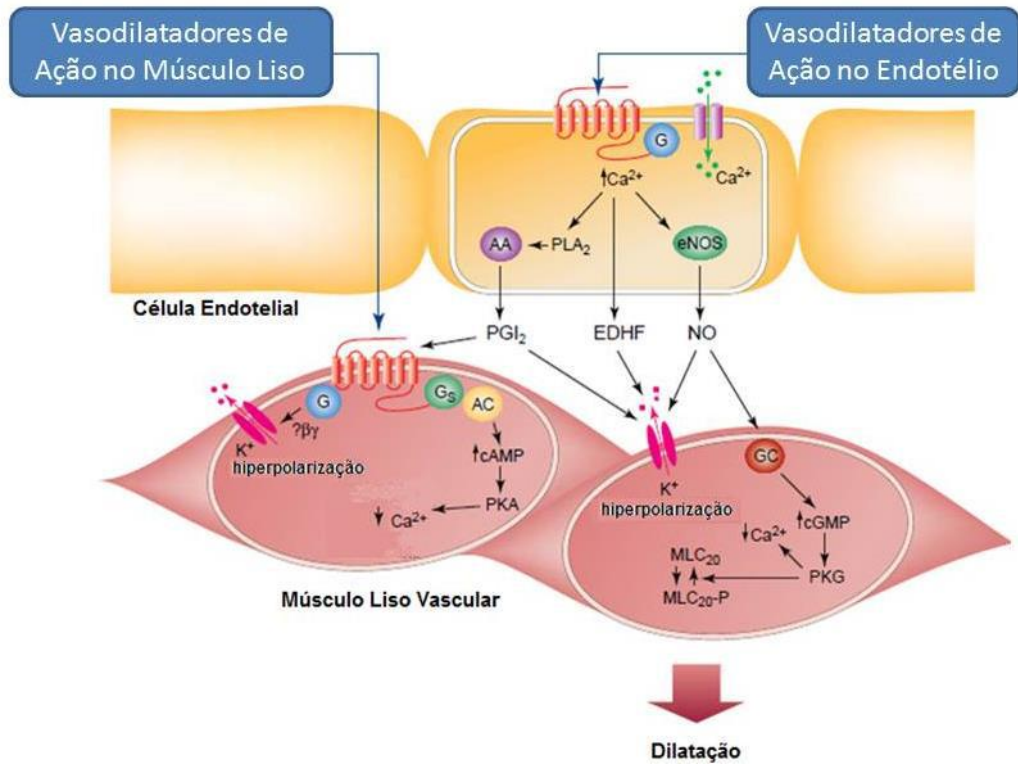
O NO, considerado o mais importante fator vasodilatador endotelial, é um radical livre gasoso e inorgânico que exerce funções importantes no controle da homeostase vascular (ZAGO e ZANESCO, 2006). Além de ser um potente vasodilatador, inibe a proliferação das células musculares lisas, a ativação, agregação e adesão de plaquetas no endotélio, a adesão de leucócitos e a expressão de moléculas de adesão, bem como a síntese de proteínas da matriz

extracelular, aumenta a sensibilidade à insulina e protege a parede do vaso do desenvolvimento de aterosclerose e trombose (VIARO e ÉVORA, 2000; PONTES, 2010) (Figura 1).

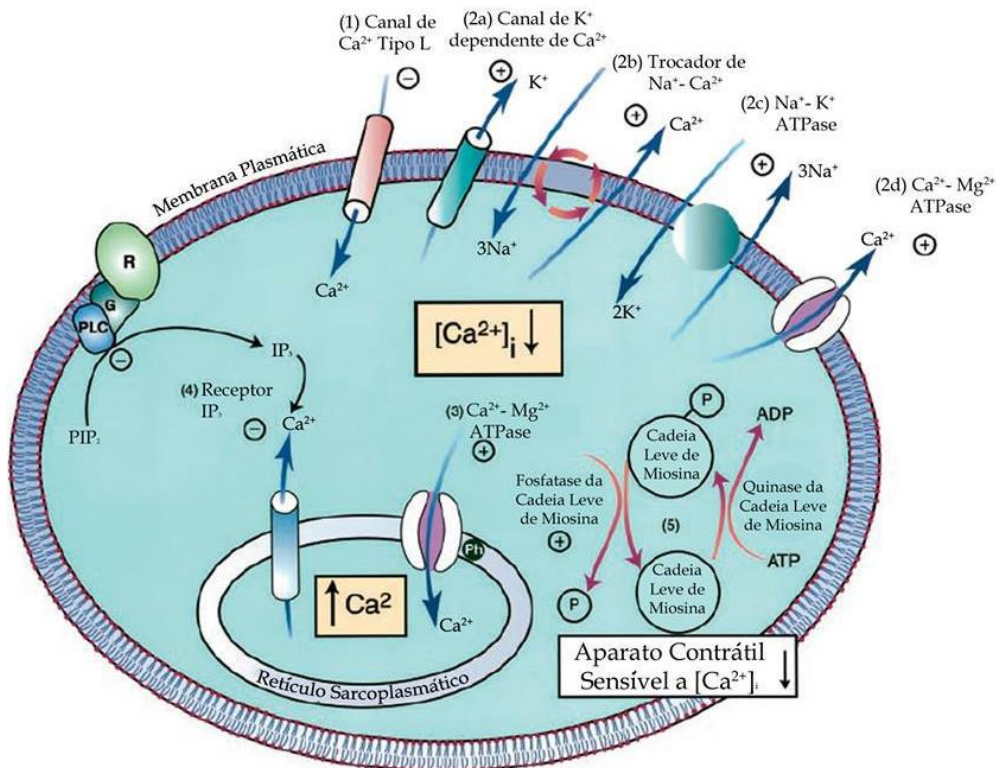


**Figura 1: Múltiplos efeitos vasculares do NO produzido nas células endoteliais.** (Retirado de RATTMANN, 2009).

Uma vez liberado, o NO se difunde rapidamente das células endoteliais para a musculatura lisa, onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) pela interação com o ferro do grupamento heme desta enzima, com consequente aumento na produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Figura 2). Este, por sua vez, estimula a cinase dependente de GMPc (PKG) que promove o relaxamento da musculatura lisa vascular por diversos mecanismos que levam à redução da  $[Ca^{2+}]_i$  e à dessensibilização do aparelho contrátil ao  $Ca^{2+}$  (Figura 3). Os mecanismos envolvidos na ação do GMPc envolvem: (1) inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, (2) aumento do efluxo de  $Ca^{2+}$  através da abertura dos canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  (2a), da ativação do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (2b), da ativação da  $Na^+/K^+$  ATPase (2c), e da bomba  $Ca^{2+}-Mg^{2+}$  ATPase (2d), (3) aumento do sequestro de  $Ca^{2+}$  através da ativação da bomba  $Ca^{2+}-Mg^{2+}$  ATPase do RS, (4) e diminuição da liberação dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Figura 3).



**Figura 2: Mecanismo da vasodilação causada pelo NO, Prostaciclina e EDHF.**  
(Adaptado de MAGUIRE E DAVENPORT, 2005).



**Figura 3: Relaxamento do músculo liso vascular mediado pelo GMPc.**  
(Adaptado de Lucas et al., 2000).



A PGI<sub>2</sub> constitui o mais abundante produto do ácido araquidônico produzido pelo tecido vascular. Sua contribuição para a vasodilatação dependente de endotélio é menor, quando comparado ao NO, devido a sua ação depender da presença de receptores específicos na membrana das células musculares lisas vasculares (CARVALHO *et al.*, 2001). A vasodilatação causada pela PGI<sub>2</sub> é decorrente da estimulação de receptores IP, acoplados à proteína G<sub>s</sub>, que leva à ativação da adenilato ciclase, aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e à ativação da proteína cinase dependente de AMPC (PKA), reduzindo assim a sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup>. Outro mecanismo da ação vasodilatadora da PGI<sub>2</sub> envolve a abertura dos canais de K<sup>+</sup>. O aumento da saída de K<sup>+</sup> do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva leva a hiperpolarização da membrana celular. Este estado de hiperpolarização promove o fechamento de canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L e, conseqüentemente, a diminuição da entrada de íons Ca<sup>2+</sup> para o interior da célula, causando relaxamento vascular (VANE *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2001; RATTMANN, 2009) (Figura 2).

Além do NO e da PGI<sub>2</sub>, o EDHF também promove relaxamento da musculatura lisa vascular. Esse fator é capaz de produzir hiperpolarização do músculo liso vascular mesmo na presença de inibidores da síntese de NO, como inibidores da NOS (L-NAME [L-N<sup>G</sup>-Nitroarginina metil éster] e análogos da L-arginina L-NMMA [N<sup>G</sup>- monometil-L-arginina]), ou de inibidores da síntese de PGI<sub>2</sub> (indometacina), sendo o relaxamento dependente do endotélio e sem nenhum aumento nos níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPC e AMPC) (CARVALHO *et al.*, 2001; RATTMANN, 2009). A vasodilatação causada pelo EDHF é decorrente da abertura de canais de K<sup>+</sup>, com conseqüente hiperpolarização da membrana (SOBEY, 2001) (Figura 2).

