

**MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOS E ANTI-HIPERTENSIVO DE**  
*Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA**  
**“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS**  
**E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**João Pessoa - PB**

**2009**

**MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGE**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOS E ANTI-HIPERTENSIVO DE  
*Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Co-Orientadora: Prof. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges

**João Pessoa - PB**

**2009**

**MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTAGENES**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOS E ANTI-HIPERTENSIVO DE**

***Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Aprovada em 02/12/2009

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (Orientador)**

---

**Profa. Dra. Simone dos Santos Maciel**

Universidade Federal da Paraíba  
Examinadora Externa

---

**Prof. Dr. Saulo Rios Mariz**

Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador Externo

---

**Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges**

Universidade Federal do Maranhão  
Examinador Externo

---

**Prof. Dr. Jarcicarlos Lima de Alencar**

Universidade Federal da Paraíba  
Examinadora Interna

*Aos meus pais, Icler Raposo Cartágenes e Antonia de Sousa Cartágenes, os grandes responsáveis por cada conquista em minha vida, os meus maiores incentivadores, aqueles que chamo de “meu porto seguro”.*

*À memória dos meus avôs João Cardoso e Angelina Ferreira de Sousa, com a certeza de reconhecer que o meu mérito é fruto do muito que me dedicaram e que sempre será uma luz em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Mestre dos mestres, que me dá sabedoria para sempre ir atrás das coisas que quero e por receber gratuitamente força, disposição, saúde, paz, amor e fé para enfrentar todos os obstáculos. É através do amor divino que consegui conquistar mais uma etapa em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Isac de Almeida Medeiros por toda confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação. Agradeço a paciência nas nossas conversas em “diferentes frequências” e principalmente agradeço por sua amizade.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges, pelo apoio, orientação e exemplo de profissional e ser humano.

Ao professor Dr. Antonio Carlos Romão Borges pela parceria firmada para o desenvolvimento deste trabalho, permitindo o uso do suporte técnico e humano do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão para o desenvolvimento deste estudo.

Às Profas. Mc. Sônia Maria de Farias Freire e Selma do Nascimento Silva pelas valiosas sugestões por ocasião do Exame de Qualificação.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pelo incentivo e investimento na qualificação e aperfeiçoamento do seu corpo docente, proporcionando o afastamento de minhas atividades didático-pedagógicas para realização deste de Doutorado.

À Coordenação da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e aos Professores da Pós-Graduação, por todos os ensinamentos.

À Direção do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) .

À Tânia Maria Alves de Araújo, secretária da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, por toda dedicação, eficiência, senso de justiça e por sua amizade.

A Nildes e Rosa pelo apoio realizado tanto no Biotério quanto nos laboratórios, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

A todos os funcionários do LTF, pela boa convivência e apoio prestado durante todos os anos que por aqui passei.

As amigas Iracelle Abreu, Leopoldina Milanez, Fátima Teixeira, Marilene Rocha, Leandra Eugênia Oliveira que sempre estiveram dispostas a me ajudar e por todos os ensinamentos compartilhados, pelas nossas conversas, risadas.

A Profa. Dra (Tia) Flavia Maria M. do Amaral, amiga querida de todas as horas, pela amizade e por todo carinho a mim dispensado, e pelo exemplo de docente-pesquisadora que é.

Aos amigos Thyago Queiroz, Abrahão Filho Carmem Alustau, Fabiola Furtado, Thays Josy, Raline Mendonça, Aldeídia Oliveira e Aurilene Carlos pelas nossas conversas, e pelos esclarecimentos para o bom desenvolvimento deste trabalho.

A Marcus Bispo, aluno do curso de Química da UFMA, que me acompanhou e não mediu esforços para me ajudar na parte de fitoquímica deste trabalho.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LTF/UFPB), pela amizade e atenção dispensada.

.A todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (UFMA), pela amizade e pela boa convivência.

Aos colegas do Departamento de Ciências Fisiológicas (UFMA) que concederam a liberação de minhas atividades docentes para que eu pudesse realizar esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através do Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT) e suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta tese.

Muito obrigada!

*Maria do Socorro de Sousa Cartágenes*

## RESUMO

A espécie vegetal *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae) é indicada para o tratamento de enfermidades da pele, cálculos renais, hipertensão arterial sistêmica, como antiinflamatório e antianêmico. Neste trabalho avaliou-se extrato das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot (EAC), a composição química do EAC, sua toxicidade e atividade no sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos SHR. Para a preparação do EAC usou-se folhas secas pulverizadas e maceradas em etanol 70%. Após a obtenção do EAC este foi fracionado obtendo-se várias frações, dentre as quais a F63, que por apresentar em cromatografia comparativa delgada, mais limpa e em maior quantidade, foi analisada em experimentos farmacológicos, <sup>1</sup>RMNH e CLAE. Na composição química do EAC, detectou-se a presença de taninos flobafênicos, flavononóis, flavonononas e compostos esteroidais. Na fração F63, observou-se sinais característicos para compostos alifáticos e aromáticos que dentre várias possibilidades, podem ser flavonóides. Para a avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) camundongos adultos, de ambos os sexos, receberam salina (0,1 ml/ 10g) ou EAC (0,5, 1,0 e 2,0 g/kg, ip), o que não produziu morte dos animais, bem como, não causou alterações comportamentais, ponderal ou alterações macroscópicas dos órgãos comparando-se ao grupo controle. O tratamento dos ratos com salina (0,1 mL/ 100g) e EAC não causou mortes, alterações comportamentais ou macroscópicas dos órgãos após autópsia. Ao final do período de tratamento de 14 dias, o sangue foi coletado para análise hematológica e bioquímica. Não houve diferença entre os grupos controle e tratado em relação ao consumo de ração, de água, peso corpóreo, bem como, não foram detectadas alterações de comportamento ou na análise macroscópica dos órgãos. O EAC (1,0 g/ kg) promoveu alteração significativa no VCM e na dosagem de Hemoglobina. O EAC de *Arrabidaea chica* Verlot (1 g/kg) promoveu alterações significativas na creatinina, uréia e HDL, na dose de 0,5 g/Kg, promoveu alteração significativa na uréia e no HDL. O EAC (2,0 g/ kg) alterou a glicose, AST e colesterol total, já na dose de 3,5 g/Kg o EAC alterou glicose e colesterol total. O EAC (5,0 g/kg) promoveu alteração de glicose, AST, uréia e HDL. O EAC (0,1; 0,2 e 0,5 g/kg, v.o.) administrado a animais SHR produziu hipotensão (38,2%; 49,9% e 34,4%) e bradicardia (13,4%; 15,35 % e 15,25%), com relação aos controles. Em animais normotensos houve redução dos níveis tensionais pressóricos sem alteração da frequência cardíaca. Nas artérias mesentérica superior isoladas de ratos normotensos ou hipertensos SHR submetidos ao tratamento crônico com EAC por 60 dias foi possível detectar redução do efeito máximo e deslocamento da curva na presença de noradrenalina quando comparado aos tecidos dos respectivos grupos controles. Na análise *in vitro* realizadas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional, na presença e ausência do EAC (100- 500 µg/mL) e F63 (10 - 30µg/mL) ocorreu redução do efeito máximo nas três doses utilizadas, de maneira dose dependente e estatisticamente significativa em preparações com endotélio intacto. Já preparações de artéria mesentérica pré-contraídas com noradrenalina, o EAC (10-500 µg/mL) e F63 (10-50µg/mL) promoveram relaxamento dependente de dose tanto na presença do endotélio quanto na ausência do mesmo. Na presença de L-NAME ou indometacina, o EAC não promoveu diferença do vasorelaxamento. O EAC promoveu um relaxamento em preparações pré-contraídas com KCl 80 mM, tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular. O EAC (50-500 µg/mL) e F63 (10-30 µg/mL) reduziram as contrações máximas induzidas por CaCl<sub>2</sub>. Em preparações pré-contraídas com S-(-)BayK 8644, o EAC (10-500 µg/mL) e F63 (10-300 µg/mL) promoveram relaxamento. As contrações induzidas por cafeína em meio livre de cálcio foram inibidas pelo EAC, porém a F63 não promoveu alterações das contrações induzidas por noradrenalina ou cafeína. Em conjunto, estes resultados sugerem que a hipotensão produzida pelo EAC de *Arrabidaea chica* Verlot pode estar relacionada a uma diminuição da resistência periférica total em consequência da participação do bloqueio dos canais Ca<sub>v</sub>1.2 em células da musculatura lisa vascular, bem como, bloqueio dos canais de rianodina.

Palavras-chave: *Arrabidaea chica* Verlot. Artéria mesentérica. Hipertensão (SHR).

## ABSTRACT

The species *Arrabidaea chica* (*Bignoniaceae*) is indicated to treatment of skin illnesses, renal stones, systemic arterial hypertension, as an antiinflammation and antianemia. In this paper it was evaluated the toxic effect of the extract of leaves of *Arrabidaea chica* Verlot (EAC), the chemical composition of EAC and the performance of EAC in the cardiovascular system of normotense and hypertense rats SHR. To the preparation of the EAC it was used dried pulverized leaves, macerated in ethanol 70%. After that the obtention of the EAC this was fractionated when it obtained several fractions among them the F63, this because of presenting in chromatography compared and thinned. It was cleaner and in a major quantity. It was analysed in pharmacological experiments, 1RMNH and CLAE. In the chemical composition of the EAC, it was detected the presence of flobafenical tanines, flavonos and steroidal compounds. In the the fraction F63 it was observed characteristic signals as to the alifatical compounds and aromatical. Among several possibilities they can be flavonoidal. To the evaluation of the acute toxicity ( $DL_{50}$ ) adult mice of both sexes received saline (0,1ml/10 g v. o) or EAC (0,5, 1,0 e 2,0 g/kg, ip), this didn't cause the death of animals as well it didn't get the behaviour alterations or macroscopic alterations of organs if compared to the control group. The treatment of rats with saline (0,1 mL/100g) and EAC (0,5, 1,0 g/kg, v.o), didn't cause deaths, nor behaviour or macroscopic alterations of the organs after autopsy. Finished the period of 14 days of treatment the blood was collected to its hematological and biochemical analysis, there wasn't difference between the control groups and treated in relation to the ration consume, corporal weight as well it wasn't detected alterations of behaviour or in the macroscopic analysis of the organs. The EAC (1,0 g/ kg) promoted meanful alteration in the VCM and in the doses of hemoglobine. The EAC of *Arrabidaea chica* Verlot (1 g/kg) promoted meanful alterations in the creatine, urea and cholesterol (HDL), in the dose of 0,5 g/Kg. It promoted, also, meanful alterations in the urea and in the HDL. The EAC (2,0 g/ kg) altered the glicosis, AST and total cholesterol, as to the dose of 3,5 g/Kg the EAC altered glicosis and total cholesterol. The EAC (5,0 g/kg) promoted alterations of glicosis, AST, urea and HDL the EAC (0,1; 0,2 e 0,5 g/kg, v.o.) administrated to hypertense rats SHR produced hypotension (38,2%; 49,9% and 34,4%) and bradycardia (13,4%; 15,35 % and 15,25%) as to the controls. In normotense animals there was reduction of the tension pressorical levels without alterations of the cardial frequency. In the mesenterical superior arteries isolated of normotense rats or hypertense SHR submitted to chronic treatment with EAC for 60 days it was possible to detect reductions of the maximal effect and displacement of the curve of presence of noradrenalin when compared to the tissues of the respective control groups. In the analysis *in vitro* performed in rings of mesenterical superior artery isolated of rats with and without functional endothelial, in the presence and absence of the EAC (100-500  $\mu\text{g/mL}$ ) and F63 (10-30 $\mu\text{g/mL}$ ) occurred reduction of the maximal effect in the three used doses, in a way that the dependent dose and statistically meanful action in preparations of the mesenteric pre-contracted artery with noradrenalin, the EAC (10-500  $\mu\text{g/mL}$ ) and F63 (10-50 $\mu\text{g/mL}$ ) promoted the dependent relaxing of dose both in the presence of the endothelial and in the absence of it. In the presence of L-NAME or indometacine, the EAC didn't promoted difference of the vasorelaxing. The EAC promoted a relaxing in precontracted preparations with KCl 80 mM both in the presence and in the absence vascular endothelial. The EAC (50-500  $\mu\text{g/mL}$ ) and F63 (10-30  $\mu\text{g/mL}$ ) reduced the maximal induced contractions per  $\text{CaCl}_2$ . In precontracted preparations with S-(-)-BayK 8644, the EAC (10-500  $\mu\text{g/mL}$ ) and F63 (10-300  $\mu\text{g/mL}$ ) promoted relaxing. The induced contractions per caffeine in a free ambience of calcium were inhibited by EAC, but the F63 didn't promoted alterations of the induced contractions by noradrenaline or caffeine. In a set these results suggest that the hypotension produced by the EAC of *Arrabidaea chica* Verlot can be related to a diminution of the peripheral total resistance in consequence of the participation of the blockade of the channels  $\text{Ca}_v1.2$  in cells of the vascular smooth muscle as well as the blockade of the ryanodine channels.

Keywords: *Arrabidaea chica* Verlot. Mesenterical artery. Hipertension (SHR).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia das folhas de <i>Arrabidaea chica</i> .....	40
Figura 2	A = <i>Rattus norvegicus</i> e B = <i>Mus musculus</i> .....	47
Figura 3	Sistema de aferição pressão arterial média (PAM). A: Detalhe frontal do sistema de aferição de pressão arterial (LSI LETICA). B: Visão geral do aparelho e contenção do animal para registro .....	63
Figura 4	Artéria mesentérica superior isolada de rato .....	67
Figura 5	Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução nutritiva de Tyrode .....	67
Figura 6	Vista geral do sistema de aquisição de dados <i>in vitro</i> .....	67

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot .....	51
Esquema 2	Esquema representativo de fracionamento do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> .....	52
Esquema 3	Esquema representativo de separação dos eluentes utilizados em coluna cromatográfica .....	53
Esquema 4	Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito de EAC e F63 em anéis providos de endotélio (E+) e anéis desprovidos de endotélio (E-) isolados de artéria mesentérica superior de ratos, em concentrações cumulativa de NOR (10-9 a 10-2). L= lavagem da preparação com Tyrode.....	68
Esquema 5	Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EAC e F63 em anéis providos de endotélio (E+) e anéis desprovidos de endotélio (E-) isolados de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídos com NOR (10µM). L= lavagem da preparação com líquido nutritivo .	69
Esquema 6	Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação da administração de 100µM de L-NAME ou 10 µM de indometacina sobre a resposta vasorelaxante produzida pelo EAC (100, 200 e 300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto, pré-contraídos com NA (10µM), L= lavagem da preparação .....	70
Esquema 7	Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito de concentrações crescentes de EAC (10 a 500 µg/mL) em anéis desprovidos de endotélio isolados de artéria mesentérica de ratos SHR pré-contraídas com KCl 80mM .L= lavagem .....	71
Esquema 8	Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito EAC em concentrações crescentes Ca <sup>2+</sup> (10-5 a 10-1M) em anéis desprovidos de endotélio isolados de artéria mesentérica de ratos SHR .L= lavagem.....	72
Esquema 9	Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de EAC (100, 200 e 300 µg/mL) ou F63 (10; 25 e 50 µg/mL) sobre contração induzida por BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.....	73
Esquema 10	Esquema representativo do protocolo experimental para avaliar o efeito de EAC (100; 250 e 500 µg/mL) ou F63 (10; 25 e 50 µg/mL) frente as concentrações transientes induzidas por NOR (1µM) ou cafeína (20mM), em meio livre de Ca <sup>2+</sup> , sobre anéis de mesentérica superior de rato. L= lavagem.....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Cromatograma mostrando o perfil de F63 nas seguintes condições analíticas: HPLC Varian Pro Star, UV/VIS, gradiente linear com o eluente A, H <sub>2</sub> O <sub>TFA,0,1%</sub> , eluente B ACN, no T <sub>0</sub> = 80% de A e 20% de B até 70% de B, em 45 minutos, com fluxo de 1mL/min em coluna 5 µ C18, dimensões 250x4.60mm (Phenomenex), amostras filtradas de 20 µL e detecção no comprimento de onda de 254nm. Os valores mostrados estão expressos em Tr=min, a intensidade dos sinais em mV e a concentração das substâncias em % foram as medidas da integral da área do pico .....	78
Gráfico 2	Espectro de RMNH da F63 de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	79
Gráfico 3	Efeito da administração aguda por via intraperitoneal (i.p.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na avaliação em camundongos (n=10). Os pontos e barras verticais representam, respectivamente, as médias ± erro padrão das médias de 14 dias de observação.....	81
Gráfico 4	Efeito da administração aguda, por via oral (v.o.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no peso corporal dos ratos. Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão das médias de 10 animais .....	82
Gráfico 5	Efeito da administração corporal aguda, por via oral (v.o.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no consumo de ração de ratos. Os pontos representam as médias de 6 animais/gaiola .....	82
Gráfico 6	Efeito da administração aguda por via oral (v.o.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no consumo de água de ratos. Os pontos representam as médias de 6 animais./gaiola.....	83
Gráfico 7	Efeito da administração crônica por via oral (v.o.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no peso dos ratos normotensos (A) e SHR (B). Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão das médias de 10 animais .....	89
Gráfico 8	Efeito da administração crônica por via oral (v.o.) do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no consumo de ração dos ratos normotensos (A) e SHR (B). Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão das médias de 10 animais.....	90
Gráfico 9	Efeito do EAC de <i>Arrabidea chica</i> Verlot. administrado durante 8 semanas, na pressão arterial sistólica de ratos normotensos n= 10. Os pontos e barras verticais representam a média ± erro padrão das médias de 10 experimentos. (*) Significativamente diferente do valor médio obtido no grupo controle (p < 0,05, teste t de Student)..	91

Gráfico 10	Efeito do EAC de <i>Arrabidea chica Verlot.</i> administrado durante 8 semanas, sobre a freqüência cardíaca de ratos normotensos. Os pontos e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias de 10 experimentos .....	92
Gráfico 11	Efeito do EAC de <i>Arrabidea chica Verlot.</i> administrado durante 8 semanas, na pressão arterial sistólica de ratos SHR Os pontos e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias de 10 experimentos.(*). Significamente diferente do valor médio obtido no grupo controle ( $p < 0,05$ , teste <i>t</i> de Student) .....	93
Gráfico 12	Efeito do EAC de <i>Arrabidea chica Verlot.</i> administrado durante 8 semanas, sobre a freqüência cardíaca de ratos SHR. Os pontos e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias de 10 experimentos.(*). Significamente diferente do valor médio obtido no grupo controle ( $p < 0,05$ , teste <i>t</i> de Student) .....	93
Gráfico 13	Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NOR) em artéria mesentérica de ratos normotensos <b>(A)</b> e SHR <b>(B)</b> tratados por 8 semanas com EAC de <i>Arrabidaea chica Verlot.</i> Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ erro padrão das médias ( $n = 5$ ). *Indica diferença significativa do $E_{max}$ em relação a curva controle de Noradrenalina ( $p < 0,05$ , ANOVA .....	96
Gráfico 14	Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NOR) em artéria sem endotélio intacto <b>(A)</b> e com endotélio intacto <b>(B)</b> de ratos hipertensos SHR na presença de concentrações de EAC de <i>Arrabidaea chica Verlot.</i> Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ erro padrão das médias ( $n = 6$ ). *Indica diferença significativa do $E_{max}$ em relação a curva controle de NOR ( $P \leq 0,05$ , ANOVA) .....	99
Gráfico 15	Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NOR) em artéria com endotélio intacto de ratos SHR na presença de concentrações de F63 de <i>Arrabidaea chica Verlot.</i> Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ erro padrão das médias ( $n = 6$ ). *Indica diferença significativa do $E_{max}$ em relação a curva controle de Noradrenalina ( $p < 0,05$ , ANOVA)....	100
Gráfico 16	Curvas concentração-resposta do EAC (A) ou F63 (B) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), na presença (■) ou na ausência (○) do endotélio vascular. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m de 6 experimentos.....	102
Gráfico 17	Curvas concentração-resposta de EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), pré-contráídos com noradrenalina (NOR) na ausência (○) e na presença de L-NAME (■). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m de 6 experimentos .....	103