Além dos vasodilatadores dependentes do endotélio, existem substâncias que atuam diretamente no músculo liso vascular, como os bloqueadores de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L e os agonistas de canais de K<sup>+</sup>, como nifedipino e minoxidil, respectivamente. Os bloqueadores de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L ligam-se à subunidade α<sub>1</sub> do canal, impedindo sua abertura e, conseqüentemente, reduzindo a entrada de Ca<sup>2+</sup> e a excitabilidade e contratilidade celular (RANG & DALE, 2007). A abertura de canais de K<sup>+</sup> presentes na membrana das células musculares vasculares

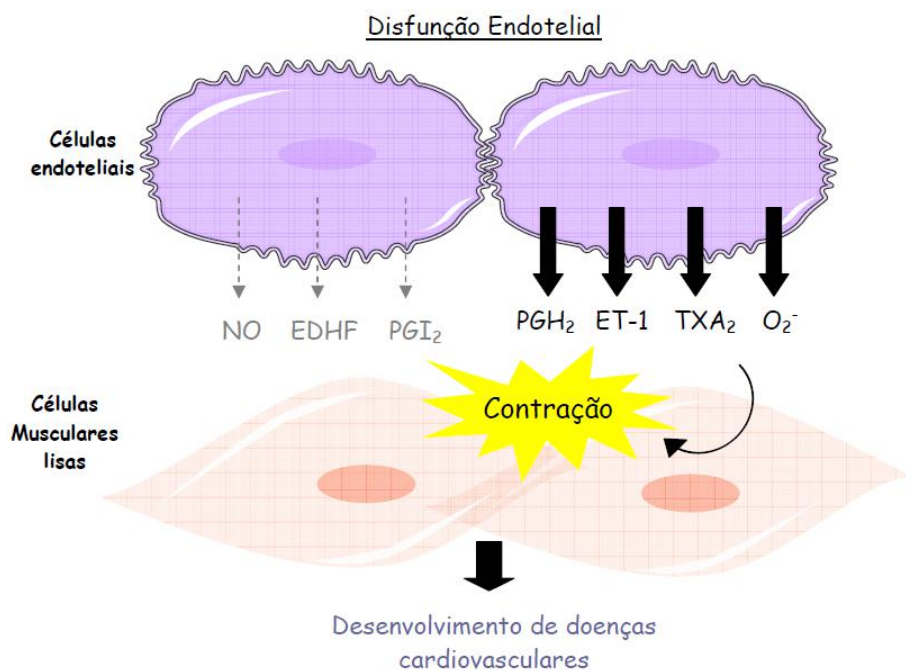
leva ao aumento da saída de  $K^+$  do meio intracelular para o meio extracelular, o que causa hiperpolarização da membrana celular e relaxamento vascular, como descrito anteriormente (FARACI *et al.*, 1997).

Em condições normais, o tônus vascular é resultado do equilíbrio entre as forças vasoconstritoras e as vasodilatadoras, com participação crucial dos fatores derivados do endotélio. No entanto, em diversas condições patológicas, como HAS, hipercolesterolemia, aterosclerose, insuficiência cardíaca e nas doenças isquêmicas, este equilíbrio está alterado, com atenuação da função vasodilatadora do endotélio devido à redução da síntese e liberação do NO, da  $PGI_2$  e do EDHF, levando a vasoconstrição excessiva e mudanças estruturais na parede do vaso (WORLD, 2013).

O desequilíbrio na liberação/ação dos fatores endoteliais vasoconstritores e vasodilatadores resulta em uma situação patológica conhecida como disfunção endotelial (CARVALHO *et al.*, 2001) (Figura 4). Tal desequilíbrio está intimamente associado a alterações na síntese, biodisponibilidade e/ou ação de fatores endoteliais, principalmente o NO, resultando na redução da vasodilatação dependente do endotélio e/ou no aumento da resposta aos vasoconstritores.

Um dos mecanismos propostos de redução da biodisponibilidade do NO é o estresse oxidativo. Este ocorre quando os processos pró-oxidantes excedem a capacidade dos mecanismos antioxidantes em manter um equilíbrio adequado, levando ao aumento da produção de ROS. Essas ROS reagem com NO, formando peroxinitrito, um oxidante forte e citotóxico, diminuindo assim biodisponibilidade do NO. O estresse oxidativo também pode causar uma deficiência de L- arginina e tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ), essenciais para a atividade da eNOS. Essa redução na disponibilidade de  $BH_4$  leva a um processo conhecido como desacoplamento da eNOS, que resulta no aumento da formação de peroxinitrito, que juntamente com os ânions superóxido, contribui para a disfunção endotelial (SHI e VANHOUTTE, 2009; GILES, *et al.*, 2012).

A disfunção endotelial, portanto prejudica a função vascular nas DCV e contribui para o desencadeamento e o agravamento das mesmas (DAVEL *et al.*, 2011). Deste modo, a identificação de novas substâncias que modulam o tônus vascular e previnam e/ou corrijam a disfunção vascular são de grande interesse para ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento das DCV.



**Figura 4: A disfunção endotelial.** Abreviações: NO – óxido nítrico;  $\text{PGI}_2$  – prostaciclina; EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio;  $\text{PGH}_2$  - prostaglandina  $\text{H}_2$ ; ET-1 – endotelina -1;  $\text{TXA}_2$  – tromboxano  $\text{A}_2$  e  $\text{O}_2^-$  - ânion superóxido. Flechas pontilhadas = diminuição da secreção; flechas espessas = aumento da secreção. (Retirado de RATTMANN, 2009).

### 1.3 Produtos naturais como fonte de novos fármacos

Os produtos naturais têm um papel importante na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que grande parte daqueles em uso clínico é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese planejada a partir de produtos naturais. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são as principais fontes de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Atualmente, embora existam inúmeras estratégias e metodologias disponíveis para síntese e descoberta de novos fármacos, a química de produtos naturais ainda representa uma alternativa de sucesso (BARREIRO e BOLZANI, 2009). Segundo revisão realizada por Newman e Cragg (2012), de 1981 a 2010, 1130 fármacos foram obtidos a partir de produtos naturais e derivados.

Entre os medicamentos utilizados com sucesso na clínica no tratamento de doenças no sistema cardiovascular que foram obtidos de produtos naturais podemos destacar, o captopril (descoberto a partir de serpentes), o ácido acetilsalicílico (*Salix alba*), a digoxina (*Digitalis purpurea*) e a reserpina (*Rauwolfia serpentina*), ressaltando a importância dos produtos naturais tanto na descoberta de novos fármacos como na compreensão de mecanismos fisiopatológicos (MASHOUR *et al.*, 1998; BUTLER, 2004; JUNIOR *et al.*, 2006).

As plantas e seus derivados, desde o início da civilização humana, são utilizados no tratamento de diversas doenças e, portanto, são consideradas um dos pilares da farmacoterapia (MASHOUR *et al.*, 1998). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional como recurso primário no atendimento da saúde (DUBEY, *et al.*, 2004).

O reino vegetal, sendo detentor da maior parcela da diversidade química conhecida, desempenha um papel muito importante na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Entretanto, a variedade e complexidade dessas moléculas impossibilita que grande parte delas sejam sintetizadas. (JUNIOR *et al.*, 2006).

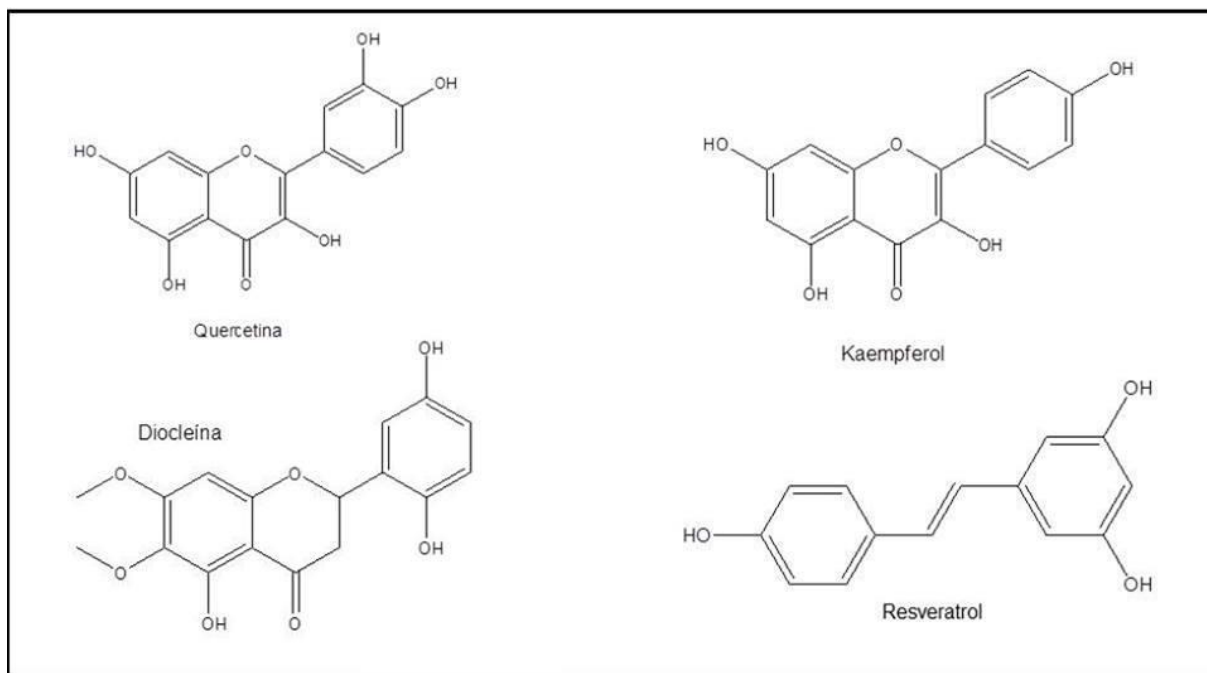
As plantas produzem diversas substâncias orgânicas, que em sua grande maioria não participam de forma direta no crescimento e desenvolvimento das mesmas. Estas substâncias são tradicionalmente referidas como metabólitos secundários (MS), sendo também conhecidos por metabólitos especiais. Durante muitos anos o significado adaptativo desses compostos permaneceu desconhecido, acreditando-se que essas substâncias eram produtos finais do metabolismo que não exerciam qualquer função biológica. No final do século XIX, essas substâncias começaram a ser estudadas, tendo como principais interesses sua importância como fármacos, venenos, fragrâncias e materiais industriais (TAIZ E ZEIGER, 2002). Posteriormente, a essas substâncias foram associados inúmeras funções biológicas que implicam na sobrevivência das plantas no ecossistema, são elas: resistência a pestes e doenças, a atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, interação com micro-organismos simbiotes, entre outras. A concentração dessas substâncias varia de planta para planta e a capacidade de síntese é selecionada ao longo dos processos evolutivos e depende das necessidades específicas de cada

planta (TAIZ E ZEIGER, 2002; MENDES, 2007). Ao contrário dos MS, os metabólitos primários são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais.

Dentre os MS podemos destacar os compostos fenólicos (CF), que devido às suas propriedades biológicas são continuamente associados à redução do risco de DCV, câncer e outras doenças crônicas. Esses compostos caracterizam-se pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos 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. Os CF representam uma grande variedade de substâncias, sendo os flavonoides, os ácidos fenólicos e as lignanas, os CF mais abundantes nas frutas, vegetais e alimentos derivados dos mesmos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Estudos epidemiológicos sugerem a existência de uma correlação inversa entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e a incidência de DCV, uma vez que estes produzem efeitos benéficos como à melhora da função endotelial, redução da pressão arterial e diminuição da agregação plaquetária (STOCLET *et al.*, 2004; RATTMANN, 2009). Os mecanismos destes efeitos protetores ainda não foram totalmente elucidados, mas podem estar relacionados à ação antioxidante e/ou à ação direta dessas substâncias no endotélio vascular.

Os flavonoides desempenham um papel importante na proteção contra danos oxidativos e têm efeitos terapêuticos sobre um grande número de doenças, incluindo cardiopatias isquêmicas, aterosclerose e câncer (FLORÉZ *et al.*, 2002). Já foram descritos na literatura vários flavonoides com atividade vasodilatadora, como a quercetina, o kaempferol, a diocleína (Figura 5).



**Figura 5: Polifenóis com atividade vasodilatadora.**

O kaempferol e a quercetina estão presentes em vegetais, frutas e sucos, sendo a quercetina um flavonoide que apresenta inúmeras atividades biológicas, dentre elas atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, imunológica, antiviral e cardiovascular. Em ratos, a quercetina melhora a função contrátil do ventrículo esquerdo, reduz o risco de morte por doenças das coronárias e diminui a incidência de infarto do miocárdio (BEHLING *et al.*, 2004). Experimentos realizados em aorta torácica isolada de ratos demonstram que o relaxamento causado pela quercetina é dependente de endotélio e parece ser mediada pela via NO/GMPc (FITZPATRICK, *et al.*, 1993;). Entretanto outros experimentos demonstram que esse efeito é independente de endotélio (DUARTE *et al.*, 1993. PÉREZ-VIZCAÍNO, *et al.*, 2002).

A diocleína é um flavonoide extraído da *Dioclea grandiflora*, utilizada na medicina popular para o tratamento de cálculos renais e desordens da próstata (MOURA 2006). Os efeitos descritos na literatura deste flavonoide estão relacionados à sua capacidade vasodilatadora em aorta de ratos, onde o principal mecanismo envolvido na ação vasodilatadora é a produção de NO, com consequente aumento de GMPc (LEMOS *et al.*, 1999).

Entre os não flavonoides com atividade vasodilatadora, destaca-se o estilbeno resveratrol (Res) (Figura 5). Inicialmente foi reportada a utilização do Res na terapia

do câncer e atualmente têm sido relatadas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de efeitos benéficos contra as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (CARRIZO *et al.*, 2013). Os estudos do mecanismo da ação vasodilatadora do Res mostraram que o relaxamento é parcialmente dependente do endotélio e que envolve a abertura de canais de  $K^+$  e a redução do influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular e a inibição da liberação dos estoques intracelulares. Em baixas concentrações o Res atua de forma dependente do endotélio, através da liberação de NO, e em altas concentrações de forma independente do endotélio (SHEN, 2013). Outros estudos indicam que o Res além de melhorar a expressão da NOS, é capaz de inibir a síntese de endotelina-1, o mais potente vasoconstritor derivado do endotélio (MEZARI, 2013).

#### **1.4 Biodiversidade Brasileira: Potencial da Restinga de Jurubatiba**

O Brasil é reconhecido em todo mundo por possuir a maior biodiversidade do planeta, cerca de 20%, segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), além de abrigar o maior número de espécies endêmicas (BARREIRO E BOLZANI, 2009). Portanto, a biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo de fundamental importância sua preservação e a ampliação do conhecimento científico das suas espécies.

Dentre os vários biomas presentes no Brasil, as restingas são particularmente interessantes por abrigarem um mosaico de ecossistemas terrestres, semiaquáticos e aquáticos e comunidades vegetais distintas quanto à fisionomia e composição florística (ESTEVES, 2011). O bioma de restinga possui uma vegetação característica, que constitui um tipo de formação vegetal que compreende florestas, “moitas de vegetação”, campos, entre outras, que crescem sobre planícies arenosas costeiras. Essa vegetação é decorrente da combinação de fatores físicos e químicos destas regiões (salinidade, elevada temperatura, alta exposição à luminosidade, etc), o que contribui para elevada biodiversidade encontrada nelas (ESTEVES, 2011).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA da Restinga de Jurubatiba), criado em 1998 (Figura 6), protege uma grande área de restinga

localizada no Norte do Estado do Rio de Janeiro e abrange parte dos municípios de Macaé, Quissamã e Carapebus, com área total de 148,6 km<sup>2</sup> (LACERDA e ESTEVES, 2000; SANTOS *et al.*, 2004; ESTEVES, 2011). É a maior área de restinga incluída em uma Unidade de Conservação no Estado, além de abrigar umas das 12 áreas do Programa Brasileiro de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (IMBASSAHY *et al.*, 2009). A flora do PARNA da Restinga de Jurubatiba é composta por 588 táxons de angiospermas, 31 de pteridófitas, 147 de algas continentais (COSTA E DIAS, 2001), e 55 espécies de briófitas (COSTA, YANO 1998; COSTA, *et al.*, 2006).



**Figura 6: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.** (Retirado de Macaé em Pauta, 2012).

A triagem de extratos de várias espécies vegetais presentes no PARNA da Restinga de Jurubatiba, realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa do Campus UFRJ-Macaé, indicou que o extrato hidroalcoólico de folhas da espécie *Vitex polygama* Cham. (Família Lamiaceae, gênero *Vitex*) apresenta potencial atividade no sistema cardiovascular (FERREIRA, 2013). Portanto, esta espécie foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, o qual visou investigar a atividade farmacológica do extrato hidroalcoólico bruto e de suas frações no músculo liso vascular.



#### 1.4.1 A espécie *Vitex polygama*

Anteriormente conhecida como *Labiatae*, à família *Lamiaceae* é de ampla distribuição, suas espécies são cosmopolitas, mas são mais frequentes nas regiões mediterrâneas, no Médio Oriente e nas montanhas tropicais (JUDD, *et al.*, 2009). Esta família é composta por aproximadamente 7500 espécies e 300 gêneros. Só no Brasil existem 26 gêneros com cerca de 350 espécies, uma biodiversidade considerável (CEAP, 2013).

É constituída por espécies herbáceas, às vezes aromáticas, arbustos semi-lenhosos, sendo raramente árvores, abrangendo na nova classificação, alguns gêneros da família *Verbenaceae*. Apresentam folhas do tipo simples, que podem estar dispostas de maneira oposta ou verticalmente, inflorescência habitualmente cimosa com flores normalmente vistosas, graças ao seu viço e suas cores chamativas. Apresentam cálice pentâmero, quase sempre persistente até a frutificação; corola pentâmera, gamopétala, frequentemente bilabiada. O limbo às vezes está inteiro, outras vezes pode se apresentar dentado ou partido, mas todos tem pêlos que são responsáveis pela secreção dos aromas característicos desta família. Os frutos são comumente secos (baga ou esquizocarpo) (CEAP, 2013).

A utilização das plantas dessas famílias é bem difundida e importante. Existem algumas espécies aromáticas de interesse econômico que são utilizadas para a extração dos óleos essenciais. Uma vez extraídos, esses óleos são utilizados em cosméticos e como condimento, na confecção de perfumes (como no caso da Alfazema, gênero *Lavandula*), na culinária (como o orégano, tomilho, manjeriço, dos gêneros *Origanum*, *Thymus*, *Ocimum*, respectivamente) ou ainda como chás (como, por exemplo, o chá de hortelã, do gênero *Mentha*) (JUDD, *et al.*, 2009). Além de todas as qualidades anteriormente citadas, as plantas que compõem esta família são amplamente utilizadas no paisagismo natural, devido sua beleza exuberante, como é o caso da *Salvia splendens*, que apresenta floração esfuziante de cor vermelha. Os principais gêneros que compõem esta família são: *Ajuga*, *Clerodendron*, *Glechoma*, *Gmelina*, *Holmskioldia*, *Lanium*, *Lavandula*, *Solenostemon*, *Stachys*, *Tetradenia*, destacando-se o gênero *Vitex* (CEAP,2013).