- Gráfico 18 Curvas concentração-resposta de EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), pré-contraídos com noradrenalina (NOR) na ausência (○) e na presença de Indometacina (■). Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos ..... 104
- Gráfico 19 Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertensos (SHR) com endotélio intacto (A) ou removido (B) pré-contraídos com com NOR(■) ou KCl 80 mM (○) . Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos ..... 106
- Gráfico 20 Curvas concentração-resposta para CaCl<sub>2</sub> em solução despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso (SHR), desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de EAC (A) ou F63(B). Os valores estão expressos como média ± e.p.m. de 6 experimentos para cada concentração.\*Valor estatisticamente diferente do obtido na curva controle de CaCl<sub>2</sub> (\*\*p<0,01 ANOVA, *versus* controle) ..... 108
- Gráfico 21 Curvas concentração-resposta do EAC (A) ou F63 (B) sobre contrações induzidas por Bay K8644 (0,1 μM), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) sem endotélio vascular. Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos..... 110
- Gráfico 22 Efeito do EAC (100, 250 e 500 μg/mL) e F63 (10; 25 e 50 μg/mL) nas contrações transientes induzidas por Nor (10μM) e caf (20 mM) em meio livre de Ca<sup>2+</sup>, anéis de artérias mesentéricas isoladas sem endotélios de ratos SHR. EAC = (A = noradrenalina, B = cafeína) e F63 (C = noradrenalina, D= cafeína) ..... 112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios para avaliação dos resultados .....	76
Tabela 2	Resultados da análise farmacognóstica de EAC .....	77
Tabela 3	Parâmetros hematológicos após à administração aguda do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot em ratos .....	84
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos sangüíneos de ratos submetidos à administração aguda do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> , após 14 dias de observação .....	85
Tabela 5	Parâmetros hematológicos de ratos tratados, por 90 dias, com o EAC de <i>Arrabidaea chica</i> nas doses de 0,25 ou 0,5 g/Kg.....	86
Tabela 6	Parâmetros bioquímicos sangüíneos de ratos tratados cinco vezes por semana, por 90 dias, com o EH de <i>Arrabidaea chica</i> nas doses de 0,25 ou 0,5 g/Kg.....	87
Tabela 7	Parâmetro bioquímicos de ratos hipertensos SHR e tratados com EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	94
Tabela 8	Valores de CE <sub>50</sub> , pD <sub>2</sub> , e E <sub>max</sub> obtidos para a curva cumulativa de noradrenalina em preparações de artéria de ratos normotensos e SHR ...	95
Tabela 9	Valores de CE <sub>50</sub> , pD <sub>2</sub> , e E <sub>max</sub> obtidos para a noradrenalina na presença de EAC em preparações de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR .....	98
Tabela 10	Valores de CE <sub>50</sub> , pD <sub>2</sub> , e E <sub>max</sub> obtidos para a noradrenalina na presença de EAC em preparações de artéria de ratos SHR .....	100
Tabela 11	Valores de pD <sub>2</sub> e intervalo de confiança de pD <sub>2</sub> obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica na presença de EAC ou F63 de <i>Arrabidaea chica</i> com endotélio funcional.....	101
Tabela 12	Valores de pD <sub>2</sub> e intervalo de confiança de pD <sub>2</sub> obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica superior pelo EAC para avaliação da participação do óxido nítrico .....	103
Tabela 13	Valores de pD <sub>2</sub> e intervalo de confiança de pD <sub>2</sub> obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica superior pelo EAC para avaliação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico .....	104
Tabela 14	Valores de CE <sub>50</sub> , pD <sub>2</sub> , e E <sub>max</sub> obtidos para a curva concentração resposta de CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante e nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> na presença de F63 em preparações de artérias mesentérica com endotélio intacto de ratos hipertensos SHR .....	107
Tabela 15	Valores de pD <sub>2</sub> e intervalo de confiança de pD <sub>2</sub> obtidos nas curvas concentração-resposta do EAC ou F63 sobre contrações induzidas por Bay K8644 (0,1 µM), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) sem endotélio vascular .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS\* E SIGLAS

ACh	- Acetilcolina
AMPC	- Monofosfato de adenosina cíclico
BK <sub>Ca</sub>	- Canal para potássio sensível ao cálcio de grande condutância
BAY K8644	- S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-Ácidopiridinecarboxílico éster metílico
Ca <sub>v</sub> L	- Canais para cálcio sensível à voltagem tipo L
Ca <sup>2+</sup>	- Cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	- Concentração de cálcio intracelular
CCDC	- Cromatografia de camada delgada comparativa
CE <sub>50</sub>	- Concentração de uma substância que promove 50% do efeito máximo
CI <sub>50</sub>	- Concentração de uma substância que inibe 50 % do efeito máximo produzido por um
COX	- Ciclooxygenase
DAG	- Diacilglicerol
DC	- Débito cardíaco
EAC	- Extrato de <i>Arrabidaea chica</i>
EGTA	- Ácido etileno-glicol-tetracético
E <sub>max</sub>	- Efeito máximo
e.p.m.	- Erro padrão da média
eNOS	- Enzima sintase de NO endotelial
FC	- Frequência cardíaca
GDP	- Difosfato de guanosina
GPCR	- Receptor acoplado a proteína G
Gs	- Proteína G estimulatória
GMPc	- Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	- Trifosfato de guanosina
GTPase	- Trifosfatase de guanosina
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
DL <sub>50</sub>	- Dose letal de uma substância que promove 50% do morte
IP <sub>3</sub>	- 1,4,5-trisfosfato de inositol

---

\* As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

iNOS	- Enzima sintase de NO indutiva
K <sub>V</sub>	- Canal para potássio sensível à voltagem
K <sub>ATP</sub>	- Canal para potássio sensível à voltagem
K <sub>ir</sub>	- Canal para potássio retificador de entrada
L-NAME	- N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina methyl Ester
MLCK	- Cinase da cadeia leve da miosina
N	- Número de experimentos realizados
nNOS	- Enzima sintase de NO neuronal
NO	- Óxido nítrico
PGI <sub>2</sub>	- Prostaciclina
PD <sub>2</sub>	- Logaritmo negativo do valor de CE <sub>50</sub>
PAM	- Pressão arterial média
PAS	- Pressão arterial sistólica
PKA	- Proteína cinase A
PKC	- Proteína cinase C
PKG	- Proteína cinase G
PLC	- Fosfolipase C
RENISUS	- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RS	- Retículo sarcoplasmático
ROCC's	- Canais de cálcio operados por receptores
RPT	- Resistência periférica total
RYR	- Receptor de rianodina
SK <sub>Ca</sub>	- Canal para potássio sensível a cálcio de baixa condutância
SHR	- Ratos espontaneamente hipertensos
SUS	- Sistema Único de Saúde
UFMA	- Universidade Federal do Maranhão

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
2.1	<b>Geral</b> .....	27
2.2	<b>Específicos</b> .....	27
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
3.1	<b>Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)</b> .....	29
3.2	<b>Mecanismos regulatórios da pressão arterial e tônus da musculatura vascular</b> .....	30
3.3	<b>Espécie vegetal em estudo</b> .....	39
4	<b>MATERIAL</b> .....	47
4.1	<b>Animais</b> .....	47
4.2	<b>Planta</b> .....	47
4.3	<b>Drogas e reagentes</b> .....	48
4.4	<b>Soluções nutritivas</b> .....	48
5	<b>MÉTODOS DE ANÁLISE FITOQUÍMICA</b> .....	50
5.1	<b>Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot (EAC)</b> .....	50
5.2	<b>Fracionamento do EAC</b> .....	51
5.2.1	<b>Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)</b> .....	53
5.3	<b>Análises químicas da fração F63 por 1HRMN e CLAE</b> .....	53
5.4	<b>Análise farmacognóstica qualitativa do EAC</b> .....	53
6	<b>MÉTODOS DE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA- <i>IN VIVO</i></b> .....	59
6.1	<b>Determinação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> = Dose Letal 50%)</b> .....	59
6.2	<b>Análises Bioquímica e Hematológica</b> .....	60
7	<b>MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA - <i>IN VIVO</i></b> .....	62
7.1	<b>Tratamentos crônicos com administração do EAC por via oral</b> .....	62
7.1.1	<b>Evolução ponderal e consumo de ração</b> .....	62
7.1.2	<b>Registro da pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos SHR não anestesiados</b> .....	63
7.1.3	<b>Análise macroscópica dos órgãos</b> .....	64
7.1.4	<b>Análise bioquímica do sangue</b> .....	64

7.1.5	Avaliação da reatividade vascular dos animais normotensos e espontaneamente hipertensos tratados crônicamente.....	64
<b>8</b>	<b>MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>66</b>
<b>8.1</b>	<b>Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato espontaneamente hipertensos (SHR) com ou sem endotélio vascular</b> .....	<b>66</b>
<b>8.2</b>	<b>Protocolos experimentais</b> .....	<b>68</b>
8.2.1	Análise de EAC e F63 sobre adrenoceptores de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos SHR .....	68
8.2.2	Avaliação da influencia do endotélio funcional no efeito vasorelaxante de EAC e F63 em artéria superior de ratos hipertensos SHR.....	68
8.2.3	Verificação da participação do NO na resposta relaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR .....	69
8.2.4	Avaliação da participação dos metabolitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR.....	70
8.2.5	Efeito do EAC e fração F63 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (SHR).....	70
8.2.6	Avaliação do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por CaCl <sub>2</sub> em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR	71
8.2.7	Efeito do EAC ou F63 sobre contrações induzidas por S-(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR .....	72
8.2.8	Efeito do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por noradrenalina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR	73
<b>8.3</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>RESULTADOS DAS ANÁLISES FITOQUÍMICA</b> .....	<b>76</b>
<b>9.1</b>	<b>Rendimento e propriedades físicas do extrato hidroalcoólico de <i>Arrabidaea chica</i> (EAC)</b> .....	<b>76</b>
<b>9.2</b>	<b>Resultados da analise farmacognóstica qualitativa de EAC</b> .....	<b>76</b>
<b>9.3</b>	<b>Rendimento e propriedade física da F63</b> .....	<b>77</b>
<b>9.4</b>	<b>Resultado das análises em CLAE, e 1HRMN</b> .....	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>RESULTADOS DA AVALIAÇÃO TÓXICOLOGICA – <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>81</b>

<b>10.1</b>	<b>Avaliação da toxicidade aguda do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot em ratos e camundongos.....</b>	<b>81</b>
<b>10.2</b>	<b>Avaliações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos submetidos à toxicidade aguda.....</b>	<b>83</b>
10.2.1	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	83
10.2.2	Avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos.....	84
<b>10.3</b>	<b>Avaliação da toxicidade crônica do EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot em ratos.....</b>	<b>85</b>
10.3.1	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	85
10.3.2	Avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos.....	86
<b>11</b>	<b>RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>11.1</b>	<b>Avaliação do efeito da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a evolução ponderal; consumo de ração e órgãos autopsiados.....</b>	<b>89</b>
<b>11.2</b>	<b>Efeitos da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a frequência cardíaca e pressão arterial de ratos normotenso.....</b>	<b>91</b>
<b>11.3</b>	<b>Efeitos da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a frequência cardíaca e pressão arterial de ratos SHR.....</b>	<b>62</b>
<b>11.4</b>	<b>Avaliações dos parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos hipertensos SHR tratados cronicamente com EAC de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....</b>	<b>94</b>
<b>11.5</b>	<b>Efeito do tratamento crônico com o EAC sobre a reatividade de artérias mesentéricas com endotélio funcional de ratos normotensos e SHR com endotélio funcional.....</b>	<b>95</b>
<b>12</b>	<b>RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>98</b>
<b>12.1</b>	<b>Efeito do EAC sobre adrenoceptores de artéria mesentérica de ratos SHR.....</b>	<b>98</b>
<b>12.2</b>	<b>Efeito da F63 sobre adrenoceptores de artéria mesentérica de ratos SHR.....</b>	<b>100</b>
<b>12.3</b>	<b>Efeito da influência do endotélio funcional no efeito vasorelaxante do EAC ou F63 em artéria mesentérica de ratos SHR.....</b>	<b>101</b>
<b>12.4</b>	<b>Verificação da participação do NO na resposta relaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR.....</b>	<b>103</b>

<b>12.5</b>	<b>Avaliação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR .....</b>	<b>104</b>
<b>12.6</b>	<b>Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) .....</b>	<b>105</b>
<b>12.7</b>	<b>Avaliação do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR .....</b>	<b>106</b>
<b>12.8</b>	<b>Efeito de EAC ou F63 sobre contrações induzidas por S-(-) Bay K8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR).....</b>	<b>109</b>
<b>12.9</b>	<b>Efeito do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por noradrenalina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica de ratos SHR .....</b>	<b>111</b>
<b>13</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>14</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>129</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de industrialização, característico das sociedades urbanas, bem como os avanços tecnológicos, presentes na sociedade atual, contribuíram decisivamente para a mudança das principais causas epidemiológicas de mortalidade e morbidade, com predominância das doenças e agravos não transmissíveis em relação às doenças infecto-contagiosas e àquelas causadas por deficiência nutricional (YUSUF et al., 2001).

A elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular (LEWINGTON, 2002). A hipertensão arterial apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades (CESARINO et al., 2008).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, atingindo 37% quando são excluídos os óbitos por causas mal definidas e a violência. A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral, acometendo as mulheres em maior proporção (LOTUFO; LOLIO, 1996; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007).

Entre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão arterial é causa de 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana. A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007).

O nível socioeconômico mais baixo está associado à maior prevalência de hipertensão arterial e de fatores de risco para elevação da pressão arterial, além de maior risco de lesão em órgãos-alvo e eventos cardiovasculares. Hábitos dietéticos, incluindo aumento no consumo de sal e ingestão de álcool, índice de massa corpórea aumentado, estresse psicossociais, menor acesso aos cuidados de saúde e nível educacional são possíveis fatores associados (DE SIMONE et al., 2006).

O sedentarismo aumenta a incidência de hipertensão arterial, indivíduos sedentários apresentam risco aproximado 30% maior de desenvolver hipertensão que os ativos (POIRIER et al., 2005).

Estudo brasileiro revelou que, em indivíduos adultos, 50,8% sabiam ser hipertensos, 40,5% estavam em tratamento e apenas 10,4% apresentavam pressão arterial controlada (<140/90mmHg) (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007).

Os mecanismos responsáveis pelo aumento da pressão arterial ainda não estão completamente compreendidos. Trata-se de uma doença multifatorial decorrente da interação de aspectos ambientais e genéticos. Sabe-se, também, que a hipertensão arterial é poligênica e sua apresentação fenotípica dependerá do gene ou do grupo de genes envolvidos em cada caso. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pela HAS destacam-se: maior consumo de sal, obesidade, alteração dos sistemas renina – angiotensina – aldosterona e sistema nervoso simpático e, disfunção endotelial (AMODEO; HEIMANN, 2003).

Segundo Irigoyen et al. (2003), a pressão, definida como força ou unidade de área, é uma entidade física. A pressão arterial, portanto, depende de fatores físicos, como volume sanguíneo e capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o débito cardíaco ( $DC = \text{frequência cardíaca} \times \text{volume sistólico}$ ), a resistência vascular periférica e a capacitância venosa, que condiciona a pré – carga e, portanto, o volume sistólico. A manutenção (componente tônico) bem como, as variações momento a momento da pressão arterial (componente fásico) dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados da frequência e da contratilidade cardíaca, do estado contrátil de resistência, da capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos (GUYTON; HALL, 2006).

No quadro clínico de hipertensão já estabelecida, existem alterações em praticamente todos esses reguladores, sendo difícil estabelecer quais os que tiveram papel preponderante no desencadeamento e na manutenção de valores elevados de pressão arterial. Embora seja improvável que todos os fatores estejam alterados ao mesmo tempo, arranjos múltiplos podem ser encontrados, uma vez que o marcador hemodinâmico da hipertensão primária é o aumento persistente da resistência vascular periférica. Dessa forma, os mecanismos que promovem desequilíbrio entre

os fatores que aumentam a pressão arterial ou reduzem a pressão arterial, induzem alteração do calibre das arteríolas, pois eles atuam basicamente na contração da musculatura que regula a luz do vaso ou na espessura da musculatura, ocupando maior ou menor parte do lúmen, ou em ambas (IRIGOYEN et al., 2003).

As conseqüências decorrentes da hipertensão e os efeitos iatrogênicos dos fármacos comumente empregados para controlá-la, trazem sérios riscos à população (CARVALHAES; MOURA; MONTEIRO, 2008), por este motivo ocorre a crescente demanda da sociedade pela busca de plantas medicinais com atividade hipotensora (IBARROLA et al., 1996) e justifica a importância social e científica deste trabalho, pois o uso popular não é suficiente para validar de forma científica o emprego das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Então a avaliação da relação risco *versus* benefício é a finalidade dos estudos farmacológicos e toxicológicos.

Na Amazônia, a cultura do índio e do caboclo, especialmente no que se refere ao uso de plantas medicinais, tem muito a acrescentar à medicina tradicional, desde que estudos criteriosos sejam realizados.

Encontrada em toda a Amazônia e utilizada desde tempos imemoriais pelos índios para pintura do corpo e de utensílios (ROCHA et al., 2008), a *Arrabidaea chica*, cunhada pelos nativos como “crajirú”, é uma espécie vegetal conhecida popularmente pelas suas propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes. Algumas tribos amazônicas a utilizam contra conjuntivite aguda e picadas de insetos (ALBUQUERQUE, 1989). No estado do Maranhão é indicada para diminuir a pressão arterial (REGO, 1995).

Alguns componentes do extrato de *A. chica* já identificados (ZORN et al., 2001) classificam-se entre os flavonóides, substâncias encontradas em diferentes espécies vegetais, cuja ação hipotensora no sistema cardiovascular tem sido descrita (ROCHA et al., 2008).

A utilização tópica do extrato ou de formulações em creme ou gel de *A. chica*, na pele, também não levou a sinais de toxicidade (OLIVEIRA et al., 1998; PAES et al., 2005).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram intensa atividade antiinflamatória do extrato de *A. chica* (SAMPAIO et al., 1998; ANDRADE et al., 1997; MELLO et al., 2002), sugerindo inclusive ação imunomoduladora (SAMPAIO et al., 1998).

A ação cicatrizante da loção de *A. chica* foi comprovada em animais, permitindo diminuição significativa do tempo de cicatrização de feridas abertas ou suturadas e, da queimadura cutânea experimental (OLIVEIRA et al., 1998a, 1998b).

Não há na literatura científica estudos sobre a ação deste extrato em situação de hipertensão estabelecida. Caso o extrato de *A. chica* se revele como uma boa alternativa para o tratamento desta patologia, novas pesquisas poderão ser realizadas, inclusive com a finalidade de se elaborar uma formulação a partir do extrato. Inicialmente, no entanto, é importante que este estudo seja realizado com o extrato, pois uma medicação que tem preparação caseira e respaldo científico pode ser mais acessível à população.

O estudo das propriedades farmacológicas dessa planta representa não somente a busca de uma alternativa terapêutica, mas a utilização da biodiversidade da Amazônia em favor da saúde, bem como complementa informações científicas acerca desta espécie vegetal contemplada na lista do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - fev/ 2009).



# *Objetivos*

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar os efeitos tóxicos e cardiovasculares induzidos pelo extrato das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot por meio de uma abordagem *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos e espontaneamente hipertenso (SHR).

### 2.2 Específicos

#### *In vivo*

- Caracterizar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não anestesiados.
- Avaliar a toxicidade aguda e crônica do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot

#### *In vitro*

- Avaliar o efeito do extrato de *A. chica* Verlot e fração na reatividade vascular de ratos hipertensos SHR;
- Caracterizar o(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação(ões) da atividade anti-hipertensiva de *A. chica* Verlot

# *Revisão de Literatura*

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)**

O desenvolvimento de hipertensão depende da interação entre predisposição genética e fatores ambientais (DIDIER et al., 2007). Sabe-se, no entanto, que a hipertensão é acompanhada por alterações funcionais do sistema nervoso autônomo simpático, de mecanismos renais, do sistema renina

angiotensina, além de outros mecanismos humorais e, endotelial. Assim a hipertensão arterial resulta de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular que tanto amplificam o estímulo hipertensivo, quanto causam dano cardiovascular (GHOFRANI; WILKINS; RICH, 2008).

O sistema simpático tem grande importância na gênese da hipertensão arterial e contribui para a hipertensão relacionada com o estado hiperdinâmico. Vários autores relataram concentrações aumentadas de noradrenalina no plasma em pacientes portadores de hipertensão essencial, particularmente em pacientes mais jovens. Estudos mais recentes sobre atividade simpática medida diretamente sobre nervos simpáticos de músculos superficiais de pacientes hipertensos confirmam esses achados (KAPLAN, 2001).

A sobrecarga do sistema cardiovascular causada pelo aumento da pressão arterial e pela ativação de fatores de crescimento leva a alterações estruturais de adaptação, com estreitamento do lúmen arteriolar e aumento da relação entre a espessura da camada média e da parede arterial. Isso aumenta a resistência ao fluxo e aumenta a resposta aos estímulos vasoconstritores. Adaptações estruturais cardíacas consistem na hipertrofia da parede ventricular esquerda em resposta ao aumento na pós-carga (hipertrofia concêntrica), e no aumento do diâmetro da cavidade ventricular com aumento correspondente na espessura da parede ventricular (hipertrofia excêntrica), em resposta ao aumento da pré-carga (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007).

Mecanismos renais estão envolvidos na patogênese da hipertensão, tanto através de uma natriurese alterada, levando à retenção de sódio e água, quanto pela liberação alterada de fatores que aumentam a pressão arterial (PA) como a renina (COHEN, 2006).

O sistema renina-angiotensina está envolvido no controle fisiológico da pressão arterial e no controle do sódio. Tem importantes implicações no desenvolvimento da hipertensão renal e deve estar envolvido na patogênese da hipertensão arterial essencial. O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona ao nível cardíaco, vascular e renal é mediado pela produção ou ativação de diversos fatores de crescimento e substâncias vasoativas, que induzem à vasoconstrição e hipertrofia celular (COHEN, 2006).

Estudos demonstram o envolvimento do endotélio na conversão da angiotensina I em angiotensina II, na inativação de cininas e na produção do fator

relaxante derivado do endotélio. Além disso, o endotélio está envolvido no controle hormonal e neurogênico local do tônus vascular e dos processos homeostáticos. Também é responsável pela liberação de agentes vasoconstritores, incluindo a endotelina, que está envolvida em algumas das complicações vasculares da hipertensão (NEGRI; CAMARGO, 2003).

Na presença de hipertensão ou aterosclerose, a função endotelial está alterada e as respostas pressóricas aos estímulos locais e endógenos passam a se tornar dominantes. Ainda não é possível determinar se a hipertensão de uma forma geral está associada à disfunção endotelial. Também ainda não está claro se a disfunção endotelial seria secundária à hipertensão arterial ou se seria uma expressão primária de uma predisposição genética (NOBRE; LIMA, 2000).

### **3.2 Mecanismos regulatórios da pressão arterial e tônus da musculatura vascular**

Pressão arterial é a força com a qual o coração bombeia o sangue através dos vasos. É determinada pelo volume de sangue que sai do coração e a resistência que ele encontra para circular no corpo. Ela pode ser modificada pela variação do volume ou viscosidade do sangue, da frequência cardíaca e da elasticidade dos vasos. Os estímulos hormonais e nervosos que regulam a resistência sanguínea sofrem a influência individual e ambiental (JARDIM, 1998).

A regulação da pressão arterial é uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001), esta regulação é o resultado da atividade e de sistemas de retroalimentação que operam em curto prazo e em longo prazo (DAMPEY, 1994).

O principal mecanismo de controle em curto prazo é desempenhado pelos reflexos que são originados nos pressorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (CHOBANIAN et al., 2003). Existem diversos mecanismos reguladores cardiovasculares, os quais atuam isoladamente, com o objetivo de garantir adequado volume sanguíneo circulante e pressão arterial e venosa sistêmica mais estáveis possíveis, dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para a espécie, visando a manutenção do fluxo sanguíneo tecidual. Desta forma, o volume sanguíneo e a pressão circulatória são as duas variáveis

hemodinâmicas finais envolvidas na regulação cardiovascular (ROCKMAN; KOCH; LEFKOWITZ, 2002).

Os mecanismos referidos podem ter atuação remota, quando se processam distante das estruturas cardiovasculares sob regulação, ou podem ser de natureza local, quando as influências reguladoras se processam na intimidade dos órgãos e aparelhos, para o ajuste do fluxo sanguíneo local, por meio de substâncias ou metabólitos produzidos localmente como as cininas, prostaglandinas, e angiotensina. A regulação do fluxo sanguíneo, os mecanismos de ação remota são de natureza neural, humoral e neurohumoral (JAKSON, 2000; CRIBBS, 2006).

As influências neurais sobre os componentes cardiovasculares se processam de maneira direta e reflexa. Diretamente, a partir de estruturas situadas em todos os níveis do sistema nervoso central, por meio das terminações autonômicas eferentes simpática e parassimpática e reflexamente, por meio de arcos reflexos de complexidade variada, sendo importante em diferentes níveis do sistema nervoso central, como o espinal, o ponto bulbar, o mesencefálico, o cerebelar e o cortical, os quais recebem informações aferentes procedentes de receptores diversos e emitem influências eferentes de retorno ao aparelho cardiovascular, via ramos nervosos simpáticos e parassimpáticos (LEVY et al., 1983; MARSBOOM et al., 2008).

Os barorreceptores que envolvem o sistema nervoso simpático são responsáveis pela regulação rápida, momento a momento da pressão arterial. Uma queda da pressão determina que os neurônios sensíveis a pressão (barorreceptores do arco aórtico e seio carotídeo) remetam poucos impulsos aos centros cardiovasculares na medula espinal. Isso determina uma resposta reflexa imediata de aumento do estímulo simpático e diminuição parassimpática ao coração e aos vasos, resultando em vasoconstrição e aumento do débito cardíaco. Essas mudanças resultam em um aumento compensatório de pressão sanguínea (ZIPES et al., 2004).

Os quimiorreceptores auxiliam os barorreceptores na regulação da pressão arterial. Eles são estimulados pela diminuição do oxigênio e pelo aumento de CO<sub>2</sub>, quando há queda da pressão arterial. Nestas condições, eles excitam o centro vasomotor, que promove o aumento de pressão arterial através do aumento da resistência periférica e do débito cardíaco (SHEPHERD et al., 1982). A influência reguladora humoral diz respeito às diversas substâncias circulantes e hormônios

produzidos em diferentes locais que vão modificar remotamente as variáveis cardiovasculares (GUYTON; HALL, 2006). Esta regulação humoral atua principalmente auxiliando os barorreceptores na elevação da pressão arterial, quando sua queda é mantida por alguns minutos devido a incapacidade deste sistema de elevá-la aos valores normais. Nesta situação a medula da supra-renal libera pequenas quantidades de noradrenalina e grandes de adrenalina (EVORA; LEVIN, 2004).

A regulação da pressão arterial em longo prazo é determinada pelo equilíbrio entre a ingesta e o débito de líquido e o volume sanguíneo conseqüente a essa condição, os barorreceptores nos rins respondem a pressão arterial reduzida (NEEDLEMAN et al., 1986).

A função renal apresenta mecanismos complexos para a regulação da pressão arterial, pois os mesmos são influenciados pelos nervos simpáticos renais que participam do controle da circulação renal, na filtração, na reabsorção e na secreção de solutos e água, bem como na secreção de substâncias vasoativas (ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2007).

Sob determinadas condições, como por exemplo, na depleção líquida ou no baixo débito cardíaco, quando o influxo renal não pode ser mantido, o mecanismo auto-regulador preserva a filtração glomerular, produzindo vasoconstrição da arteríola eferente, que mantém o gradiente transglomerular de pressão. A resistência vascular renal se ajusta automaticamente às variações na pressão de perfusão renal. As arteríolas eferentes e aferentes são influenciadas por muitos estímulos nervosos e hormonais vasculares, embora a sua resposta dependa das necessidades renais e sejam moderadas pelos mecanismos auto-regulatórios (HILL et al., 2001).

Os mecanismos auto-regulatórios são a resposta miogênica, que não é específica dos rins e o sistema de retrocontrole do fluxo tubular (FUJIHARA et al., 1994). A resposta miogênica refere-se à propriedade dos vasos de responderem com vasoconstrição ou vasodilatação na pressão transmural. As respostas miogênicas ocorrem independentemente das células endoteliais ou células parenquimatosas (KRIEGER, 2000). Esta resposta é, portanto particularmente presente nos vasos de resistência, cuja, parede é rica em células musculares (HILL et al., 2001).

O aumento no estiramento na parede dos vasos é percebido pelas células musculares lisas, resultando em ativação de vários mensageiros intracelulares que aumentam a concentração de cálcio intracelular através de canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ) (LEDOUX et al., 2006; BIRGIT; DOBROMIR, 2007).

Os músculos lisos vasculares são os principais responsáveis pela atividade fisiológica do sistema circulatório, sendo um dos principais constituintes da parede dos vasos sanguíneos. As suas muitas funções dependem do tipo e localização do vaso, o desenvolvimento ou o estado patológico, e fatores ambientais e químicos. Alterações dessa musculatura estão ligadas a diversas doenças, tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (CRIBBS, 2006).

A contração e o relaxamento do músculo liso vascular são controlados pela concentração citoplasmática de cálcio  $[Ca^{2+}]_c$  que, por sua vez, ativa as proteínas celulares do aparato contrátil (BYRON, 2008).

As células musculares lisas vasculares (VSMCs) utilizam íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) como um sinal molecular de múltiplas funções. Uma via de sinalização importante de  $Ca^{2+}$  é a entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ), que em células VSMCs são de dois tipos principais, os ativados por alta voltagem do tipo L e os transientes, que são chamados de canais tipo T (LORY; BIDAUD; CHEMIN, 2006).

Considerando que os canais para cálcio tipo L são os que efetivamente contribuem para a regulação da entrada de cálcio e conseqüentemente a contração muscular, os canais do tipo T não contribuem efetivamente para a vasoconstrição arterial, com a possível exceção da microcirculação renal (CRIBBS, 2006).

O principal determinante do tônus vascular é o nível de fosforilação da cadeia leve de miosina dependente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina e pela fosfatase da cadeia leve da miosina (CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001; SASAKI; SATO; UMEZAWA, 2003).

A contração das células do músculo liso vascular inicia com o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  que pode ocorrer por aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  operados por receptores ou pela liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares como do retículo sarcoplasmático. Subseqüentemente, ocorre a ligação do  $Ca^{2+}$  à calmodulina, formando complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que leva a ativação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), a enzima responsável pela fosforilação da cadeia leve de

miosina. A fosforilação da cadeia leve de miosina permite que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação da ponte cruzada da miosina com a actina. Isto gera um estado de ligação forte entre essas duas proteínas produzindo a contração vascular (WIJETUNGE; HUGHES, 2007).

A redução de  $[Ca^{2+}]_c$  desfaz o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que inativa a MLCK, e ativa a fosfatase da miosina que é a enzima da cadeia leve da miosina, removendo os fosfatos de alta energia, promovendo assim o relaxamento muscular (SUZUKI et al., 2004). O aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina e a capacidade da célula em produzir tensão em níveis sub-ótimos de  $Ca^{2+}$  é um mecanismo conhecido como sensibilização ao  $Ca^{2+}$ , sendo a inibição da fosfatase da miosina o principal fator que contribui para este fenômeno (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Acredita-se que a ativação da fosfatase da miosina ocorra pela via do NO/GMPc reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina, levando a dessensibilização ao  $Ca^{2+}$  (SOLARO, 2000).

A disfunção endotelial leva a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) que resulta em aumento na ativação dos canais para  $Ca^{2+}$  nas células do músculo liso vascular. Níveis elevados de GMPc promovem um relaxamento que, em parte, é devido à redução do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo L. O NO inibe estes canais de modo indireto, através da ativação da proteína quinase G, que causa a abertura dos canais para  $K^+$  e repolariza a célula, resultando em fechamento dos canais para  $Ca^{2+}$  voltagem dependente, ou através do modo direto, pela fosforilação da PKG ou das fosfoproteínas regulatórias, no próprio canal de  $Ca^{2+}$  diminuindo a abertura destes canais, independentemente de voltagem (BELLAMY et al., 2008).

A atividade dos canais para potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares, sendo um determinante importante para o tônus vascular (FARACI; SOBEY, 1998).

A abertura de um canal para potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons, do meio intracelular para o meio extracelular, por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular (SOBEY, 2001). Este estado de hiperpolarização conduz ao fechamento de canais para  $Ca^{2+}$  para o interior da célula, causando o relaxamento vascular de forma inversa, o fechamento de um canal para potássio causa um

estado de despolarização, abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes da voltagem, aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  e vasoconstrição (FARACI; SOBEY, 1998; SOBEY, 2001).

As células musculares vasculares expressam quatro diferentes tipos de canais para potássio: canal para potássio dependente de voltagem (Kv), canal para potássio dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), canal para potássio dependente do ATP e Canal para potássio (Kir-inward rectifier) (VAN HOVE et al., 2009).

Outro mecanismo regulatório do desempenho cardiovascular é a estimulação de adrenoceptores por catecolaminas. Os adrenoceptores são glicoproteínas localizadas na membrana plasmática de células de vários tecidos, inclusive o miocárdico, onde predominam aqueles do tipo  $\beta$ . (BRISTOW et al., 1988; STEINFATH et al., 1992; BRODDE; MICHEL, 1999).

Os receptores adrenérgicos foram classificados como  $\alpha$  (excitatórios) e  $\beta$  (inibitórios) por Ahlquist (1948), com base no seu papel funcional nos vasos sanguíneos. A série de potência de agonistas característica dos adrenoceptores  $\alpha$  é: adrenalina (Adr) > NAadrenalina (NA) >> isoproterenol (ISO), enquanto que, para adrenoceptores  $\beta$ , a série é: ISO > Adr > NA. Esta classificação de Ahlquist foi expandida por Lands et al. (1967), que reconheceram que cada um dos tipos de adrenoceptores,  $\alpha$  e  $\beta$ , poderia ser categorizado em 2 subtipos distintos, com base nas potências relativas de agonistas. Estes tipos foram posteriormente subdivididos em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (LANGER, 1974), e  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (LANDS; LUDUENA; BUZZO, 1967).

As vias de transdução bioquímica funcionalmente associadas a adrenoceptores  $\alpha$  e  $\beta$  envolvem o acoplamento do receptor a proteínas multiméricas ligantes de nucleotídeos de guanina (proteínas G), que atuam como chaves moleculares e sensores da ocupação dos receptores a elas acoplados.

A resposta inotrópica positiva induzida pela estimulação de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  está associada à ativação da fosfolipase C (PLC), pela ação da subunidade  $\alpha_q$  da proteína G acoplada ao receptor. PLC hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (presente na membrana plasmática) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositoltrifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Este, por sua vez, induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares como, por exemplo: do retículo sarcoplasmático (RS), por sua ligação a sítios receptores de  $\text{IP}_3$ , presentes em um tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana do RS, que é diferente do RyR. Por outro lado, DAG desempenha um papel na ativação da proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC), cujos substratos incluem o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L do sarcolema, canal de  $\text{K}^+$  ( $\text{Kv}4.2$ ), troponina I (presente nos filamentos

finos do sarcômero) e o trocador  $\text{Na}^+ \text{H}^+$ . A estimulação da atividade deste trocador leva à alcalinização intracelular que resulta num aumento da afinidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  (ENDOHO et al., 1991; TERZIC et al., 1993; PATEL; CAMPBELL, 2005).

Entre os adrenoceptores  $\beta$ , o subtipo  $\beta_2$  é o predominante na maioria dos leitos vasculares. O subtipo  $\beta_1$  predomina em certos leitos como artérias coronárias (O' DONNEL; WANSTALL, 1985; BEGONHA; MOURA; GUIMARÃES, 1995) e cerebrais (EDVINSSON; OWMAN, 1974). Estudos *in vivo* mostram que os  $\beta$ -adrenoceptores têm grande importância para a regulação fisiológica do tônus vascular. Ou seja, a estimulação do  $\beta$ -adrenoceptores periféricos leva a relaxamento do músculo liso vascular, controlando assim a resistência vascular periférica e consequentemente a distribuição do sangue para diferentes órgãos (OATES, 1996).

Os antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  são amplamente prescritos a pacientes com hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares, mas os mecanismos de ação destes fármacos são pouco compreendidos. Diversos estudos mostram que a redução da pressão arterial em resposta aos  $\beta$ -bloqueadores está associada à liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio, particularmente de óxido nítrico (NO), mas redução na produção de ânion superóxido e efeitos antioxidantes têm sido também associados aos efeitos anti-hipertensivos dos  $\beta$ -bloqueadores (MOSTAGHIM; MADDOX, RAMWELL, 1986; GAO et al., 1992; BROEDERS et al., 2000; KUROSAKI et al., 2000; ARUMANAYAGAM, 2001).

O endotélio vascular é uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constituindo uma interface ativa, estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular (VANE; ANGARD; BOTTING, 1990). Esta camada monocelular quando intacta controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas pequenas e grandes e mesmo de células. Provê uma interface não-trombogênica entre o vaso e os componentes sanguíneos, mantém a fluidez do sangue e modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular. O endotélio é um local ativo de síntese, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos, além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (VRINTS; HERMAN, 1991).

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tono vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e à própria aterogênese. Entre as múltiplas funções biológicas do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem:

1 – Síntese de substâncias relaxantes (vasodilatadoras) e antiplaquetárias: fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF), fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), outras prostaglandinas e bradicinina.