O gênero *Vitex* compreende cerca de 300 espécies de pequenas árvores ou arbustos, que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, com uma

proporção substancial no Sudeste da Ásia, sendo poucas espécies encontradas nas zonas temperadas (CHONG E LIM, 2011).

As espécies de *Vitex* têm sido estudadas com relação a sua composição química, que é caracterizada pela presença de flavonas C-glicosiladas, ecdisteróides, diterpenos, iridóides, óleos essenciais, bem como em relação às suas atividades biológicas (LEITÃO e SANTOS, 1999; LEITÃO *et al.*, 2011). Dentre as atividades descritas na literatura desse gênero estão: atividade anti-inflamatória, anti-androgênica, cicatrizante, bem como a inibição da proliferação de linfócitos e efeito relaxante do músculo liso brônquico (LEITÃO *et al.*, 2011).

Muitas espécies são usadas na medicina popular, como a *V. cienkowskii*, reportada por sua ampla utilização, incluindo o tratamento de DCV. Estudos farmacológicos preliminares realizados com esta planta demonstraram atividade vasorelaxante em anéis de aorta de ratos mediada por triterpenos e ceramidas, que atuam via NO/GMPc (DONGMO *et al.*, 2011). A *V. mollis* é utilizada como remédio para alívio de disenteria, dor de estômago, diarreia, bem como analgésico e anti-inflamatório. À outras espécies de *Vitex* foram descritas diversas propriedades, dentre elas antimalária à *V. gaumeri*, antimicrobiana à *V. agnus-castus* e antifúngica à *V. negundo*, assim como *V. glabrata*, *V. trifolia*, *V. leucoxydon*, *V. penduncularis*, *V. pinnata* possuem atividade inseticida (MEENA *et al.*, 2010). A vitexicarpina, um flavonóide isolado da *V. rotundifolia*, apresentou efeito anti-inflamatório em células endoteliais vasculares e atividades antitumoral e analgésica (LEE *et al.*, 2012).

Popularmente chamada de "Maria-Preta, Tarumã e Velame-do-Campo", a *Vitex polygama* Cham (Figura 7) é uma espécie brasileira bem difundida e bem conhecida, que ocorre como árvores ou arbustos, principalmente nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. O chá de seus galhos e frutas é usado na medicina popular como emenagogo e diurético, e o chá das folhas é utilizado no tratamento de infecções renais, na prevenção de cálculo renal e inflamação (GALLO *et al.*, 2006; GALLO *et al.*, 2008).



**Figura 7: Flor de Tarumã (*Vitex polygama* Cham).** (Retirado de Árvores de São Paulo, 2013).

Estudos mostram que o extrato metanólico das folhas de *V. polygama* contém inúmeras substâncias, tais como: sesquiterpenos, ácidos graxos, 2'-O-cafeoilorientina, além de outras flavonas, como alguns derivados O- glicosilados, flavonóis, ácidos fenólicos, monoterpênos, fitoesteróis, cafeoil éster do ácido quínico e ecdisteróides (GALLO *et al.*, 2008). Da partição butanólica do extrato hidroalcoólico das folhas da *V. polygama* foram isoladas e identificadas substâncias como o schaftosídeos e seus isômeros, que são conhecidos pela sua eficácia como anti-inflamatório e seu efeito preventivo contra cálculo renal em ratos (GALLO *et al.*, 2008).

Na investigação fitoquímica do extrato metanólico dos galhos de *V. polygama* realizado por Gallo (2006) e seus colaboradores, foi isolada e caracterizada a 20-hidroiecdisona (20E), conhecida por ser capaz de exercer efeito estimulatório na síntese de proteínas e no aumento da atividade metabólica, sendo, portanto, extensivamente utilizado como agente anabólico. Além disso, são atribuídos a 20E inúmeros efeitos farmacológicos como antiarrítmico, analgésico, antioxidante, anti-inflamatório e antidiabético entre outros efeitos (GALLO *et al.*, 2006).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *V. polygama* mostrou atividade antiviral intracelular, enquanto o extrato dos frutos apresentou efeito virucida. A fração em acetato de etila inibiu a propagação do vírus do herpes simples do tipo 1 resistente ao aciclovir (GONÇALVES *et al.*, 2001). No entanto, ainda não há descrição na literatura dos efeitos vasculares de extratos de *V. polygama*.

## 2. JUSTIFICATIVA

As DCV constituem um grave problema de saúde pública. Tais doenças caracterizam-se pela presença de alterações vasculares morfológicas e/ou funcionais como a disfunção endotelial, sendo esta um evento que precede e contribui para a manutenção da fisiopatologia. Apesar das várias classes de medicamentos disponíveis para o tratamento, as DCV ainda são a principal causa de morte no mundo, necessitando assim de substâncias que atuem de forma a prevenir e retardar a evolução dessas doenças.

Para a prática clínica seria de grande interesse a utilização de fármacos que pudessem prevenir e/ou tratar a disfunção vascular presente nas DCV. Portanto, com base na importância dos produtos naturais como fonte de substâncias bioativas e no potencial da biodiversidade brasileira, em especial da Restinga de Jurubatiba, a espécie *V. polygama* foi selecionada para ser estudada quanto aos seus efeitos no tônus vascular. A escolha desta espécie foi baseada nos efeitos já descritos para outras espécies do gênero *Vitex* e nos resultados da triagem do efeito vasodilatador de extratos de espécies vegetais presentes no PARNA da Restinga de Jurubatiba realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar os efeitos vasculares de produtos das folhas da *V. polygama*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar o efeito vasodilatador do extrato hidroalcoólico das folhas de *V. polygama*;
- ✓ Determinar a importância do endotélio para o efeito do extrato hidroalcoólico de folhas de *V. polygama*;
- ✓ Avaliar os efeitos das frações do extrato hidroalcoólico de folhas de *V. polygama*, a fim de determinar 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 sala com temperatura e umidade controladas, em um ciclo de 12h/12h claro/escuro e água e ração foram disponibilizadas sem restrição.

##### **4.1 Obtenção do Material Vegetal**

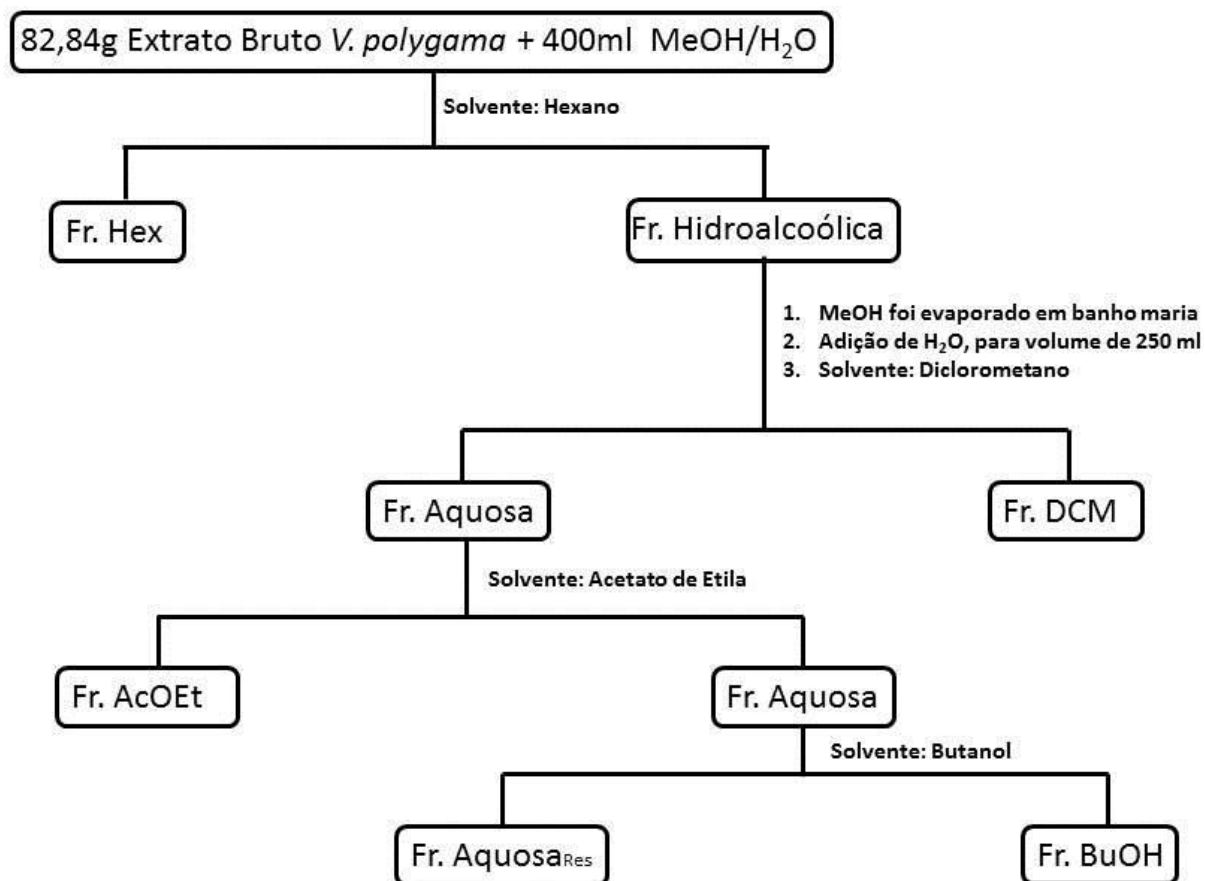
Folhas da espécie *Vitex polygama Cham* foram coletadas em janeiro de 2011, no PARNA Jurubatiba, mediante autorização de coleta SISBIO 39673-2. A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Ungaretti Paleo Konno e uma exsicata (RFA38750) foi depositada no Herbário do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. Após a seleção do material, este foi pesado e submetido à secagem em estufa a 40°C com circulação de ar, para retirada da água e, com isso, impedir reações de hidrólise e/ou crescimento microbiano. A secagem das folhas ocorreu até ser obtido peso constante. O material vegetal foi reduzido mecanicamente a pequenos fragmentos, aumentando assim a área de contato para o processo de extração.