2 – Síntese de substâncias vasoconstritoras e ativadoras da agregação plaquetária ou fatores de contração derivados do endotélio (EDCF): endotelinas, endoperóxidos (prostaglandina H<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>), leucotrienos, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio.

3 – Existência de complexos de substâncias vasoativas e envolvidas na agregação plaquetária e coagulação: acetilcolina, serotonina, trombina, nucleotídeos da adenosina, vasopressina e ácido araquidônico.

4 – Metabolismo e inativação de catecolaminas e serotonina pela MAO (monoaminoxidase) e de angiotensina II, pelas angiotensinas A e C e de outros produtos plaquetários (ONO; ONO; FROHLICH, 1995).

O endotélio desempenha importante efeito regulador do tono vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas e sinais humorais ou estímulos químicos da corrente sanguínea transmitindo-os às células musculares lisas vasculares (DZAU, 1989). Admite-se que as interações e a potência relativa dos mediadores vasodilatadores e vasoconstritores dependentes do endotélio sejam fundamentais na regulação do fluxo sanguíneo, da pressão arterial e da perfusão tissular, momento a momento, tanto em condições fisiológicas como patológicas (GRYGLEWSKI; BOTTING; VANE, 1988).

O NO está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de músculo liso e neurotransmissão no sistema nervoso central, sendo a maior parte de seus efeitos mediada pela estimulação direta da ciclase de guanilil solúvel (DENNINGER; MARLETTA, 1999; BARDAL et al; 2003).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, reação mediada pela óxido nítrico sintase (NOS), com formação simultânea de L-citrulina (MURAD et al., 1988). Foram clonadas e caracterizadas três isoformas dessa enzima. Duas são dependentes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina e

expressas de forma constitutiva predominantemente no cérebro (nNOS) e células endoteliais (eNOS). (HOENICKA; SCHIMID, 2008).

Admite-se que a NOS constitutiva do endotélio seja responsável pela geração de níveis baixos e intermitentes de NO, suficientes para manter o tônus vascular basal. A síntese da eNOS é ativada por diversos agonistas, como acetilcolina, catecolaminas e angiotensina, e estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento, os quais, via trifosfato de inositol (IP3), causam liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, que se une à calmodulina. A outra isoforma da NOS é independente de  $Ca^{2+}$ , induzível por citocinas (iNOS), e expressa-se em macrófagos, células musculares lisas, mesangiais e em células da microcirculação, produzindo grandes quantidades de NO (HOENICKA; SCHIMID, 2008).

A prostaciclina, ou prostaglandina (PG)<sub>I2</sub>, é um eicosanóide derivado do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolípidos da membrana endotelial por fosfolipases ativadas, A<sub>2</sub> e C. Por ação da enzima ciclooxigenase formam-se os endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>. Este, por ação da prostaciclina sintase, origina nas células endoteliais a prostaciclina (NEEDLEMAN et al., 1986).

A estimulação dos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas provoca ativação da adenilato ciclase, induzindo aumento do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e estimulação da proteinocinase dependente do AMPC (PKA) na musculatura lisa vascular. A PKA exerce efeito similar à PKG, causando a saída de  $Ca^{2+}$  do citosol e inibindo a maquinaria contrátil. A contribuição da prostaciclina à vasodilatação dependente do endotélio é usualmente pequena. De outra parte, pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores, como PGH<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>, são também formadas, porém, em condições fisiológicas, seus efeitos são inibidos pelo efeito vasodilatador da prostaciclina, do NO e do EDHF (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999).

### 3.3 Espécie vegetal em estudo

A espécie vegetal utilizada neste estudo, como base de uma possível droga para tratamento da hipertensão arterial, foi *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot., Bignoniaceae.

É uma planta nativa das florestas tropicais e encontrada na América Central e em toda a Amazônia (MAIA et al., 1994), onde é conhecida popularmente como crajiru, carajuru, pariri, cipó cruz, coá-pyranga, guajuru, guajuru-piranga, oajuru, ou, pyranga (BORRÁS, 2003).

Esta espécie vegetal caracteriza-se por ser uma trepadeira de ramos cilíndricos e globosos enquanto jovens, depois tetrágonos, lenticelado-verrucosos e estriados. Suas folhas são pecioladas, compostas de dois ou três folíolos com um cirro intermédio simples e terminal. Os folíolos são oblongos, oblongo-lanceolados ou oval-lanceolados, raramente ovalados e quase sempre curto-agudo-acuminados, obtusos na base, glabros nas duas páginas, coriáceos, discolores ou concolores. O cálice é densamente pulverulento. As flores, campanulado-infundibiliformes, róseas ou violáceas ou purpureobrancacentas com face branca, aveludadas, dispostas em panícula terminal piramidal, frouxa, com até 22 cm de comprimento. O fruto é capsular linear, alongado, agudo dos dois lados e com uma nervura média saliente nas valvas, de cor castanho-ferrugineo e com sementes ovóides (COSTA et al., 2001).

As folhas, quando recém coletadas, têm cor verde escuro. Após secas, adquirem cor vermelho-escura característica. O chá preparado de acordo com a informação popular adquire um tom semelhante ao do vinho tinto (MATTA, 1913; LeCOINTÉ, 1934; LIMA et al., 1995).

De acordo com Cronquist (1981) a planta em estudo tem a seguinte classificação taxonômica:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Asteridae

Ordem: Scrophulariales

Família: Bignoniaceae

Gênero: *Arrabidaea*

Espécie: *Arrabidaea chica*



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 1** – Fotografia das folhas de *Arrabidaea chica*

Este vegetal é empregado para fins terapêuticos pela população, onde é indicado no combate das enfermidades da pele, cólicas intestinais, piodermites, enterocolites, albuminúria, anemia, leucemia, conjuntivite, *diabetes mellitus* e icterícia. Apresenta propriedades adstringentes e antiinflamatórias, principalmente uterina e ovariana (ALBUQUERQUE, 1989; COSTA; LIMA, 1989; BALBACH, 1990; RÊGO, 1995; KALIL FILHO et al., 2000). De acordo com Borrás (2003), a *A. chica* é utilizada popularmente na Amazônia como antiinflamatório, cicatrizante, antianêmico, sendo preparada na forma de chá para administração por via oral ou para lavagens vaginais e banho de assento; ou na forma de tintura para uso tópico diretamente sobre as lesões de pele ou ainda como pomadas e cremes. Algumas tribos amazônicas a utilizam contra conjuntivite aguda e picadas de insetos (ALBUQUERQUE, 1989). No estado do Maranhão, região nordeste do Brasil, esta espécie vegetal é utilizada no tratamento dos cálculos renais e da hipertensão arterial sistêmica (RÊGO, 1995).

Estudos fitoquímicos do extrato aquoso e hidroalcólico de *A. chica* Verlot. revelaram a presença de compostos flavonoídicos, taninos e saponinas, sendo os testes negativos para antraquinonas e alcalóides (OLIVEIRA et al., 1996a, 1996b, 1996c; COSTA et al., 2001).

A partir de folhas secas da *A. chica*, Zorn et al. (2001) isolaram seis componentes. Entre eles, a flavona acacetin, o ácido triterpeno oleanólico e as seguintes 3-desoxiantocianidinas: (1) 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavylium; (2) 6,7,4'-

trihidroxi-5,'-metoxi-flavylium; (3) 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxy-flavylium e (4) 6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavyliume. As duas primeiras 3-desoxiantocianidinas foram identificadas, respectivamente, como a "carajurin" e a "carajurone" já descritas por Chapman et al. (1927), sendo aquela a responsável pela cor avermelhada do extrato (PONNIAH; SESHADRI, 1953). A estrutura química de algumas dessas 3-desoxiantocianidinas foi confirmada no estudo de Devia et al. (2002).

Na Universidade Federal do Amazonas (Departamento de Medicamentos e Alimentos/FCS), experimentos demonstraram a baixa toxicidade do extrato de *A. chica* após sua administração por via oral e intraperitoneal (OLIVEIRA et al., 1996b). Efeitos tóxicos não foram descritos quando o extrato foi administrado intravenosamente para estudo de atividade antiinflamatória (SAMPAIO et al., 1998a, 1998b).

Apesar da acidez do extrato de *A. chica*, com pH de 4.7 (OLIVEIRA et al., 1996b), estudos experimentais não evidenciaram nenhum sinal clínico ou histopatológico de toxicidade do extrato na mucosa gástrica (CUNHA et al., 2000), na pleura (OLIVEIRA et al., 2004) ou em feridas abertas, feridas suturadas e queimaduras (OLIVEIRA et al., 1998b).

A formulação em gel de *A. chica*, aplicada em feridas abertas de ratos Wistar, também não induziu sinais de toxicidade (PAES et al., 2005).

Em humanos, não foram observados sinais clínicos de toxicidade ou hipersensibilidade quando o creme de *A. chica* a 2% foi utilizado em úlceras flebopáticas de pacientes diabéticos (OLIVEIRA et al., 1998b) ou em pacientes com queimaduras e escoriações (MENDES et al., 2001).

A atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *A. chica* foi avaliada por meio de testes *in vitro* e de modelos experimentais de pleurisia e de ativação de linfócitos em camundongos, onde foi observado que na dose de 200mg/kg, houve significativa inibição do acúmulo de neutrófilos pleurais, da produção de óxido nítrico sugerindo a ação antiinflamatória do extrato de *A. chica* e sugeriram uma atividade imunomoduladora (SAMPAIO et al., 1998a, 1998b).

A administração, por via oral, do extrato de *A. chica* na dose de 70mg/kg inibiu significativamente o edema induzido pela formalina em pata de camundongos (ANDRADE; OLIVEIRA; SANTOS, 1997).

Atividade antiinflamatória do extrato também foi evidenciada em modelos experimentais de alergia, onde foi observada a inibição do acúmulo de leucócitos totais, neutrófilos e eosinófilos (MELLO et al., 2002).

Em pacientes com queimadura cutânea de primeiro e segundo graus, observou-se acentuada atividade antiinflamatória e cicatrizante do creme de *A. chica* a 2% em comparação com o grupo controle (MENDES et al., 2001).

Lima et al. (1995) observaram atividade antimicrobiana do extrato de *A. chica* contra espécies de *Cândida* ssp., de *Mycobacterium* ssp., de fungos filamentosos e de bactérias Gram-positivas.

Embora a *Arrabidaea chica* seja utilizada pela população como antianêmico, este efeito ainda não foi comprovado cientificamente. Após administração do extrato via oral por 60 dias, ratos Wistar apresentaram aumento do valor do micro-hematócrito (11,3%), da hemoglobina (22,44%) da hematimetria (14,8%) e da leucometria (38,9%) em relação aos mesmos parâmetros medidos antes do tratamento. Estes valores diminuíram após a interrupção do mesmo (OLIVEIRA et al., 1996a).

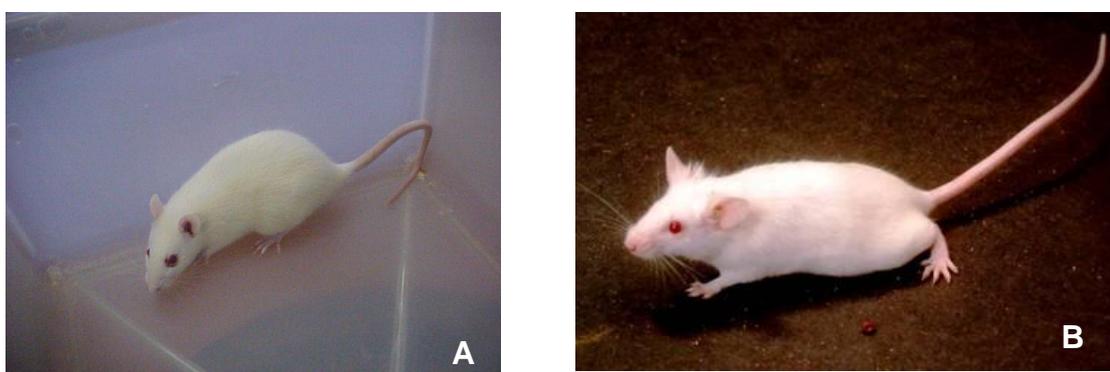
De acordo com Arakian et al. (1998), o ferro existente nas folhas de *A. chica* não é biodisponível. Além disso, as quantidades de ferro, manganês, zinco e cobre, quando avaliadas em relação à média do consumo diário humano, apresentam-se inferiores às necessárias para justificar atividades terapêuticas (SOARES, 2003).

*Material*

## 4 MATERIAL

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus NAVEgicus*) normotensos e espontaneamente hipertenso (SHR), pesando entre 200 e 300g, e camundongos (*Mus musculus*) pesando entre 20 e 30g, ambos os sexos, todos provenientes do Biotério da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 2** – **A** = *Rattus NAVEgicus* e **B** = *Mus musculus*

Todos os animais foram mantidos sob condições controle de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em um ciclo claro e escuro de 12 horas (6h00 às 18h00), e com livre acesso a água e a alimentação. Os experimentos eram realizados no período de 7h00 as 17h00 (*in vivo*) e de 7h00 as 19h00 (*in vitro*).

Todos os protocolos experimentais desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão (CEEA), certificado de número 002/2009.

### 4.2 Planta

A coleta das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot foi realizada no Horto Medicinal do Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Marnhão (UFMA), no mês de fevereiro de 2006. Coletou-se uma amostra para o preparo de exsicata, que se encontra registrada e catalogada sob o número 1067, no herbário “Atico Seabra” do Departamento de Farmácia.

### 4.3 Drogas e reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram utilizados: tiopental sódico (Cristália), Birtartarato de NAadrenalina (NA), cloridarato de acetilcolina, L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginina-metil éster), indometacina (IND), cafeína (CAF), tetraetilamônio (TEA), BayK8644 S-(-)-1,4-diidro-2-6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinecarboxílico ester metílico, KT5823 (Todos Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA).

A solução de indometacina foi preparada pela diluição do fármaco em bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 5% em água destilada e etanol PA (95%). As demais substâncias utilizadas foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas em temperatura de 0°C e por ocasião da realização dos experimentos, foram diluídas em salina ou água destilada, para os ensaios *in vivo* ou *in vitro*, respectivamente.

### 4.4 Soluções nutritivas

Para a preparação das soluções nutritivas de baseou-se na metodologia desenvolvida por Tanaka et al. (1999). Os sais utilizados em todas as preparações das soluções nutritivas foram: cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$  158,3 mM), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$  4 mM), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  2 mM), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$  1,05 mM), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  5,6 mM) (Merck, darmstadt, Alemanha), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$  10 mM), fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,42 mM) (todos da Merck (Darnstadt Alemanha)), ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA 1mM), (Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA). No preparo das soluções despolarizantes de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM, 60 mM ou 80 mM, a concentração de  $\text{Na}^+$  foi isosmoticamente alterada. Nas soluções livres de  $\text{Ca}^{2+}$  foi omitida a adição de  $\text{CaCl}_2$  e adicionou-se 1 mM de EDTA. Porém no preparo de soluções nominalmente sem cálcio apenas omitiu-se o  $\text{CaCl}_2$ . Após o preparo das soluções mediu-se o pH, que era ajustado para 7,4, quando necessário.

# *Métodos de Análise Fitoquímica*

## **5 METODOS DE ANÁLISE FITOQUÍMICA**

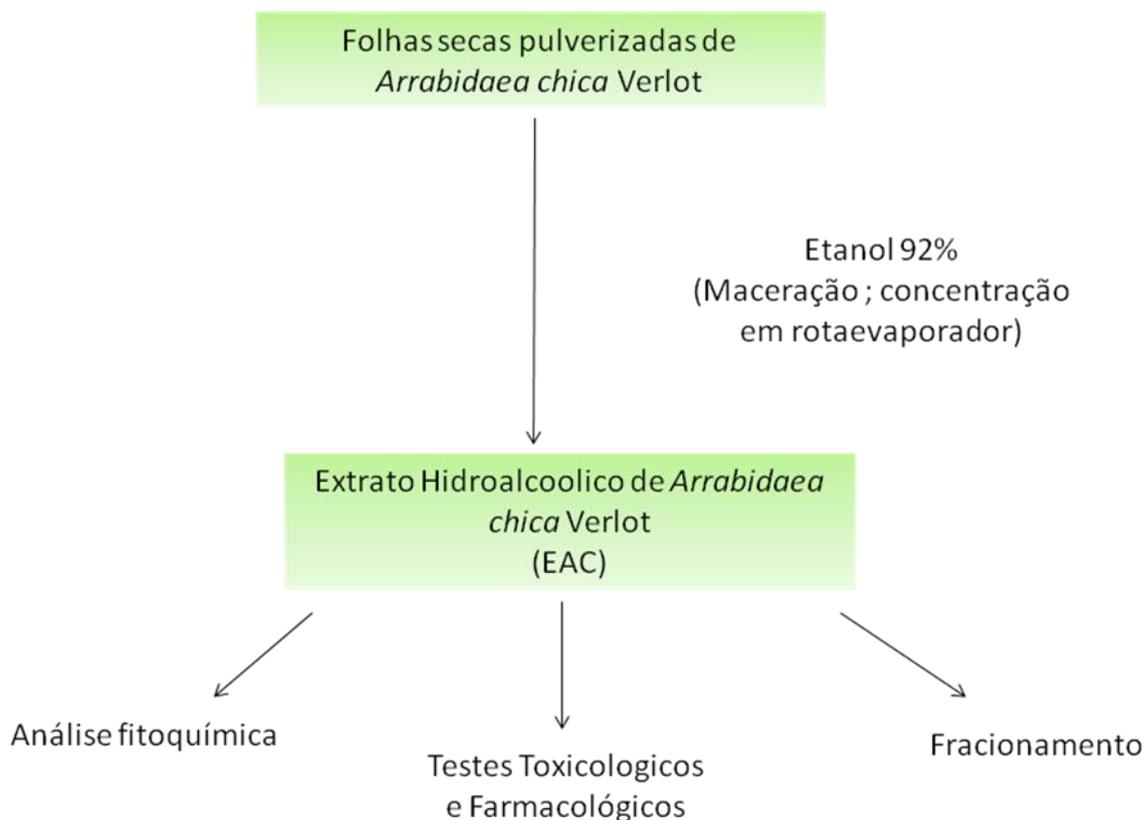
### **5.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot (EAC)**

O material vegetal coletado foi seco a 40° C em estufa com circulação de ar e em seguida pulverizado em moinho elétrico para obtenção do pó, que foi embebido em álcool etílico a 92% e posto em maceração, sob agitação manual diária. A extração alcoólica do macerado foi realizada mediante três trocas sucessivas a cada 72 horas, com a renovação do solvente. Ao final

deste processo, os extratos foram reunidos e filtrados com gaze. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador (MARCONI), à pressão reduzida e à temperatura de 44°C. Deste processo foi obtido o extrato hidroalcolico (EAC), que foi acondicionado em frasco âmbar e conservado sob refrigeração (5°C) (Esquema 1).

Para a determinação do peso seco foram utilizadas três alíquotas de 0,5 mL do EAC em béckeres secos previamente tarados. O solvente das alíquotas foi evaporado sob corrente de ar quente e os béckeres após resfriamento, pesados em balança analítica (SARTORIUS) para determinação do peso seco dos resíduos. Esta operação foi repetida sucessivas vezes até obtenção de pesos constantes. Para cálculo do rendimento (%) utilizou-se o peso total do pó, o peso seco obtido e o volume final total do extrato concentrado.