##### **4.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto e Frações**

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

O extrato bruto foi preparado através de processo de maceração. Foram pesados 701 g de folhas secas e os solventes foram utilizados na proporção de 80% de etanol e 20% de água, com volume total de 3,5 L, obtendo-se um extrato a 20% (p/V). Após o término da extração, o material foi filtrado e rotaevaporado, obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico (EVP). As frações foram obtidas através de partição líquido-líquido, na qual foram utilizados 82,84 g do EVP ressuspensos em 400 ml de metanol:água (MeOH:H<sub>2</sub>O). Foram utilizados solventes com polaridade

crescente: Hexano PA (Hex), Diclorometano PA (DCM), Acetato de Etila PA (AcOEt) e Butanol PA (BuOH), como mostrado no Esquema 1.



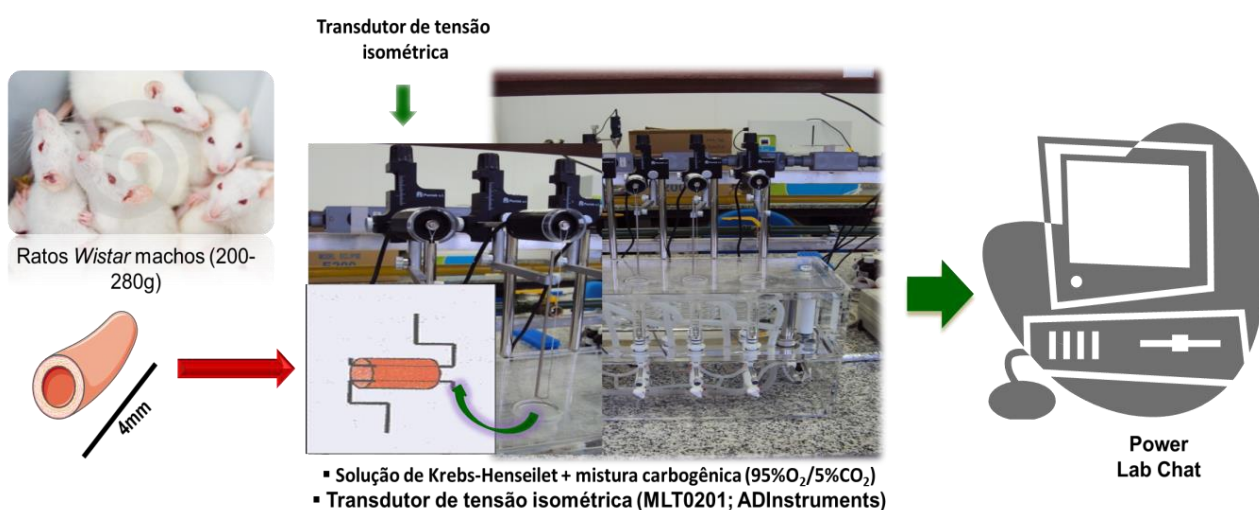
**Esquema 1: Fluxograma do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Vitex polygama*.** Abreviações: *V. polygama* - *Vitex polygama*; Fr.Hex- Fração hexânica; Fr. DCM- Fração diclorometânica; Fr. AcOEt- Fração acetato de etila; Fr. Aquosa<sub>res</sub>- Fração aquosa residual e Fr. BuOH- Fração butanólica.

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

Ratos Wistar machos (200-280g) foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia geral. A artéria aorta foi retirada e transferida para uma cuba contendo solução de Krebs-Henseilet para retirada do tecido conjuntivo adjacente. A artéria aorta foi dividida em cilindros de aproximadamente 4 mm de comprimento, que foram posicionados em cubas verticais preenchidas com 10 ml de solução de Krebs-Henseilet (em mM: NaCl 118; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5

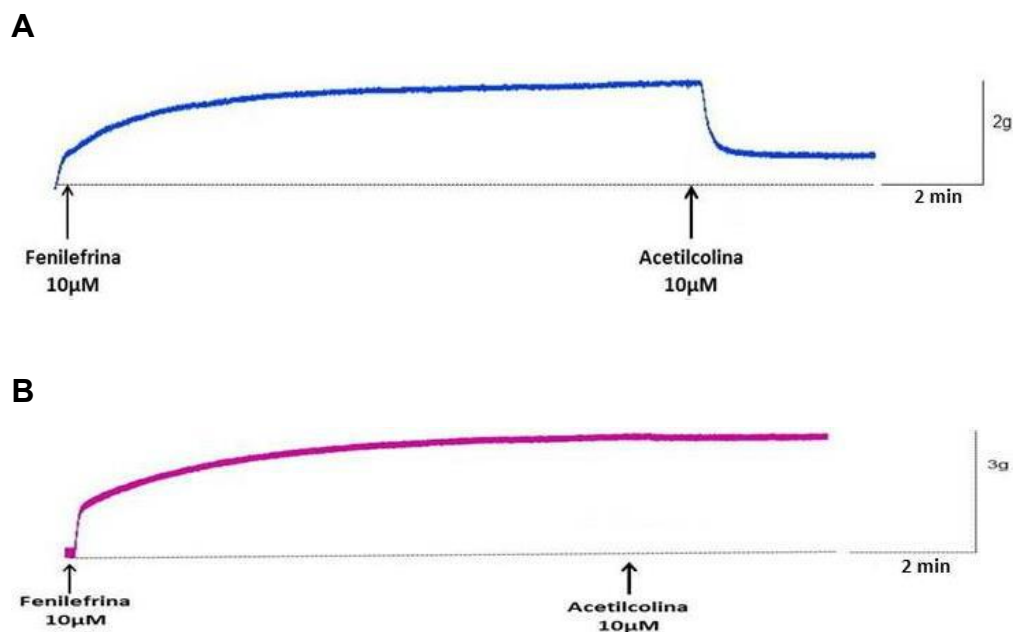


NaHCO<sub>3</sub> 25; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11), continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), à 37°C. Uma das extremidades do tecido foi conectada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments) para o registro de tensão isométrica. Os sinais gerados foram digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise através do programa LabChart Pro (ADInstruments) (Figura 8). Em seguida, a preparação foi estabilizada durante 90 minutos, sendo a solução da cuba trocada nos tempos de 20, 40 e 60 minutos (RAIMUNDO et al., 2006).



**Figura 8: Procedimento para o teste de vasodilatação em anéis de aorta de ratos Wistar machos.**

Após o período de equilíbrio foi verificada a integridade do endotélio vascular. Para tanto, a contratura do músculo liso foi induzida com 10µM de Phe e, após estabelecido o platô da contratura, foram adicionados 10µM de ACh. O endotélio foi considerado íntegro quando o relaxamento induzido por ACh foi superior a 80%. A remoção mecânica do endotélio foi realizada utilizando uma cânula, sendo confirmada pela ausência de relaxamento (ou inferior 10%) frente à ACh (Figura 9).



**Figura 9: Registros representativos do teste para avaliar a integridade endotelial. Em A, aorta com endotélio e em B, aorta sem endotélio.**

#### **4.4 Avaliação dos efeitos vasculares de EVP e suas frações**

Após o teste do endotélio, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida através da adição de 10 μM de Phe à solução nutritora. Estabelecido o platô, foram adicionadas concentrações crescentes do extrato (0,1 - 300 μg/mL) ou das frações (0,1- 300 μg/mL).

EVP e suas frações foram solubilizados em DMSO, em soluções estoque de 100 μg/mL, 10 mg/mL e 100 mg/mL. A concentração máxima de DMSO utilizada nos experimentos foi de 0,65 %, a qual não provoca nenhuma alteração da contratilidade da aorta (dados não mostrados).

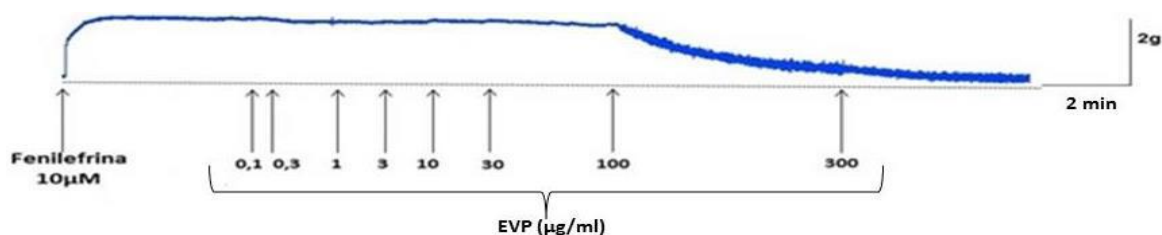
#### 4.5 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.. Nos experimentos de tensão isométrica de aorta, os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do percentual de relaxamento da contratatura induzida pela fenilefrina, onde a contratatura máxima de fenilefrina (100%) é igual a 0% de relaxamento, sendo este considerado o controle. 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  $p < 0,05$ .

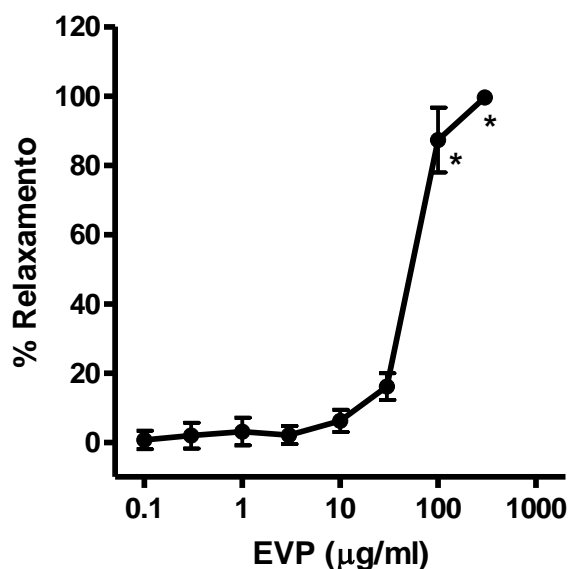
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do efeito vasodilatador do EVP

Para a avaliação do efeito vasodilatador do EVP, foram utilizados anéis de aorta com endotélio, preparados para registro de tensão isométrica. A contratatura do músculo liso vascular foi induzida com a adição de 10  $\mu\text{M}$  de Phe à solução contida na cuba. Estabelecido o platô, foram adicionadas concentrações crescentes do extrato (0,1-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo observado relaxamento a partir da concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 10). Nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , foi obtido relaxamento de  $87,3 \pm 9,3$  e  $99,5 \pm 0,4$  %, respectivamente ( $P < 0,05$ ; Figura 11). A concentração necessária para reduzir a contratatura induzida por fenilefrina em 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) foi de  $52,83 \pm 11,21$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



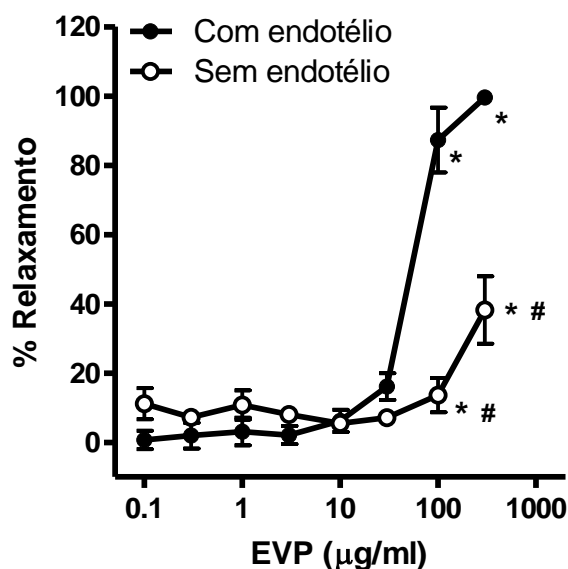
**Figura 10:** Registro representativo de um experimento de registro de tensão isométrica de anel de aorta com endotélio pré-contráido com fenilefrina e exposto às concentrações crescentes de extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *V. polygama* (EVP).



**Figura 11: Efeito vasodilatador de EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 4, \* P<0.05 comparado com o controle.**

### 5.1.1 Importância do endotélio para o efeito vasodilatador do EVP

Para avaliar a participação dos fatores endoteliais na vasodilatação induzida pelo EVP, foram realizados experimentos em aortas sem endotélio. O efeito vasodilatador do EVP foi parcialmente inibido em aortas sem endotélio, como mostrado na figura 12. O relaxamento máximo observado na concentração de 300 µg/mL foi reduzido de 99,5% ± 0,4 para 38 ± 9,7 % (P<0,05; Figura 12). Esses resultados sugerem que o relaxamento vascular produzido pelo EVP envolve a liberação de fatores endoteliais e um efeito direto no músculo liso vascular em altas concentrações.



**Figura 12: Efeito vasodilatador do EVP em anéis de aorta com e sem endotélio. Curva concentração-resposta para EVP em anéis de aorta com endotélio (n= 4) e sem endotélio (n= 6). \*P<0,05, comparado ao controle e #P<0,05, comparado a com endotélio.**

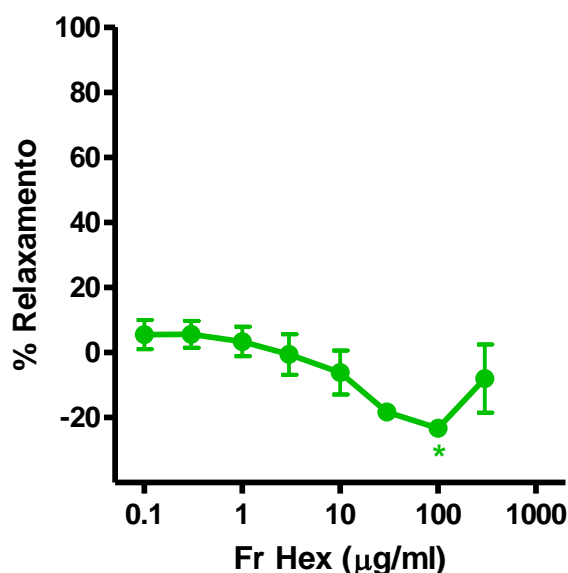
Os principais fatores vasodilatadores liberados pelo endotélio são o NO e a PGI<sub>2</sub>. O NO, produzido pela eNOS, se difunde para as células musculares lisas, ativando a GCs, levando ao aumento de GMPc, induzindo assim o relaxamento do músculo liso vascular. A ativação da eNOS pode ocorrer pela ativação de diferentes receptores endoteliais, como os receptores muscarínicos M3. Já a PGI<sub>2</sub>, produzida mediante a ação da ciclooxygenase, promove relaxamento através da ativação do receptor IP no músculo liso vascular e consequente aumentos dos níveis intracelulares de AMPc. (CARVALHO *et al*, 2001; SOBEY, 2001; DUSSE *et al.*, 2003; ZAGO e ZANESCO, 2006). Os resultados obtidos em aortas sem endotélio indicam que o EVP pode também atuar diretamente no músculo liso, o que poderia envolver o bloqueio de canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L e/ou a abertura de canais de K<sup>+</sup>, mecanismos também importantes de relaxamento vascular. Os mecanismos envolvidos no efeito vasodilatador do EVP ainda precisam ser determinados.

Muitos produtos naturais de origem vegetal apresentam efeito vasodilatador e diversos são os mecanismos pelos quais eles exercem seus efeitos. A maior parte dos produtos vegetais promove relaxamento dependente do endotélio vascular, através da via NO/GMPc. Um número significativo de produtos naturais também age

através do bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ou da inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares (McNEILL e JURGENS, 2006).

## 5.2 Efeitos das frações do EVP no músculo liso vascular

Com o objetivo de identificar as classes de metabólitos responsáveis pelo efeito vasodilatador do EVP, as frações obtidas através da partição líquido-líquido do extrato bruto foram testadas em aortas com endotélio pré-contraídas com  $10\mu\text{M}$  de Phe. A fração hexânica (Fr Hex) provocou uma leve contração do músculo liso vascular, como mostrado na figura 13.



**Figura 13: Efeito da Fração Hexânica do EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 5, \*P<0.05, comparado ao controle.**

Diferente da fração hexânica, a fração diclorometânica (Fr DCM) produziu relaxamento de forma dependente da concentração e com  $\text{CI}_{50}$  de  $141,9 \pm 23,5 \mu\text{g/mL}$ . O relaxamento máximo de  $59,4 \pm 3,3 \%$  ( $P<0,05$ ) foi observado na concentração de  $300 \mu\text{g/mL}$  (Figura 14). Já a fração em acetato de etila (Fr AcOEt) promoveu relaxamento máximo superior aquele observado para a fração diclorometânica ( $88 \pm 5,8 \%$ ;  $P<0,05$ ), com  $\text{CI}_{50}$   $125,2 \pm 10,05 \mu\text{g/mL}$  (Figura 15).

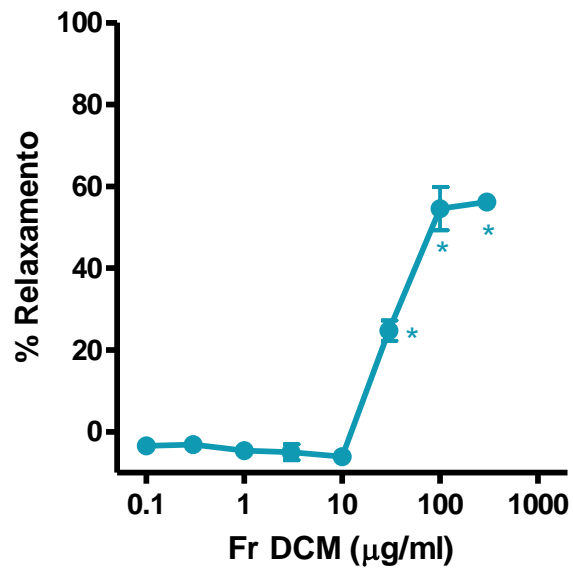


Figura 14: Efeito da Fração Diclorometânica do EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 4, \*P<0.05, comparado ao controle.