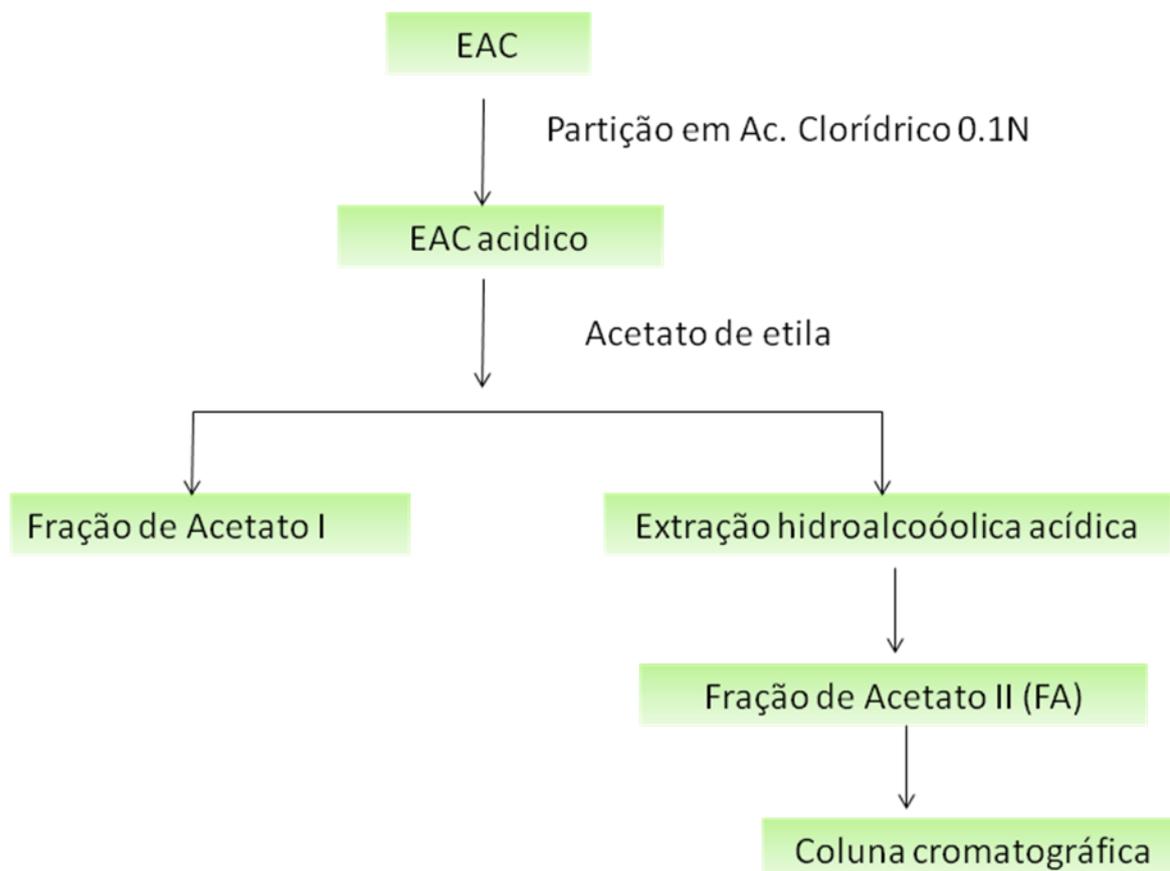
Quando necessárias pequenas alíquotas, determinadas previamente em função do peso seco do extrato e do peso dos animais, foram pipetadas em béckeres, e o solvente foi evaporado sob corrente de ar quente e em seguida o volume foi completado para concentração desejada com água destilada ou solução fisiológica, conforme a via de administração a ser utilizada (RIBEIRO, 2002).



**Esquema 1** - Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot

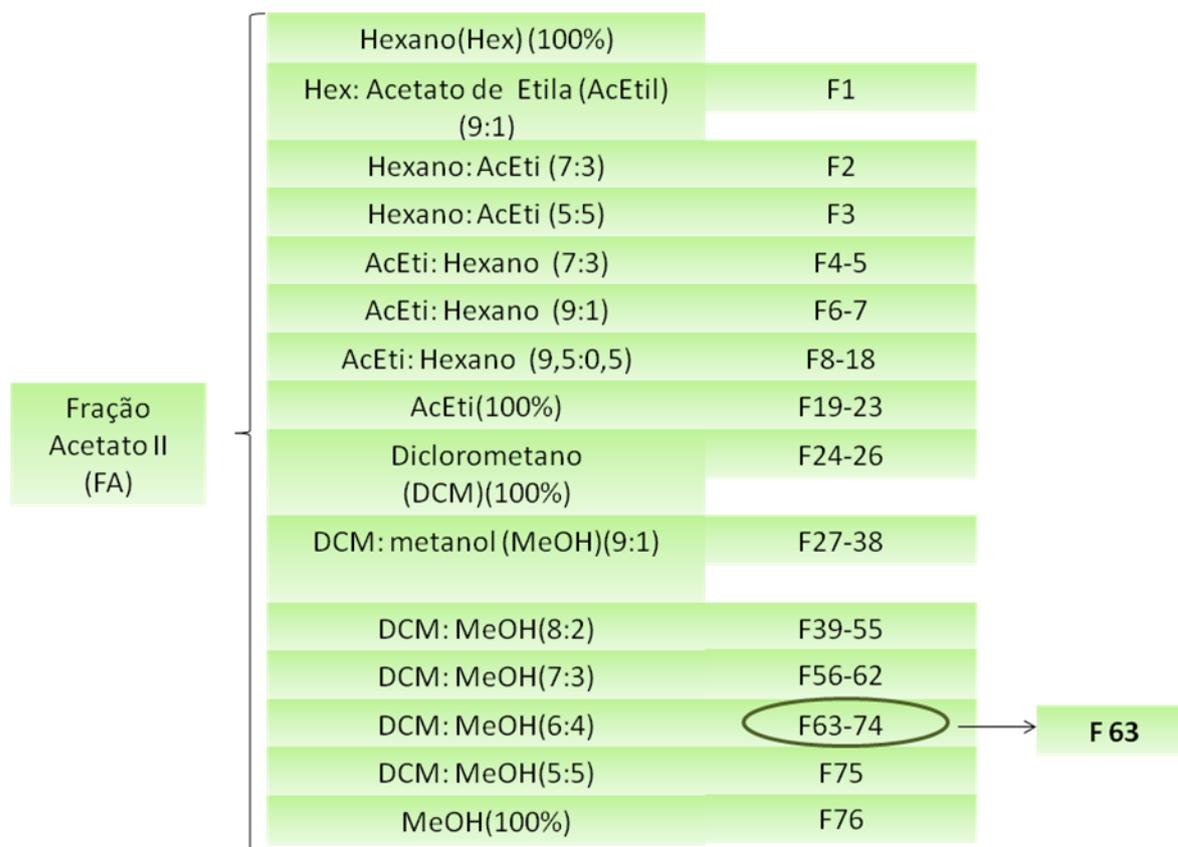
## 5.2 Fracionamento do EAC

Uma alíquota de 5g de EAC foi acidificada com ácido clorídrico 0,1 N, originando um extrato acidificado ao qual foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila, de onde obteve-se uma fração acetato de etila I e uma fração hidroalcoólica acídica, que foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio, 5%, obtendo-se o que denominamos de fração acetato II (FA) (Esquema 2).



**Esquema 2** – Esquema representativo de fracionamento do EAC de *Arrabidaea chica*

Após a obtenção da FA, esta foi exposta à corrente de ar quente para evaporação dos solventes e em seguida adicionou-se hexano para ser aplicado em uma coluna cromatográfica preparativa (CCP), utilizando-se eluentes com polaridades crescentes, partindo-se do hexano e finalizando-se com metanol. Desta coluna foram obtidas 75 frações que foram reunidas após análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC). Após análise das CCDC, as frações foram reunidas, conforme o perfil cromatográfico semelhantes, resultando em 14 frações reunidas. Dentre estas 14 frações, procedeu-se um *screening* químico, considerando o rendimento e o grau de pureza em CCDC e desta forma selecionou-se a F63 para realizações de ensaios químicos e farmacológicos.



**Esquema 3** - Esquema representativo de separação dos eluentes utilizados em coluna cromatográfica

### 5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

O EAC e a F63 foram analisados e comparados por CCDC, segundo descrito por STHAL (1969). Foi empregada uma suspensão de sílica gel G em água destilada, que foi espalhada em camada de 0,2 mm de espessura, em placas de vidro. As placas foram ativadas em estufas a 100°C durante duas horas e eluídas em cubas cromatográficas contendo os solventes clorofórmio e metanol P.A (1:1;6:4; 7:3;9:3). Os cromatogramas foram revelados com iodo metálico sublimado.

### 5.3 Análises químicas da fração F63 por 1HRMN e CLAE

A F63 foi ativa em experimentos *in vitro* e em consequência desta atividade realizou-se a análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta parte do estudo foi realizada no Instituto de Botânica de São Paulo sob a supervisão da Dra Luce Maria Brandão Torres.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN foi obtido em aparelho Bruker (DRX-500, Central Analítica da Universidade de São Paulo). A amostra foi dissolvida em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). As áreas relativas dos picos das absorvâncias, que representam o número de hidrogênio obtido por integração eletrônica e suas multiplicidades apareceram como sinal simples, sinal duplo e sinal múltiplo. Os valores de deslocamento químico foram medidos em unidades adimensionais ( $\delta$ ) ou ppm e a multiplicidade dos sinais foram referidas como sinal simples (s), sinal duplo (d), sinal triplo (t) e sinal múltiplo (m). As medidas das constantes de acoplamentos (J) foram medidas em Hz.

O cromatograma por CLAE foi obtido em sistema Varian (Pro Star modelo 310) da Seção de Fisiologia do Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo utilizando um sistema gradiente linear do eluente A, água ultra pura da Mili-Q (Millipore) com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA, Merck) e eluente B acetonitrila (ACN, grau HPLC, J.T Baker). O gradiente linear: no tempo inicial da eluição, 80% de A e 20% de B até 70% de B, em 45 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi uma Luna 5  $\mu$  C18, dimensões 250 x 4,60 mm (Phenomenex), com pré-coluna de C-18. As amostras foram filtradas em filtro (Millex, 0.45  $\mu\text{m}$ ), o volume injetado de amostra foi de 20  $\mu\text{L}$  e a detecção foi a 254 nm. Os resultados foram expressos em tempo de retenção e a concentração das amostras em porcentagem (%).

#### 5.4 Análise farmacognóstica qualitativa do EAC

- Teste para taninos e fenóis

Transferiu-se 4 mL do EAC, para dois tubos de ensaio e acrescentou-se 4 mL de álcool absoluto para a diluição. Após a diluição acrescentaram-se 3 gotas

de Cloreto Férrico em um dos tubos. Observou-se se houve ou não formação de precipitado ou mudança de coloração em comparação com o branco. A formação de precipitado e de coloração azul escuro indica a presença de taninos hidrolizáveis. Se a coloração for verde, esta indica a presença de taninos condensados.

- Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Inicialmente enumerou-se quatro tubos de ensaio (0, 1, 2 e 3), e em ambos foi acrescentado 3 mL de EAC mais 4mL de álcool absoluto. O tubo "0" é o branco. Em seguida, utilizando-se soluções de HCl 0,1N e de NaOH 0,1N, ajustou-se o pH das amostras 1, 2 e 3 para pH = 3, pH = 8,5 e pH = 11. Assim, observou-se a coloração resultante e comparou-se com o tubo contendo o extrato em pH original (branco). A presença de antocianinas e antocianidina são indicadas quando em pH=3; pH= 8,5 e pH=11 obtém-se as colorações vermelho, lilás e azul púrpura respectiva e simultaneamente. As presença de compostos do tipo flavononas, flavonóis e xantonas é indicada pela coloração amarela em pH= 11. Os compostos do tipo flavononóis são detectados pela presença da coloração vermelho laranja em pH=11. As cores, vermelho no pH= 3 e vermelho púrpura em pH=11 simultaneamente indicam a presença de compostos do tipo auronas.

- Teste para leucoantocianidinas, flavononas e catequinas

Inicialmente foram enumerados dois tubos de ensaio 5 e 6, e em seguida foi acrescentado aos mesmos 3 mL de EAC mais 4 mL de álcool absoluto. No tubo 5 foi acidulado até pH 1 e o tubo 6 foi basificado até pH 11. O tubo "0" do experimento anterior continua sendo o branco. O aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de constituintes especificados. As cores vermelha e amarelo-pardo em pH = 1 indica constituintes do tipo leucoantocianidias e catequina respectivamente às cores. A presença de flavanonas é possível perceber-se pelo surgimento da cor vermelho-alaranjado em pH=11.

- Teste para resina

Primeiramente, fez-se um teste rápido para a identificação de resinas, adicionando-se em um tubo de ensaio 3ml do extrato concentrado e 6ml de água destilada (3mL de cada vez), observando-se a ocorrência ou não de um precipitado floculoso após agitação. Caso ocorra a formação de tal precipitado, deve-se prosseguir com a determinação. Para tanto, pegou-se uma nova amostra de 3ml do

extrato e ajustou-se o pH para 4, utilizando-se soluções de HCl 0,1N e de NaOH 0,1N. A seguir, faz-se uma filtração e descarta-se o filtrado. Ao resíduo formado, adiciona-se 5ml de álcool etílico P.A. obtendo-se outro filtrado. Retira-se uma alíquota de 3ml do novo sobrenadante e acrescenta-se mais 6ml de água destilada (3ml de cada vez). Finalmente, leva-se a mistura ao aquecimento por alguns minutos, observando-se ou não a formação de um precipitado floculoso. Caso haja novamente a formação do precipitado, o teste é positivo para resinas.

- Teste para Alcalóides

Inicialmente, secou-se, em banho-maria, 20mL do EAC concentrado. Em seguida, adicionou-se 20 mL de ácido sulfúrico a 1% e levou-se ao banho-maria para ferver durante 2 minutos. Após a fervura, resfriou-se a mistura e filtrou-se com funil e papel de filtro. Dessa forma, distribuiu-se igualmente o volume obtido em três tubos de ensaio, colocando-se em cada amostra 4 gotas dos reagentes de Hager, Mayer e Dragendorff. Caso haja a formação de precipitado em pelo menos dois dos três tubos, o teste é positivo para alcalóides.

- Teste para ácidos Fixos Forte

Secou-se 20 mL do EAC concentrado em banho-maria, e depois do resfriamento acrescentou-se 1 mL de Etanol P.A. Misturou-se a amostra e sem seguida acrescentou-se 2 mL Hidróxido de Amônio Concentrado. Em seguida levou-se a mistura para aquecimento por dois minutos. Após isso, a mistura foi filtrada (papel de filtro), e o filtrado foi levado ao banho-maria até a formação de resíduo seco. Este último foi levado à estufa por dez minutos. Após esse tempo, o resíduo seco foi redissolvido em 2 mL de água destilada e a mistura foi filtrada, sendo que essa solução foi dividida em duas partes e transferida respectivamente para tubos de penicilinas, um dos quais por sinal já estava colocado 1mL de hidróxido de sódio 1N. Após isso se umedeceu duas pequenas tiras de papel de filtro no reagente de Nessler e as colocou dentro, mas não tocando, as soluções presentes nos vidros de penicilina. Caso o pedaço de papel de filtro presente na solução que apresentava a quantidade de 1 mL de NaOH (1N), apresente-se a coloração marron, seria um indicativo para a presença de ácidos fixos fortes.

- Teste para Esteróides e Triterpenos

Inicialmente, secou-se totalmente 20 ml do EAC concentrado em banho-maria. Em seguida, adicionou-se 3 ml clorofórmio por duas vezes, triturando-se completamente o extrato seco. Após a trituração, filtrou-se a mistura em algodão, usando um pouco de sulfato de sódio anidro. Ao filtrado adicionou-se 1 ml de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, agitando-se suavemente e observando-se a modificação da cor.

- Teste para saponinas

Dissolveram-se os resíduos clorofórmicos do extrato seco em 5 a 10 ml de água destilada. Filtrou-se e agitou-se fortemente por 3 minutos. Assim, observou-se ou não a ocorrência de espuma abundante e persistente. Caso positivo faz-se a confirmação adicionando-se ao filtrado 2 ml de ácido clorídrico concentrado, deixando-se em banho-maria por 1 hora. Após o resfriamento, neutralizou-se a mistura com carbonato de sódio. Finalmente, agitou-se e observou-se a presença ou não um precipitado. Caso haja uma sedimentação, o teste é positivo para saponinas.

- Teste para Cumarinas

Utilizando-se um papel de filtro não fluorescente, com o auxílio de um capilar pingou-se uma gota do EAC de modo a formar duas manchas circulares de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. Feito isso, adicionou-se a uma das manchas uma gota de KOH alcoólico 0,1 N. Em seguida, cobriram-se parcialmente as duas manchas com papel cartão opaco e levou-se à câmara de ultravioleta (UV) por 2 a 3 minutos. Passado o tempo, retirou-se o cartão e ainda sobre a luz UV observou-se a ocorrência ou não de fluorescência da mancha alcalinizada. Assim, o resultado é positivo para cumarinas quando a metade da mancha alcalinizada não coberta apresenta fluorescência forte.

# *Métodos de Análise Toxicológica*

## 6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO TOXICOLOGICA- *IN VIVO*

### 6.1 Determinação da toxicidade aguda ( $DL_{50}$ = Dose Letal 50%)

Ratos e camundongos adultos de aproximadamente 60 dias de idade, de ambos os sexos, foram mantidos em área setorial e isolada para animais no Laboratório de Farmacologia da UFMA passando por um período de adaptação às condições ambientais durante sete dias, com fornecimento de água e alimento *ad libitum*. Os ratos foram divididos em seis grupos experimentais com doze animais em cada (6♂ e 6♀), com administração das seguintes doses de acordo com o tratamento estabelecido: solução de NaCl 0,9% (grupo controle), em volumes (0,1mL/ 100g) equivalentes aqueles dos grupos tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot (EAC), 0,5g/kg; 1g/kg; 2g/kg; 3,5/kg e 5g/kg, pelas vias oral (v.o). Os camundongos foram divididos em grupos experimentais com cinco animais cada (5♂ e 5♀), nos quais foram administrados, pela via intraperitoneal (i.p), solução de NaCl 0,9% (grupo controle) ou EAC de *Arrabidaea chica* Verlot (0,5 g/kg, 1 g/kg e 2 g/kg). Nos experimentos em que o extrato foi administrado por v.o., os animais foram deixados em jejum prévio de oito horas, sendo fornecido novamente o alimento, uma hora após o tratamento.

Após administração do EAC, foi avaliado o índice de sobrevivência dos animais nos diferentes grupos durante 14 dias consecutivos. Neste período outros parâmetros fisiológicos foram avaliados. A análise consistiu na observação e registro diário do peso corporal dos animais, peso médio de ração consumida, volume médio de água consumida, características das fezes, coloração e características do pêlo do animal e resposta motora ao toque da cauda, para verificação de possíveis efeitos residuais das substâncias (MALONE, 1997).