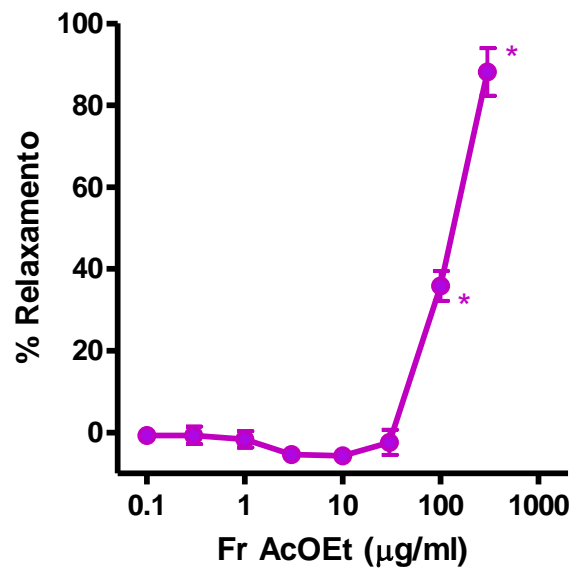


Figura 15: Efeito da Fração em Acetato de Etila do EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 3, \*P<0.05, comparado ao controle.



Da mesma forma como observado nos experimentos realizados com a fração hexânica, a fração butanólica (Fr BuOH) provocou uma leve contração, mas significativa, dos anéis de aorta (Figuras 16), entretanto a fração aquosa residual (Fr Aquosa<sub>res</sub>) não exerceu efeito estatisticamente significativo (Figuras 17),

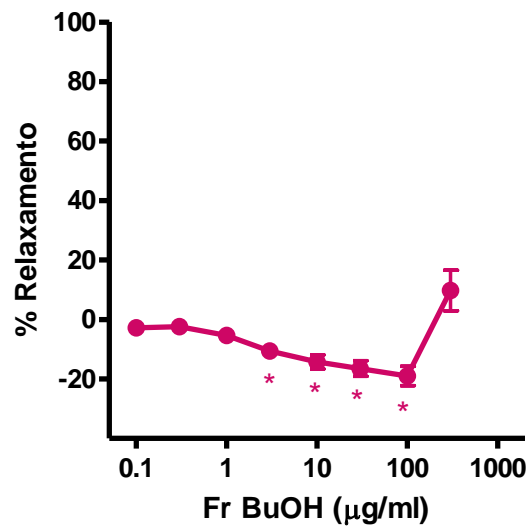


Figura 16: Efeito da Fração Butanólica do EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 5, \*P<0.05, comparado ao controle.

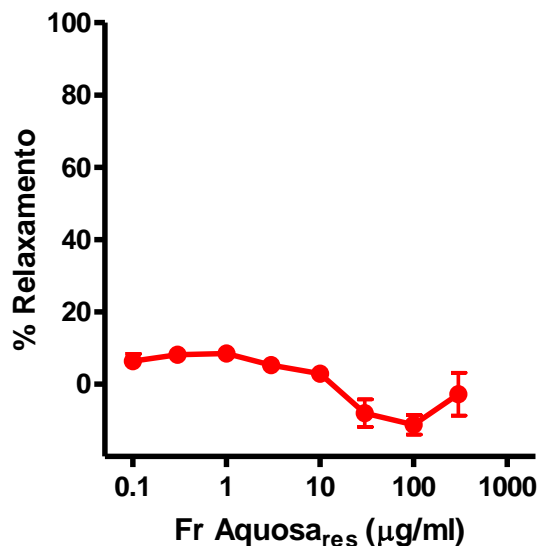
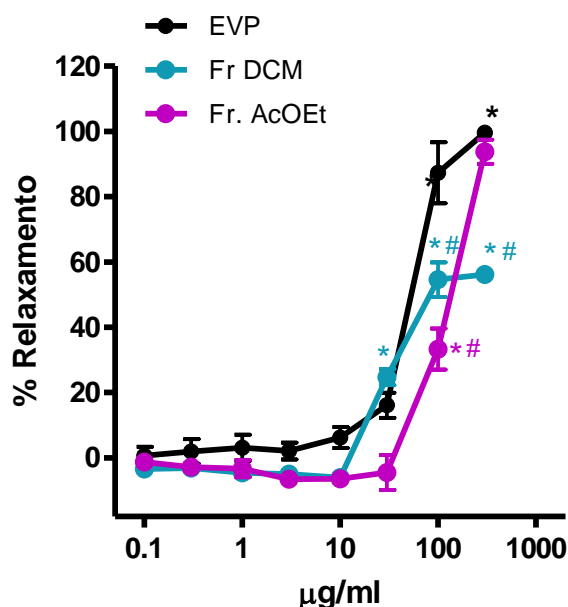


Figura 17: Efeito da Fração Aquosa residual do EVP em anéis de aorta com endotélio. n= 4, \*P<0.05, comparado ao controle.

A fim de comparar o efeito vasodilatador do extrato bruto e das frações mais ativas, Fr DCM e Fr AcOEt, foi plotado o gráfico apresentado na Figura 18. Pode-se observar que a Fr AcOEt provocou relaxamento bastante semelhante ao do extrato bruto, porém a curva da mesma está mais deslocada para direita, o que mostra que o extrato bruto é mais potente que esta fração, uma vez que este necessita de uma concentração menor para produzir o mesmo efeito ( $CI_{50}$  EVP=  $54,25 \pm 10,51$   $\mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50}$  Fr AcOEt=  $128,5 \pm 6,68$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $P < 0,05$ ). Já a Fr DCM, produziu vasodilatação inferior a causada pelo EVP e pela Fr AcOEt, mas com potência similar a da Fr AcOEt. Esses resultados sugerem que essas frações, principalmente a Fr AcOEt, concentram o(s) metabólito(s) responsável(is) pelo efeito vasodilatador observado.



**Figura 18: Comparação do efeito vasodilatador do EVP e suas frações em anéis de aorta com endotélio. \* $P < 0,05$ , comparado ao controle; # $P < 0,05$ , comparado ao EVP.**

Os solventes utilizados na partição líquido-líquido do extrato bruto extraem diversas substâncias, e esta extração baseia-se na polaridade das mesmas. As substâncias preferencialmente extraídas pelo solvente diclorometano são bases livres de alcaloides, terpenos, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos e flavonoides do tipo aglicona. Já o solvente acetato de etila, extrai principalmente flavonoides e cumarinas simples (SIMÕES *et al.*, 2010).

A análise química por cromatografia líquida de alta eficiência do EVP, realizada no LaProN, mostrou dois picos majoritários no cromatograma com espectro UV característico de flavonoides. A determinação do conteúdo total de flavonoides, calculado em termos de rutina, mostrou 1,158% p/p no EVP (CARNEIRO *et al.*, 2012). A análise por cromatografia em camada delgada mostrou que a fração em acetato de etila apresenta flavonoides e outros compostos fenólicos, e a fração diclorometânica possui terpenos. Essas classes de substâncias devem ser responsáveis pelo efeito vasodilatador do EVP, uma vez que vários estudos mostram o efeito vasodilatador de compostos fenólicos e terpenos (SANTOS *et al.*, 2011). Além disso, estudos demonstram potencial ação vasodilatadora dos flavonoides, que envolvem principalmente a liberação de óxido nítrico e prostaglandinas a partir do endotélio, e um efeito protetor contra doenças cardiovasculares. (ZHAO *et al.*, 1999; AJAY *et al.*, 2003; XIA *et al.*, 2005; ZAMORAS *et al.*, 2013).

De forma semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, o extrato metanólico da casca do caule de *V. cienkowskii* apresentou intensa atividade vasodilatadora em anéis de aorta isolados de rato, mediada pela via NO/GMPc. A análise cromatográfica das frações do extrato bruto levou ao isolamento e a posterior identificação de triterpenos pentacíclicos e uma ceramida que são, pelo menos em parte, responsáveis pelo efeito vasodilatador do extrato bruto (DONGMO *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação do EVP 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 *V. polygama* no sistema cardiovascular.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ O relaxamento vascular causado pelo EVP é dependente da concentração e parcialmente dependente do endotélio;
- ✓ O mecanismo de ação do EVP parece envolver a liberação de fatores endoteliais e um efeito direto no músculo liso vascular em altas concentrações;
- ✓ As frações DCM e AcOEt provocaram intenso relaxamento vascular e parecem ser responsáveis pelo efeito vasodilatador do EVP;
- ✓ A espécie *Vitex polygama* pode ser considerada uma fonte promissora de substâncias com efeito vasodilatador.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, V.74, P. 603–612, 2003.

Árvores de São Paulo. Disponível em: <<http://arvoresdesaopaulo.wordpress.com/fotos-plantas-do-cerrado/>>, Acesso em: 20 de agosto de 2013.

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

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P.. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.*, Araraquara, V. 15, N.3, P. 285-292, 2004.

BOLTON, T.B.; PRESTWICH, S. A., ZHOLOS, A. V., AND GORDIENKO, D. V.. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annual Review of Physiology*, V.61, P.85-115, 1999.

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

CARNEIRO, A. M. R. G.; KONNO, T.; LEAL, I.V.R.C.; MUZITANO, M.F.. Avaliação química do extrato das folhas de *Vitex polygama Cham.* (Verbenaceae) com CLAE-UV. Livro de Resumos da II Jornada Fluminense de Produtos Naturais, Arraial Do Cabo, P. 83, 2012.

CARRIZO, A.; FORTE, M.; DAMATO, A.; TRIMARCO, V.; SALZANO, S.; BARTOLO, M.; MACIAG, A.; PUCA, A.A.; VECCHIONE, C.. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology* XXX (2013) XXX–XXX.

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.

CEAP - CENTRO DE ESTUDOS AMBIENTAIS. Disponível em: <<http://www.ceapdesign.com.br/>>, Acesso em: 20 de setembro de 2013.

CHONG, K.L.; LIM, Y.Y.. Effects of drying on the antioxidant properties of herbal tea from selected *Vitex* species. *Journal of Food Quality*, V.35, N.1, P.51- 9, 2011.