A dose letal para 50% da população foi determinada a partir da porcentagem de animais que sobreviveram após uma única administração do EAC, avaliada ao longo dos 14 dias de observação.

No 14<sup>o</sup> dia foram coletadas amostras de sangue dos ratos para posterior dosagem bioquímica e análise hematológica. Em seguida, ratos e camundongos foram eutanasiados para realizar-se a análise macroscópica do:

fígado, baço, pâncreas, rins e estômago (ARAÚJO et al., 1996; LARINI, 1997; CERUTTI et al., 2000).

## 6.2 Análises Bioquímica e Hematológica

Inicialmente os animais foram anestesiados com tiopental sódico e após laparotomia, a artéria abdominal foi visualizada e puncionada com *scalp* nº 21 para a coleta do sangue.

Para a separação do soro, o sangue coletado foi imediatamente incubado em banho maria 37 °C por 30 minutos e, a seguir, centrifugado a 3000 rpm (rotação por minuto) durante 10 minutos. O plasma foi separado na presença de EDTA a 10% e sobre centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. A partir do soro foram determinadas as concentrações de triglicérides (TG), creatinina (CK), colesterol total (CT), colesterol de alto peso molecular (HDL), aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), glicose (GI), e uréia (UR), utilizando *Kits* comerciais.

A determinação de parâmetros hematológicos como, contagem de hemácias (RBC), dosagem de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), contagem global de leucócitos (WBC), e plaquetas (PLT), foram determinados, de forma automatizada, em sangue anticoagulado com EDTA (SILVA, 2003). A contagem diferencial de leucócitos foi feita, em microscópio óptico, com esfregaços sangüíneos corados.

*Métodos de Avaliação  
Farmacológica – In vivo*

## 7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA - *IN VIVO* e *EX-VIVO*

### 7.1 Tratamentos crônicos com administração do EAC por via oral

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (60 dias de idade) foram divididos em grupos controle tratado com salina (1mL/100g) e grupo EAC, subdividido em doses: 0,1 g/Kg; 0,25 g/Kg e 0,5 g/Kg, os quais foram tratados durante o período de 60 dias diariamente por via oral (v.o.). Durante esse intervalo de tempo, foram utilizados procedimentos de manutenção e observação dos animais quanto ao peso corpóreo, ração consumida e registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), através do método indireto. Ao final de 60 dias de tratamento os animais foram anestesiados, e procedeu-se a coleta do sangue para realização das dosagens bioquímica e em seguida foram eutanasiados, e os órgãos como pulmão, coração, fígado e rins foram retirados para análise morfológica macroscópica. A artéria mesentérica superior foi removida para avaliação da reatividade.

Os parâmetros comportamentais foram avaliados diariamente, segundo critérios de Malone (1997), para avaliação de um possível efeito residual do extrato. A observação destes sinais ocorreu aos 30, 60, 120 e 240 minutos no primeiro dia e a cada dois dias, durante o período de tratamento.

#### 7.1.1 Evolução da massa corporal e consumo de ração

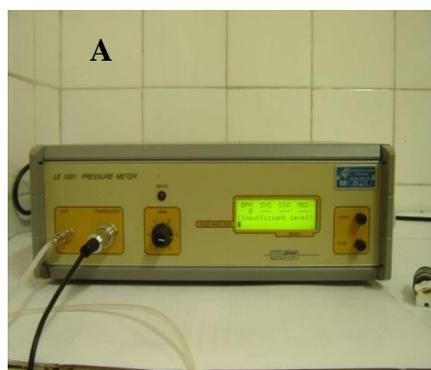
Esses parâmetros foram avaliados durante o tratamento crônico do EAC por v.o (item 7.1). Os animais foram pesados três vezes por semana, a partir do primeiro dia, para administração das doses do extrato, e o acompanhamento do desenvolvimento ponderal foi avaliado a partir do segundo dia de tratamento. A ração consumida pelos animais foi avaliada por gaiola, subtraindo-se o peso restante de alimento de um peso fixo colocado em cada gaiola diariamente. Para construção das curvas de evolução ponderal e de consumo de alimentos foram utilizadas as médias semanais obtidas a partir das médias diárias dos valores de cada parâmetro para cada grupo (n= 12).

### 7.1.2 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos SHR não anestesiados

Para a determinação destes parâmetros, utilizamos o método indireto, onde os animais submetidos ao tratamento crônico, foram previamente aquecidos durante 5 minutos a 42°C, e, a seguir, colocados em um contensor, que deixa a cauda livre para adaptação do manguito de pressão e de um cristal piezoelétrico, tipo Korotkoff, para registro das pulsações arteriais, através do sistema LE 5001 Pressure Meter - LSI LETICA (Figuras 3A e 3B). Os animais não foram manipulados durante 4 minutos, evitando-se assim as reações pressóricas ao aquecimento e contenção (FREGLY, 1963; LAPA et al., 2001).

Após o período de adaptação ao sistema para aferição da pressão arterial correspondente a 7 dias, os animais foram tratados por via oral, conforme descrito no item 7.1.

Neste registro foram captados os valores da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), diariamente, sendo que a administração diária do EAC sempre foi realizada após as aferições. Os gráficos foram obtidos a partir das médias semanais dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca para cada grupo.



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 3** - Sistema de aferição pressão arterial média (PAM). **A:** Detalhe frontal do sistema de aferição de pressão arterial

(LSI LETICA). **B:** Visão geral do aparelho e contenção do animal para registro

### 7.1.3 Análise macroscópica dos órgãos

Ao final do tratamento os animais foram autopsiados e os órgãos como rins, pulmão, coração, fígado, baço e pâncreas foram analisados macroscopicamente, para a detecção de possíveis sinais de toxicidade causadas pelo EAC.

### 7.1.4 Análise bioquímica do sangue

Após os 60 dias do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas para posterior coleta de amostras de sangue pela punção da artéria abdominal, utilizando-se *scalp* n° 21. O sangue de cada animal foi colocado em tubos de vidro, e centrifugado para obtenção do soro. Em seguida este foi separado e acondicionado em frascos do tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> para as determinações bioquímicas. Os parâmetros bioquímicos foram determinados no analisador semi-automático Bioplus 2000<sup>®</sup>.

Os parâmetros foram avaliados por dois métodos diferentes, utilizando *kits* comerciais. Por métodos enzimáticos foram determinados: glicose, uréia, creatinina, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, albumina e proteínas totais. Por métodos cinéticos foram determinados alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP).

### 7.1.5 Avaliação da reatividade vascular dos animais Normotensos e espontaneamente hipertensos tratados cronicamente

Para os experimentos com artéria mesentérica superior isolada, anéis (0,5 cm de comprimento) sem endotélio foram cuidadosamente colocados entre fios de aço inoxidável (50 µm de diâmetro), suspensos em uma câmara de órgão isolado (5,0 ml), contendo solução de Tyrode (pH 7,4, 37°C) e equilibrados com CO<sub>2</sub> 5% e O<sub>2</sub> 95%. As variações de tensão das preparações foram medidas com um transdutor de força isométrico e registradas em um sistema de aquisição *PowerLab 30.5*. Os

anéis foram inicialmente equilibrados por 1 hora sob uma tensão de repouso ótima de 1,0 g e lavados a cada 10 minutos. Após a estabilização, foram realizadas curvas concentração-resposta para noradrenalina (1 nM a 1  $\mu$ M) (BORGES et al., 1999).

*Métodos de Avaliação  
Farmacológica – In vitro*

## 8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – *IN VITRO*

### 8.1 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato espontaneamente hipertensos (SHR) com ou sem endotélio vascular

Os ratos foram anestesiados e em seguida eutanasiados. Após uma incisão no abdomen do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada e, livre de tecido conectivo e adiposo (Figura 4), foi seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm). Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> (carbogênio) (Figura 5). Esses anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (*PowerLab*, ADInstruments PTY Ltd, Sydney A) para o registro das tensões isométricas (Figura 6). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970; LIMA-LANDMAN et al., 2007).

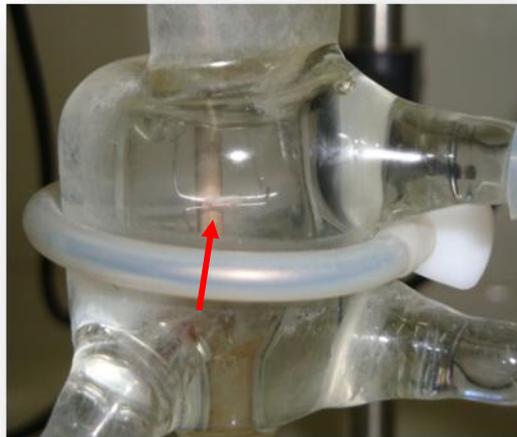
Após obtenção de uma curva concentração-resposta com a noradrenalina (NA) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, antes da verificação da presença do endotélio vascular, observou-se que a concentração de (10µM) de NA induzia uma contração de magnitude semelhantes em 95% das preparações. Com base nestas observações utilizou-se para todos os procedimentos de verificação do endotélio vascular a concentração de (10µM) de NA. Os anéis sem endotélio vascular foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. A presença do endotélio vascular foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de (10 µM) de acetilcolina (ACh). A partir desta observação todos os protocolos realizados em anéis mesentéricos de ratos SHR foram seguidos deste procedimento para verificação do endotélio vascular.

Foram considerados com endotélio, os anéis de artéria com relaxamento superior a 70% da contração induzida por NA (10 µM) para ratos SHR. Os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PRIVIERO et al., 2007).



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 4** - Artéria mesentérica superior isolada de rato



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 5** - Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução nutritiva de Tyrode



Fonte: Arquivo pessoal.

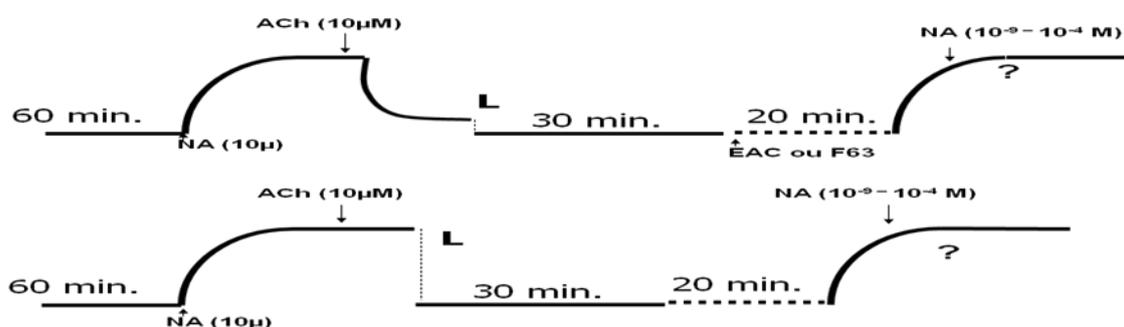
**Figura 6** - Vista geral do sistema de aquisição de dados *in vitro*

## 8.2 Protocolos experimentais

### 8.2.1 Análise de EAC e F63 sobre adrenoceptores de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos SHR

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no item 8.1, as preparações de anéis de artéria mesentérica foram estabilizadas durante 60 minutos, em líquido nutritivo de Tyrode normal e em seguida foram adicionadas concentrações crescentes de NA ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) para obtenção de curvas concentração – efeito na ausência e na presença de EAC nas doses de 100, 200 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e F63 (10; 20; 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Esquema 4). Este mesmo protocolo experimental foi realizado em anéis de artéria mesentérica desprovida de endotélio quando se testou o EAC nas concentrações anteriormente citadas.

Os valores da  $CE_{50}$  foram obtidos por regressão linear ou não linear, a partir das curvas dose efeito obtidas na presença e na ausência do EAC ou F63. Os valores de  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) foram obtidos dos valores de  $CE_{50}$  de cada experimento

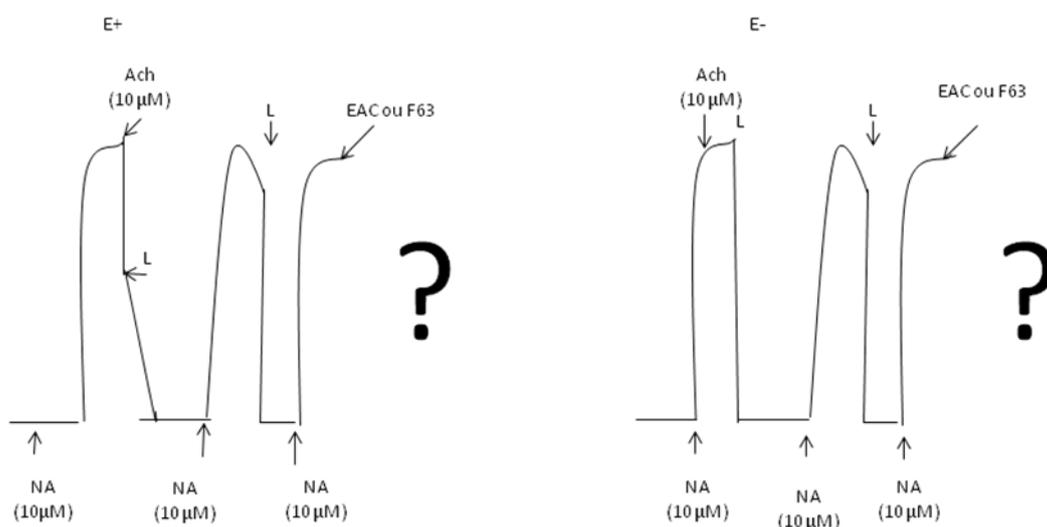


**Esquema 4** - Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito de EAC e F63 em anéis providos de endotélio (E+) e anéis desprovidos de endotélio (E-) isolados de artéria mesentérica superior de ratos, em concentrações cumulativas de NA ( $10^{-9}$  a  $10^{-2}$ ). L= lavagem da preparação com Tyrode

### 8.2.2 Avaliação da influência do endotélio funcional no efeito vasorelaxante de EAC e F63 em artéria superior de ratos hipertensos SHR

Para avaliar a participação do endotélio no efeito de EAC e F63 concentrações crescentes de EAC (1; 5; 10; 50; 100, 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e F63 (1;5;10; 20;30 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram adicionadas cumulativamente nas cubas contendo os anéis de artérias, uns providos e outros desprovidos de endotélio funcional, pré-

contraídos com NA (10 $\mu$ M), para obtenção de curvas concentração-resposta. As respostas foram analisadas, sendo os valores de CI<sub>50</sub> das curvas individuais calculados e comparados estatisticamente (Esquema 5).



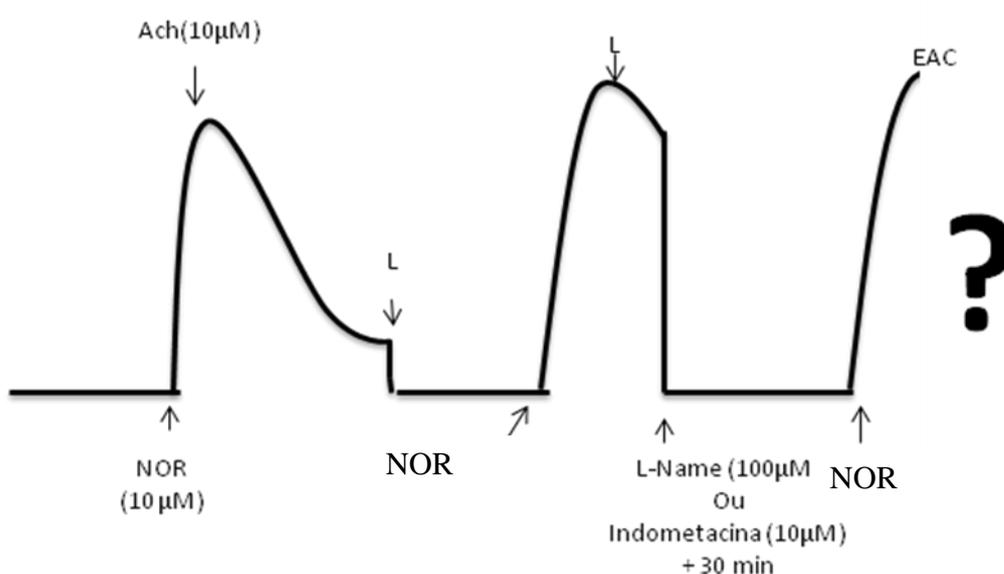
**Esquema 5** - Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EAC e F63 em anéis providos de endotélio (E+) e anéis desprovidos de endotélio (E-) isolados de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídos com NA (10 $\mu$ M). L= lavagem da preparação com líquido nutritivo

### 8.2.3 Verificação da participação do NO na resposta relaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR

Para avaliar a participação do óxido nítrico no efeito do EAC, foi adicionado L-NAME (100 $\mu$ M), um inibidor competitivo da sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993) às cubas contendo anéis de mesentérica com endotélio intacto, ficando incubado por 30 minutos. Na seqüência obteve-se uma contração induzida pela NA (10 $\mu$ M), na fase tônica da qual foi feita a adição cumulativa de EAC (100; 200 e 300 $\mu$ g/mL) (Esquema 6). As respostas induzida pelo EAC antes e após a incubação com L-NAME foram estimadas. Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados e comparados estatisticamente.

#### 8.2.4 Avaliação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR

Para avaliar a influência de alguns metabólitos do ácido araquidônico no efeito do EAC e frações, indometacina (10 $\mu$ M), um inibidor não seletivo COX (CARK; FUCHS, 1997), foi incubada por 30 min. Na seqüência obteve-se uma contração induzida pela NA (10 $\mu$ M), na fase tônica da qual foi feita a adição cumulativa de EAC (1;5;10; 50; 100 e 300  $\mu$ g/mL) (Esquema 6). As respostas induzidas pelo EAC antes e após a incubação com indometacina foram estimadas. Os valores individuais de Cl<sub>50</sub> foram calculados e comparados estatisticamente.

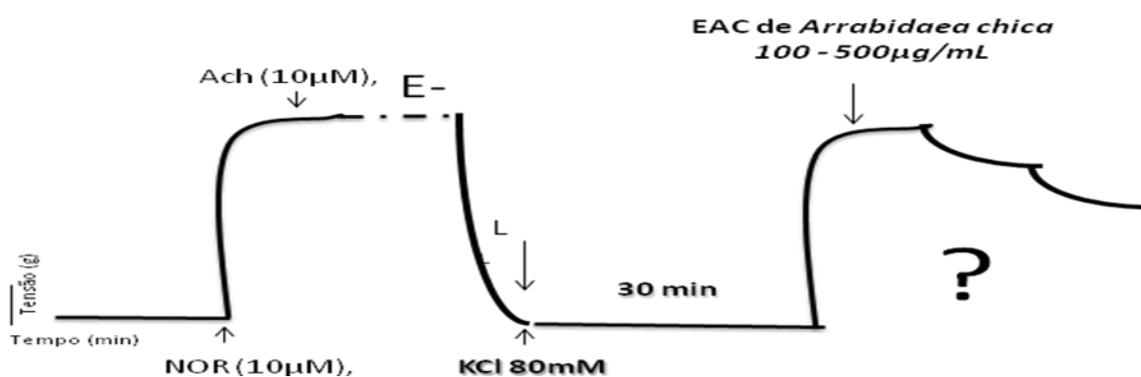


**Esquema 6** - Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação da administração de 100 $\mu$ M de L-NAME ou 10  $\mu$ M de indometacina sobre a resposta vasorelaxante produzida pelo EAC (100, 200 e 300  $\mu$ g/mL) em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto, pré-contráidos com NA (10 $\mu$ M); L= lavagem da preparação.

#### 8.2.5 Efeito do EAC sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (SHR)

Trinta minutos após a verificação da presença ou da ausência do endotélio vascular, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 80 mM), que promove uma

despolarização da membrana plasmática causando a ativação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ), promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  gerando uma contração (REMBOLD, 1996). Este processo foi então repetido com o objetivo de se obter duas contrações com magnitude similar para o KCl 80 mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração com um tempo médio de 30 minutos para a estabilização foi adicionado à cuba concentrações crescentes EAC de *Arrabidaea chica* (100-500  $\mu$ M/mL) de maneira cumulativa. A potência vasorelaxante EAC foi avaliada através de comparação dos valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  obtidos para KCl 80 mM e NAadrenalina (Esquema 7).

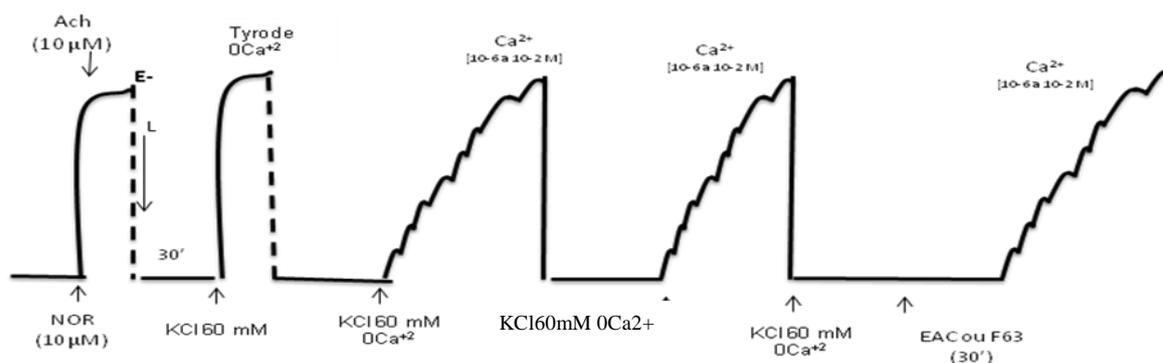


**Esquema 7** - Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito de concentrações crescentes de EAC (10 a 500  $\mu$ g/mL) em anéis desprovidos de endotélio isolados de artéria mesentérica de ratos SHR pré-contraídas com KCl 80mM. L= lavagem

#### 8.2.6 Avaliação do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR

Após procedimentos realizados para verificação da ausência do endotélio vascular a solução de Tyrode da cuba foi substituída por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 60 mM), para obtenção de duas contrações com magnitude similar. As preparações foram lavadas por uma solução de Tyrode nominalmente sem cálcio e permaneceram nesta solução por 15 minutos. Após este período, as preparações foram lavadas novamente com uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio por mais 15 minutos em seguida induzia-se uma curva cumulativa para  $CaCl_2$  ( $10^{-6}$  –  $10^{-1}$  M). Este procedimento foi repetido para construção de uma segunda curva para o  $CaCl_2$ . Após esse processo eram adicionadas às cubas concentrações isoladas de EAC (50; 100, 250 e 500  $\mu$ g/mL)

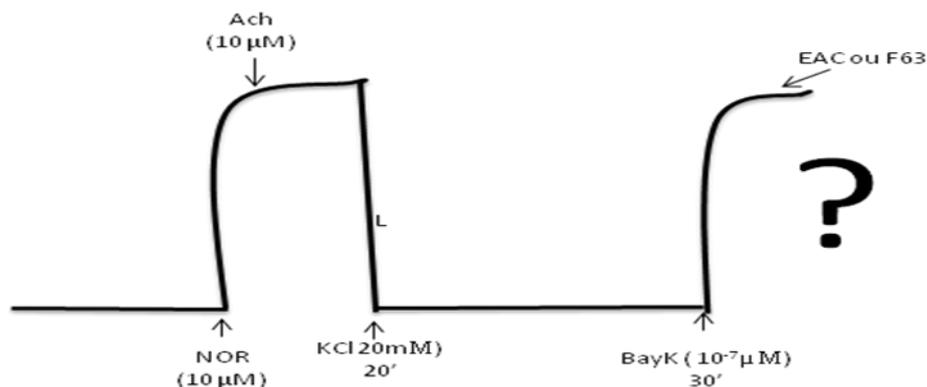
ou F63 (10, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) por um período de incubação de 15 minutos, decorrido este tempo induzia-se novamente uma curva cumulativa de  $\text{CaCl}_2$ . (Esquema 8). Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença EAC ou F63 com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle de  $\text{CaCl}_2$ .



**Esquema 8** - Esquema representativo do protocolo experimental da avaliação do efeito EAC ou F63 em concentrações crescentes  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-5}$  a  $10^{-1}\text{M}$ ) em anéis desprovidos de endotélio isolados de artéria mesentérica de ratos SHR. L= lavagem

### 8.2.7 Efeito do EAC ou F63 sobre contrações induzidas por S(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR

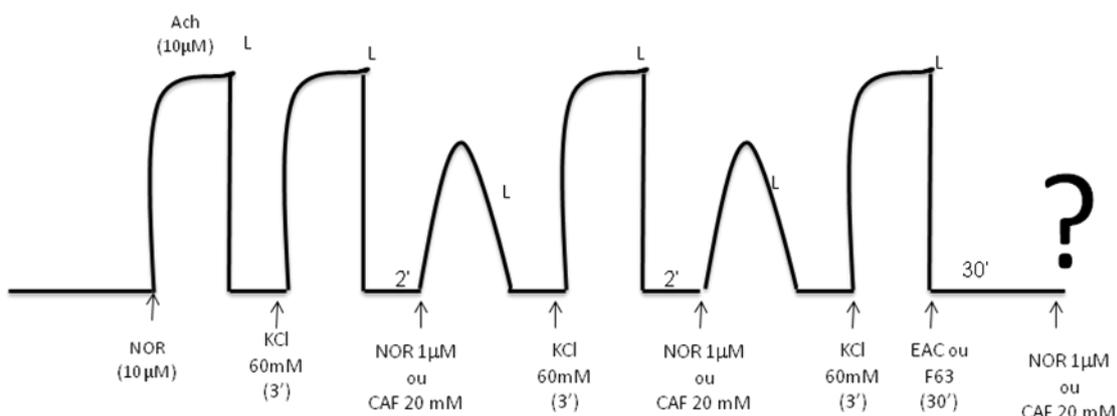
Após a verificação da ausência do endotélio vascular. As preparações foram pré-incubadas com uma solução despolarizante de KCl (20 mM) por 20 minutos, este procedimento foi realizado para obter uma melhor resposta ao agente contrátil utilizado (BARRÚS; REVIRIEGO; MARÍN, 1996). Em seguida colocou-se às cubas o Bay K8644 ( $10^{-7}$   $\mu\text{M}$ ) um ionóforo de  $\text{Ca}_v$  (BARRÚS; REVIRIEGO; MARÍN, 1996), para obtenção de uma contração sustentada. Na fase tônica desta contração adicionou-se o EAC (10; 25; 50; 100, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) ou F63 (10; 25; 50; 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ). O efeito vasorelaxante de EAC ou F63 foi avaliada através de comparação dos valores de  $\text{pD}_2$  e  $E_{\text{max}}$  em relação ao controle (Esquema 9).



**Esquema 9** - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de EAC ou F63 sobre contração induzida por BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

#### 8.2.8 Efeito do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por NAadrenalina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR

Para verificar o efeito do EAC ou F63 sobre as contrações dependentes da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, foram realizados experimentos com EAC (100; 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou F63 (10; 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) conforme descrito por Sakata e Karaki (1991). Os anéis de mesentérica desprovidos de endotélio foram expostos à solução isosmótica de KCl 60 mM durante 3 minutos, sendo, lavadas com solução de Krebs livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , na qual permaneciam por 2 minutos. Então, foram adicionados 1  $\mu\text{M}$  de NA ou 20 mM de CAF às cubas. Uma lavagem com solução de Krebs foi feita para promover a reestocagem de  $\text{Ca}^{2+}$ . Todos estes procedimentos foram repetidos para que as duas contrações transientes semelhantes fossem obtidas (controle). Em uma 2<sup>a</sup> repetição dos procedimentos para obtenção da 3<sup>a</sup>, contração pela adição do agonista, concentrações de EAC foram incubadas na solução de Krebs livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , e somente 30 min após foi adicionada NA (1  $\mu\text{M}$ ) ou CAF (20 mM). Nos experimentos com NA a temperatura dos banhos era de 37°C e nos individuais com CAF, 21°C. O efeito do EAC ou F63 foi calculado pela comparação da amplitude das contrações induzidas pela NA e CAF na ausência e na presença do EAC ou F63 (Esquema 10).



**Esquema 10** - Esquema representativo do protocolo experimental para avaliar o efeito de EAC (100; 250 e 500 μg/mL) ou F63 (10; 25 e 50 μg/mL) frente as concentrações transitórias induzidas por NA (1 μM) ou cafeína (20mM), em meio livre de  $Ca^{2+}$ , sobre anéis de mesentérica superior de rato. L= lavagem

### 8.3 Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Foi realizado teste *t* de Student não-pareado, para análise de diferença entre todas as médias e análise de variância (ANOVA - one-way) seguida do teste de Newman Keuls.

As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para *p* foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre as curvas foram obtidas através de regressão não-linear com variação da inclinação da curva (*slope* variado). Os valores de  $pD_2$  que corresponde ao logaritmo negativo do valor de  $CE_{50}$  (concentração molar de uma substância capaz de induzir 50% de uma resposta máxima) foram obtidos através de regressão não-linear. O valor de  $E_{máx}$  corresponde à média percentual de relaxamento do EAC ou F63 para cada condição estudada.

Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism<sup>®</sup> 5.

*Resultados das  
Análises Fitoquímicas*

## 9 RESULTADOS DAS ANÁLISES FITOQUÍMICA

### 9.1 Rendimento e propriedades físicas do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* (EAC)

O extrato hidroalcoólico (EAC), preparado a partir das folhas secas, apresentou coloração vermelha, e aroma adocicado, facilmente solúvel em água e aspecto límpido. Obteve-se um volume de 651 mL, peso seco de 283 mg/Kg e rendimento de 47,9%.

### 9.2 Resultados da análise farmacognóstica qualitativa de EAC

Os resultados das análises farmacognósticas estão apresentados na tabela 2, de acordo com os critérios de Matos (1997) (Tabela 1)

**Tabela 1** – Critérios para avaliação dos resultados

<b>Critérios</b>	<b>Grau de Intensidade</b>
0	<i>Não detectado</i>
-	<i>Traços</i>
+	<i>Fraco</i>
++	<i>Moderado</i>
+++	<i>Forte</i>

**Tabela 2** – Resultados da análise farmacognóstica de EAC

<b>METABÓLITOS</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>Taninos Pirogálicos (T. Hidrolizáveis)</b>	0
<b>Taninos Flobabênicos (T. Condensados ou Catéquicos)</b>	++
<b>Antocianinas e Antocianidinas</b>	0
<b>Flavonas, Flavonóis e Xantonas</b>	0
<b>Chalconas e Auronas</b>	0
<b>Flavanonóis</b>	+++
<b>Flavanonas</b>	+++
<b>Alcalóides</b>	0
<b>Ácidos Fixos Fortes</b>	0
<b>Saponinas</b>	-
<b>Resinas</b>	0
<b>Triterpenóis</b>	0
<b>Esteróides</b>	+++

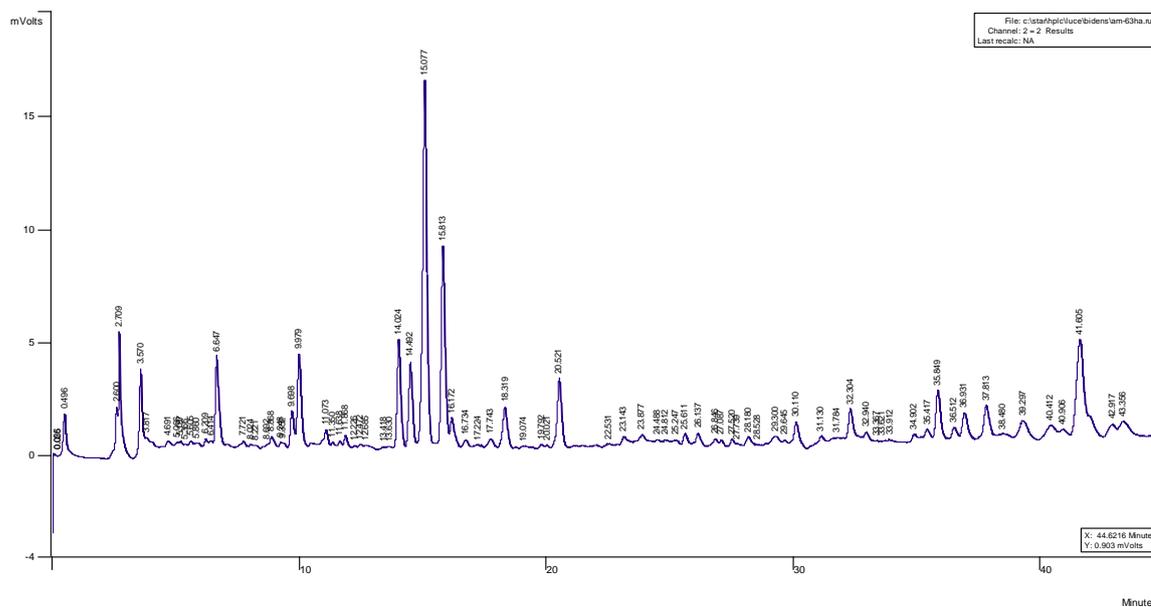
### 9.3 Rendimento e propriedade física da F63

A fração F63, apresentou coloração esbranquiçada após evaporação, e rendimento de 12% em relação a FA.

### 9.4 Resultado das análises em CLAE, e 1HRMN da F63

Os dados de CLAE da F63 (Gráfico 1) mostram, conforme o perfil cromatográfico observado, no método de detecção no comprimento de onda de 254nm, que esta fração é uma mistura. Os picos de tempos de retenção  $T_r = 15.077\text{min}$   $T_r = 15.01\text{min}$  e  $T_r = 41.6\text{min}$  e rendimento de 14,58% 7,39 % e 7,92%, respectivamente, podem ser os componentes majoritários da fração, uma vez que aos outros picos observados no cromatograma estão abaixo de 3,7% em F63. A análise por  $^1\text{HRMN}$  (Gráfico 1) mostra sinais característicos para

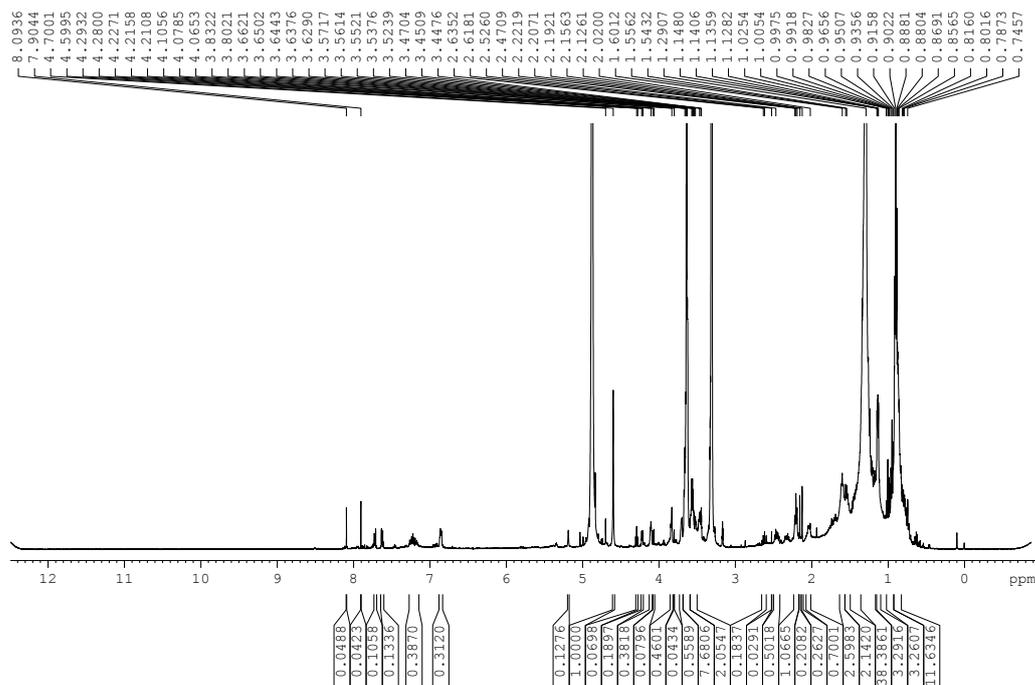
compostos alifáticos e aromáticos que podem ser flavonóides, açúcar, esteróides ou triterpenos e saponinas (observados pela  $^1\text{HRMN}$ ), entretanto estes resultados precisam ser confirmados com a obtenção dos compostos puros e com novas análises.



**Gráfico 1** - Cromatograma mostrando o perfil de F63 nas seguintes condições analíticas: HPLC Varian Pro Star, UV/VIS, gradiente linear com o eluente A,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{TFA}, 0,1\%}$ , eluente B ACN, no  $T_0 = 80\%$  de A e  $20\%$  de B até  $70\%$  de B, em 45 minutos, com fluxo de  $1\text{mL}/\text{min}$  em coluna  $5\ \mu\text{C}18$ , dimensões  $250 \times 4.60\text{mm}$  (Phenomenex), amostras filtradas de  $20\ \mu\text{L}$  e detecção no comprimento de onda de  $254\text{nm}$ . Os valores mostrados estão expressos em  $T_r = \text{min}$ , a intensidade dos sinais em mV e a concentração das substâncias em % foram as medidas da integral da área do pico

Os dados do espectro de  $^1\text{HRMN}$  da fração F63 mostra que a mistura contém compostos alifáticos e aromáticos. A identificação de compostos alifáticos presentes em F63 está baseada na presença, no espectro do sinal intenso com deslocamento químico  $\delta = 1,29$  característico de hidrogênio de grupos  $(-\text{CH}_2)_n$  e do sinal triplo centrado em  $\delta = 0,89$  do grupo metila  $(-\text{CH}_3)$  terminal, observados em compostos com longa cadeia carbônica de alcanos, ácidos graxos e de contaminantes de solventes orgânicos usados nos processos de fracionamento e purificação. Os sinais observados na região de  $\delta = 6,7$  a  $8,1$  são característicos de hidrogênios aromáticos de compostos fenólicos em geral, como os flavonóides, como os de flavonóis e flavonas. Os sinais na região de  $\delta = 3,4$  a  $4,3$  podem ser

atribuídos aos hidrogênios ligados a heteroátomo, especialmente os hidrogênios oximetínicos, como os de açúcares. Os sinais intensos em  $\delta$  4,78 e 3,30 são do solvente (Gráfico 2). Estes dados associados aos dados de triagem fitoquímica são indicativos da presença de flavonóides glicosilados em F63, mas que precisam de análises complementares para a identificação.