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

COSTA, A.F.; DIAS, I.C.A. (ORGS.). Flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e arredores, Rio de Janeiro, Brasil: Listagem, Florística e Fitogeografia. Série Livros 8. Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ, Museu Nacional, 2001.

COSTA, D.P.; IMBASSAHY, C.A.A.; ALMEIDA, J.S.S.; SANTOS, N.D.;

IMBASSAHY, T.F.V.. Diversidade das briófitas nas restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Boletim do Instituto de Botânica, V.18, P.131-139, 2006.

COSTA, D.P.; YANO, O.. Briófitas da restinga de Macaé, Rio de Janeiro, Brasil. Hoehnea, V.25, P.99-119, 1998.

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.

DONGMO, A. B.; AZEBAZEB, A.G.B.; DONFACKC, F. M.; DIMOC, T.; NKENG-EFOUETD, P. A.; DEVKOTAE,K. P.; SONTIAF, B.; WAGNERG, H.; SEWALDE, N.; VIERLINGF, W.. Pentacyclic triterpenoids and ceramide mediate the vasorelaxant activity of *Vitex cienkowskii* via involvement of no/cgmp pathway in isolated rat aortic rings. Journal of Ethnopharmacology, V.133, P. 204–212,2001.

DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCALNO, F.; ZARZUELO, A., JIMÉNEZ, J., TAMARGO, J.. Vasodilator effects of quercetin iin isolated rat vascular smooth muscle. European Journal of Pharmacology, V.239, P.1-7, 1993.

DUBEY, N. K.; KUMAR, R.; TRIPATHI, P.. Global promotion of herbal medicine: india's opportunity. Current Science, Bangalore, V. 86, N.1, 2004.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, V.39, N.4, P. 343-350, 2003.

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.

FARACI, F.M., HEISTAD, D.D.. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. Physiological Reviews.V.78, P.53–97, 1997.

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.

FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; COFFEY, R.G.. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. Am J Physiol, V.265, P. H774–H778, 1993.

FLÓREZ, S.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J.. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria, V.17, P. 271-278, 2002.

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

GALLO, M.B.C.; BELTRAME, F.L.; VIEIRA, P.C.; CASS, Q.B.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.. Quantitative determination of 20-hydroxyecdysone in methanolic extract of twigs from *Vitex Polygama* CHAM. Journal of Chromatography B, V. 832, P. 36-40, 2006.

GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; PIRES, F.R.S.. Compounds from *Vitex polygama* active against kidney diseases. Journal Chromatography, V.115, P. 320-32, 2008.

GILES, T.D.; SANDER, G.E.; NOSSAMAN, B.D.; KADOWITZ, P. J.. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. The Journal of Clinical Hypertension, V. 14, N. 4, 2012.

GONÇALVES, J.L.S.; LEITÃO, S.G.; DELLE MONACHE, F.; MIRANDA, M.M.F.S.; SANTOS, M.G.M.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D.. In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. Phytomedicine, V.8, N.6, P. 477-480, 2001.

HIGASHI, Y.; NOMA, K.; YOSHIZUMI, M.; KIHARA, Y.. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. Circulation Journal, V.73, P.411-418, 2009.

IMBASSAHY, C.A.A.; COSTA, D.P.; ARAUJO, D.S.D.. Briófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. Acta Bot. Bras, V.23, N.2, P. 558-570, 2009.

INFOESCOLA. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/plantas/lamiaceae/>>. Acesso em: 20 de Setembro de 2013.

JUDD W.A.; CAMPBELL C.S.; KELOGG E.A.; STEVEN P.F.. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. São Paulo: Artmed. 2009.

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.

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.

LEE, A.M.; LEE, Y.J.; KIM, Y.C.; KIM, S.J.; KANG, D.G.; LEE, H.S.. Vascular protective role of vitexicarpin isolated from *Vitex rotundifolia* in human umbilical vein endothelial cells. Inflammation, V.35, N.2, 2012.

LEITÃO, S.G.; SANTOS, T.C.. Essential oils from two Brazilian *Vitex* species. Acta Horticulturae, V.500, P. 89-92, 1999.

LEITÃO, S.G.; SANTOS, T.C.; DELLE MONACHE, F.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D.; MARINHO, B.G.. Phytochemical profile and analgesic evaluation

of *Vitex cymosa* leaf extracts. Brazilian Journal Of Pharmacognosy, V.21, N.5, P.874-883,2011.

LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G.; CÔRTEZ, S.F.. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. European Journal of Pharmacology, V. 386, P. 41– 6, 1999.

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.

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. Pharmacol Rev, V. 52, P.375–413, 2000.

MACAÉ EM PAUTA, 2013. Disponível em: <<http://macaeempauta.blogspot.com.br/2012/06/parque-restinga-de-jurubatiba-macae-e-e.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2013.

MAGUIRE, J. J.; DAVENPORT, A. P.. Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRs. 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.

MASI, L.N.; SILVA, E. P. P.. Influence of trans fatty acids on endothelial cell dysfunction and possible therapeutic effects of physical activity on endothelial tissue for prevention or regression of atherosclerosis. J Vasc Bras, V.8, N.2, P.171-176, 2009.

MATLUNG, H. L.; BAKKER, E.N.T.P.; VANBAVEL, E.. Shear stress, reactive oxygen species and arterial structure and function. Antioxidants & Redox Signaling, V. 11, N.7, 2009.

MCNEILL, J.R.; JURGENS, T.M.. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. Can.J. Physiol.Pharmacol, V. 84, P.803-821, 2006.

MEENA, A.K.; SINGH, U.; YADAV, A.K.; SINGH, B.; RAO, M.M.. Pharmacological an phytochemical evidences for the extracts from plants of the genus *Vitex*- a review. International Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research, V.2, N.1, P.01-09, 2010.

MENDES, M. D. S.. Caracterização química e molecular de espécies das famílias *Lamiaceae* E *Apiaceae* da flora aromática de Portugal. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, 2007.



MEZARI, M.C.. Efeito do consumo de vinho tinto sobre a função endotelial e perfil lipídico em homens. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MOURA, M.D.. Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

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.

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.

PEREZ-VIZCAINO, F.;DUARTE, J.. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, V.31, P.478–494, 2010.

PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; IBARRA, M.; COGOLLUDO, A.L.; DUARTE, J.; ZARAGOZÁ -ARNAÉZ, F.; MORENO,L.; LÓPEZ-LÓPEZ, G.; TAMARGO, J.. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, V.302, N.1, P.66–72, 2002.

PONTES, L.B.. Avaliação farmacológica de derivados metilenodioxifenilsulfonamídicos funcionalizados: novos inibidores de fosfodiesterases. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, Brasil. P. 27-28, 2010.

RAIMUNDO, J.M.; SUDO, R.T.; PONTESA, L.B.; ANTUNES,F.; TRACHEZB, M.M.; ZAPATA-SUDO, G.. In vitro and in vivo vasodilator activity of racemic tramadol and its enantiomers in wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, V.530, P.117-123, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.. RANG & DALE *Farmacologia*. 6.ED.,Rio de Janeiro, Elsevier Editora LTDA, 2007.P.299.

RATTMANN, Y. D.. Mecanismos endoteliais envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2009.

SANTOS, M.G.; SYLVESTRE, L.S.; ARAUJO, D.S.D.. Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Bot. Bras*, V.18, N.2, P. 271-280,2004.

SANTOS, M.R.V.; MOREIRA, F.V.; FRAGA, B.P.; SOUSA, D.P.;BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review, *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J.*, V.21, N.4, 2011.

SHEN, M.; ZHAO, L.; WU, R.; YUE, S.; PEI, J..The vasorelaxing effect of

resveratrol on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. *Vascular Pharmacology*, V. 58, P.64–70, 2013.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P.M.. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes.. *Journal of Diabetes*, V.1, P.151–162, 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 *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, V.21, P. 28-38, 2001.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M-H.; BEDOUI, J. E.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B.. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal Of Pharmacology*, V. 500, P.299– 313.

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

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M.. Cyclooxygenases 1 and 2. *annu. REV. Pharmacol. Toxicol*, V. 38, P.97–120, 1998.

VIARO F.; ÉVORA, P.R.B.. Expressão das óxido nítrico sintases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc*, V.15, N.1, P. 55-65, 2000.

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

WHO. GLOBAL STATUS REPORT ON NONCOMMUNICABLE DISEASES 2010. Geneva, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report\\_full\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf)>. Acesso em: 23 de julho de 2013.

WORLD HEART FEDERATION. Disponível em:<<http://www.world-heart-federation.org>> Acesso em: 13 de agosto de 2013.

XIA, M.; ZHOU, X. M.; YAO, H.; JIANG, H.; BRUCE, I. C.; WEI, E.; XIA, Q. Rutin-induced endothelium-dependent vasorelaxation in rat aortic rings and the underlying mechanism. *Engineering in Medicine and Biology*, 27th Annual Conference Shanghai, China, P.1-4, 2005.

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

ZAMORA-ROS, R.; JIMÉNEZ, C.; CLERIES, R.; AGUDO, A.; SÁNCHEZ, M. J.; SÁNCHEZ-CANTALEJO, E.; MOLINA-MONTES, E.; NAVARRO, C.; CHIRLAQUE, M. D.; HUERTA, J. M.; AMIANO, P.; REDONDO, M. L.;

BARRICARTE, A.; GONZÁLEZ, C. A..Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in a spanish cohort, *Epidemiology*,V 24, P.726–733, 2013.

ZHAO, X.; GU, Z.; ATTELE, A. S.; YUAN, C. S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *Journal of Ethnopharmacology*, V.67, P.279–285,1999.

## **ANEXOS**

### **Apresentações em Congressos**