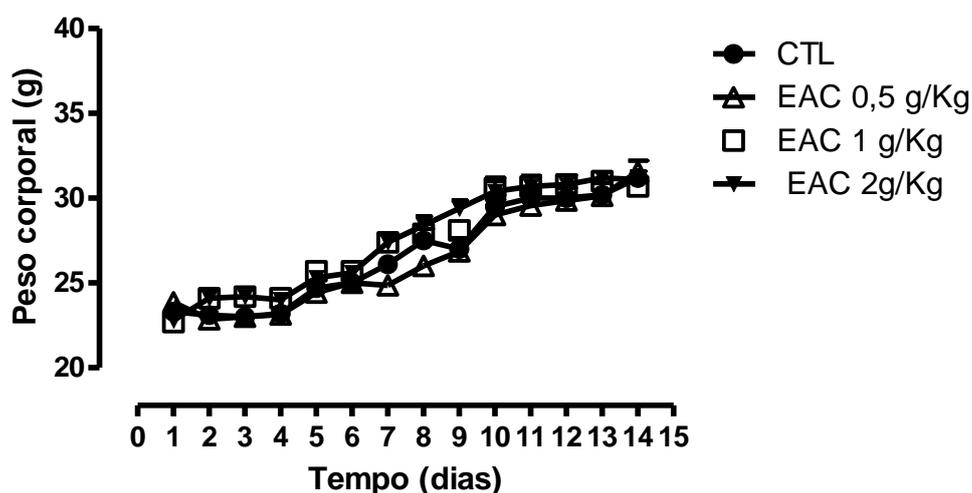


**Gráfico 2 -** Espectro de RMNH da F63 de *Arrabidaea chica* Verlot

*Resultados da Avaliação  
Toxicológica – In vivo*

10 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO TÓXICOLOGICA – *IN VIVO*10.1 Avaliação da toxicidade aguda do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot em ratos e camundongos■ Camundongos (*Mus musculus*)

O EAC de *Arrabidaea chica* Verlot, quando administrado por via intraperitoneal (i.p.), em camundongos, não produziu quaisquer sinais de morte ou toxicidade nas doses utilizadas (0,5, 1,0 ou 2,0 g/Kg) durante os 14 dias de observação. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos após autopsia dos animais e nos mesmos não houve alteração ponderal em relação ao grupo controle (Gráfico 3).



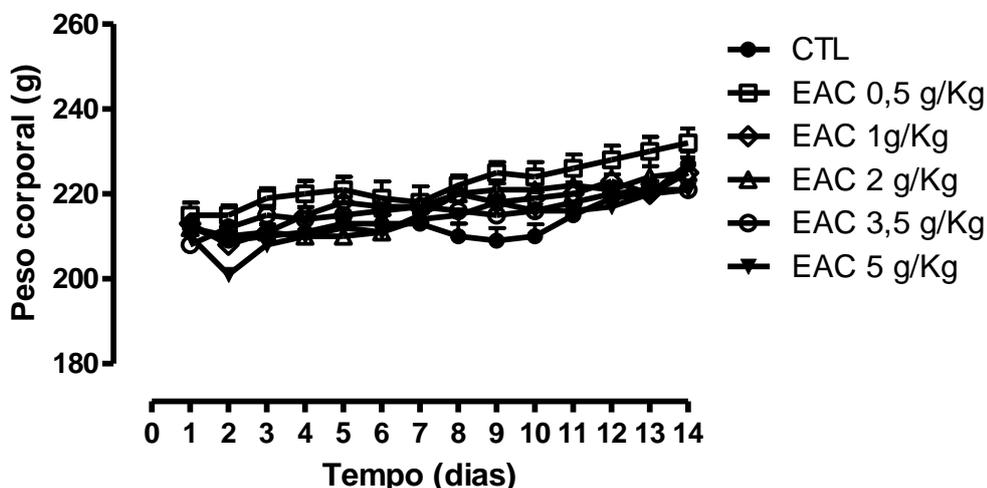
**Gráfico 3** - Efeito da administração aguda por via intraperitoneal (i.p.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot na avaliação em camundongos (n=10). Os pontos e barras verticais representam, respectivamente, as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 14 dias de observação

■ Ratos (*Rattus norvegicus*)

Após a administração do EAC em ratos por via oral (v.o.), nas doses 0,5, 1,0, 2,0 ou 3,5g/Kg não ocorreram sinais de toxicidade ou morte dos animais, entretanto, na dose de 5,0g/Kg, os animais tratados apresentaram diarreia no 2º, 3º e 4º dias após a administração, porém, não houve morte neste grupo.

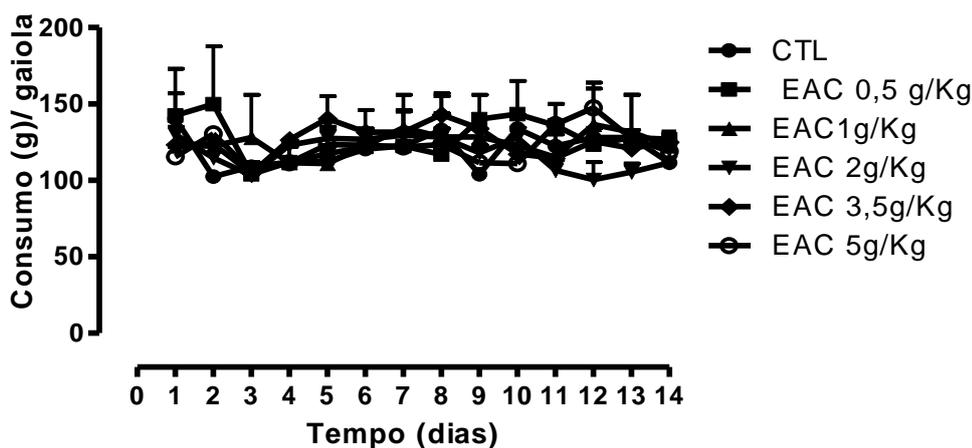
Não foi observada nenhuma alteração macroscópica nos órgãos destes animais, nas doses administradas.

O EAC de *Arrabidaea chica* Verlot não produziu alteração ponderal significativa nos animais em relação ao controle nos 14 dias de observação, em nenhuma das doses utilizadas (Gráfico 4).

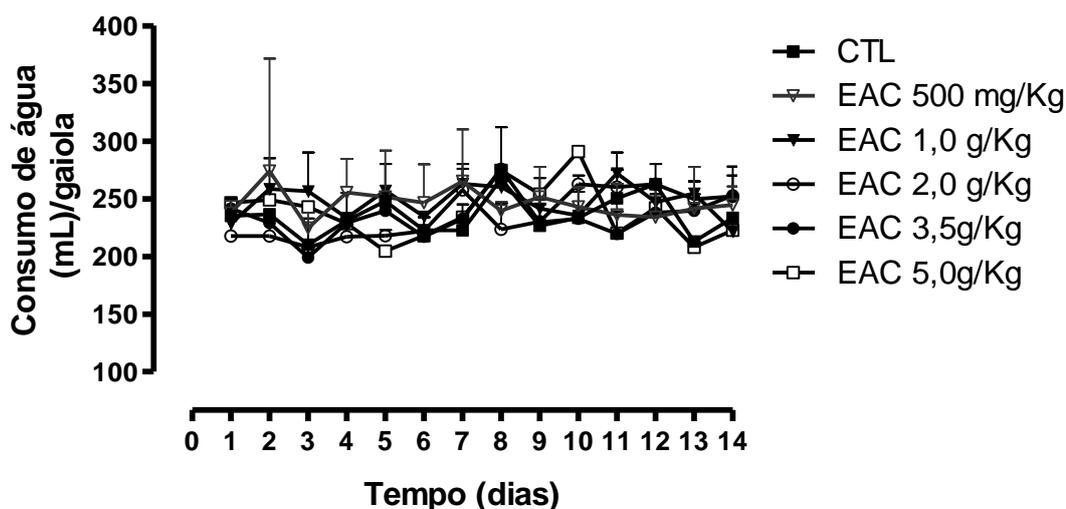


**Gráfico 4** - Efeito da administração aguda, por via oral (v.o.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot no peso corporal dos ratos. Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 10 animais

O consumo de ração e de água dos animais tratados com o EAC foi semelhante ao consumo dos animais do grupo controle nos 14 dias de observação (Gráficos 5 e 6).



**Gráfico 5** - Efeito da administração corporal aguda, por via oral (v.o.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot no consumo de ração de ratos. Os pontos representam as médias de 6 animais/gaiola



**Gráfico 6** - Efeito da administração aguda por via oral (v.o.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot no consumo de água de ratos. Os pontos representam as médias de 6 animais./gaiola

## 10.2 Avaliação da toxicidade aguda

### 10.2.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Os resultados das análises hematológicas dos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot ou salina (controle) estão dispostos na tabela 3. A análise foi feita mediante comparação dos valores obtidos nos animais tratados com EAC nas diferentes doses em relação aos animais do grupo controle (salina 0,9%).

Nos animais tratados de forma aguda com EAC de *Arrabidaea chica*, nas doses 0,5; 2,0; 3,5 e 5,0 g/Kg não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos, quando comparados ao grupo controle. Na dose de 1 g/Kg, houve aumento da concentração de hemoglobina em relação ao grupo controle (Tabela 3).

**Tabela 3** - Parâmetros hematológicos após à administração aguda do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot em ratos

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPO					
	CONTROLE	EAC 0,5g/Kg	EAC 1,0 g/Kg	EAC 2,0 g/Kg	EAC 3,5 g/Kg	EAC 5,0 g/Kg
WBC (K/ $\mu$ L)	4,575 $\pm$ 1,217	3,500 $\pm$ 1,044	3,440 $\pm$ 0,7827	3,617 $\pm$ 0,5326	3,925 $\pm$ 1,876	3,583 $\pm$ 0,6337
RBC (K/ $\mu$ L)	6,600 $\pm$ 0,1780	6,367 $\pm$ 0,5175	7,020 $\pm$ 0,2498	6,050 $\pm$ 0,2377	6,425 $\pm$ 0,3449	6,983 $\pm$ 0,4118
Hb (g/dL)	12,40 $\pm$ 0,2345	18,80 $\pm$ 5,133	<b>14,40 <math>\pm</math></b> <b>0,3435*</b>	11,63 $\pm$ 0,4145	12,23 $\pm$ 0,4922	13,37 $\pm$ 0,4080
Ht (%)	34,30 $\pm$ 0,7692	33,47 $\pm$ 2,525	37,74 $\pm$ 0,9647	32,00 $\pm$ 1,252	33,95 $\pm$ 1,561	36,20 $\pm$ 1,857
VCM (fL)	52,25 $\pm$ 0,9465	52,67 $\pm$ 0,3333	63,80 $\pm$ 0,7348	52,83 $\pm$ 0,3073	52,75 $\pm$ 0,7500	51,83 $\pm$ 0,4014
HCM (pg)	18,90 $\pm$ 0,4320	30,50 $\pm$ 9,862	20,44 $\pm$ 0,6120	19,22 $\pm$ 0,1869	19,03 $\pm$ 0,3351	19,28 $\pm$ 0,5724
CHCM (g/dL)	36,18 $\pm$ 0,2394	57,87 $\pm$ 1,848	38,20 $\pm$ 0,8468	36,38 $\pm$ 0,3458	36,03 $\pm$ 0,2462	37,12 $\pm$ 0,8288
PLT(K/ $\mu$ L)	598,3 $\pm$ 102,3	717,7 $\pm$ 82,35	742,0 $\pm$ 29,18	561,3 $\pm$ 62,40	654,8 $\pm$ 49,10	769,7 $\pm$ 26,04
Neu	16,50 $\pm$ 3,279	9,000 $\pm$ 2,000	6,200 $\pm$ 1,020	9,333 $\pm$ 3,073	8,500 $\pm$ 3,122	14,83 $\pm$ 3,331
Lym	81,75 $\pm$ 3,750	88,67 $\pm$ 3,180	91,80 $\pm$ 1,562	87,50 $\pm$ 4,089	90,25 $\pm$ 3,816	82,33 $\pm$ 3,836
Mono	1,750 $\pm$ 0,7487	2,000 $\pm$ 1,000	1,200 $\pm$ 0,3742	3,167 $\pm$ 1,579	1,250 $\pm$ 0,9465	2,167 $\pm$ 0,8333
Eos	0,0 $\pm$ 0,0	0,3333 $\pm$ 0,3333	0,8000 $\pm$ 0,5831	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6667 $\pm$ 0,3333
Baso	0	0	0	0	0	0

\*Significa diferença quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de Newman Keuls,  $n = 10$ ).

10.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos

Os resultados da análise bioquímica no soro dos animais tratados com EAC de *Arrabidaea chica* e a salina (controle) estão apresentados na tabela 4. A análise foi feita comparando-se as médias das concentrações dos valores dos parâmetros bioquímicos obtidos nos diferentes grupos tratados com o EAC de *Arrabidaea chica*, com a do controle (Tabela 4).

As concentrações séricas de glicose do soro dos animais tratados com o EAC nas doses de 2,0 e 3,5 g/Kg apresentaram-se reduzidas em relação ao controle, em 27,4 e 29,7%, respectivamente.

Nos animais tratados nas doses de 2,0 e 3,5 g/Kg com o EAC, as concentrações de Aspartato amino – transferase (AST) aumentaram de 52,7 % e 35,2 % respectivamente, em relação ao controle.

Os níveis séricos de uréia e de colesterol – HDL apresentaram-se aumentados em relação ao controle nas doses de 0,5, 1,0 e 5,0 g /Kg. A uréia, aumentou 219,7 %, na dose de 0,5 g/Kg; 301,9 %, na dose de 1,0 g /Kg e 321,9 %, na dose de 5,0 g /Kg. Já o colesterol HDL aumentou de 108,4 %, 116,5% e 107,3% nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 g/Kg, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4** - Parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos submetidos à administração aguda do EAC de *Arrabidaea chica*, após 14 dias de observação

PARÂMETRO S BIOQUÍMICOS	GRUPO					
	CONTROLE	EAC 0,5 g/Kg	EAC 1,0 g/Kg	EAC 2,0 g/Kg	EAC 3,5 g/Kg	EAC 5,0 g/Kg
CRE (mg / dL)	0,9333 ± 0,1333	.....	1,400 ± 0,08944	1,133 ± 0,0667	0,9333 ± 0,1333	1,267 ± 0,06667
GLI (mg /dL)	101,1 ± 6,037	107,6 ± 13,01	121,2 ± 7,962	<b>73,40 ± 5,395*</b>	<b>71,10 ± 9,340*</b>	.....
ALT (U / L)	74,50 ± 4,052	84,67 ± 4,842	74,50 ± 4,738	83,17 ± 3,781	78,00 ± 2,000	69,17 ± 4,813
AST (U / L)	88,75 ± 5,633	64,00 ± 2,000	83,50 ± 4,288	<b>135,5 ± 9,175*</b>	<b>120,0 ± 5,000*</b>	.....
CT (mg / dL)	75,78 ± 2,009	81,03 ± 3,139	73,02 ± 4,137	64,46 ± 3,020	66,73 ± 1,826	74,10 ± 3,296
TRI (mg / dL)	82,46 ± 29,25	30,53 ± 8,349	71,97 ± 12,00	73,08 ± 5,545	50,60 ± 10,69	41,93 ± 4,192
UR (mg / dL)	29,96 ± 2,289	<b>99,77 ± 8,604*</b>	<b>120,4 ± 12,36*</b>	30,82 ± 4,590	30,38 ± 6,288	<b>126,4 ± 9,686*</b>
HDL (mg / dL)	23,32 ± 0,9292	<b>48,60 ± 0,7937*</b>	<b>50,48 ± 2,869*</b>	23,23 ± 1,455	22,78 ± 0,4922	<b>48,32 ± 1,084*</b>

CRE (Creatinina), GLI (glicose), ALT (Alanina amino-transferase), AST (Aspartato amino-transferase), CT (Colesterol total), TRI (Triglicérides), UR (Uréia), HDL (Colesterol HDL) , ..... (dados insuficientes).\*Significa diferença quando comparado ao grupo controle (p<0,05, ANOVA, teste de Newman Keuls, n = 6).

### 10.3 Avaliação da toxicidade crônica do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot em ratos

#### 10.3.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros hematológicos dos animais do grupo controle (salina) ou

EAC de *Arrabidaea chica* Verlot (0,25 ou 0,5 g/Kg) estão dispostos na Tabela 5. A análise foi realizada comparando-se as médias obtidas nos grupos tratados com EAC com as do grupo controle.

Nos grupos tratados por 12 semanas com o EAC de *Arrabidaea chica* Verlot, na dose de 0,25 g/Kg foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos, volume corpuscular médio (VCM) e no número de neutrófilos (Tabela 5)

**Tabela 5** - Parâmetros hematológicos de ratos tratados, por 90 dias, com o EAC de *Arrabidaea chica* nas doses de 0,25 ou 0,5 g/Kg

Parâmetros Hematológicos	Grupo		
	Controle	EAC 0,25 g/Kg	EAC 0,5 g/Kg
WBC (K/ $\mu$ L)	4,71 $\pm$ 1,57	.....	8,267 $\pm$ 2,739
RBC (K/ $\mu$ L)	7,04 $\pm$ 1,07	7,50 $\pm$ 0,3240	7,993 $\pm$ 0,1920
Hb (g/dL)	13,2 $\pm$ 1,58	14,2 $\pm$ 0,5583	14,07 $\pm$ 0,7219
Ht (%)	42,6 $\pm$ 2,53	42,9 $\pm$ 1,728	40,27 $\pm$ 1,674
VCM (fL)	52,3 $\pm$ 1,41	<b>57,1 <math>\pm</math> 0,46*</b>	50,33 $\pm$ 0,8819
HCM (pg)	18,2 $\pm$ 0,32	18,8 $\pm$ 0,15	17,57 $\pm$ 0,5457
CHCM (g/dL)	34,7 $\pm$ 1,12	33,0 $\pm$ 0,26	34,93 $\pm$ 0,5925
PLT(K/ $\mu$ L)	822,8 $\pm$ 117,1	642,0 $\pm$ 22,59	229,0 $\pm$ 229,0
Neu	20,3 $\pm$ 2,15	<b>7,00 <math>\pm</math> 4,60*</b>	21,67 $\pm$ 3,712
Lym	68,0 $\pm$ 4,63	86,2 $\pm$ 4,51	73,00 $\pm$ 5,568
Mono	4,66 $\pm$ 0,88	2,0 $\pm$ 1,3	5,000 $\pm$ 1,528
Eos	7,00 $\pm$ 3,81	2,25 $\pm$ 0,25	0,3333 $\pm$ 0,3333
Baso	0	0	0

\*Significa diferença quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ , ANOVA; Teste de Newman Keuls,  $n = 6$ ). (.....) dados insuficientes.

### 10.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos

Os resultados das análises bioquímicas em soro de animais tratados por 90 dias, com

salina ou EAC de *Arrabidaea chica* Verlot nas doses de 0,25 ou 0,5 g/Kg estão apresentados na tabela 6. A análise foi feita comparando-se as médias das concentrações dos parâmetros bioquímicos nos diferentes grupos tratados com extrato com as do grupo controle.

Nos animais tratados com EAC de *Arrabidaea chica* Verlot não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle (Tabela 6).

**Tabela 6** - Parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos tratados cinco vezes por semana, por 90 dias, com o EAC de *Arrabidaea chica* nas doses de 0,25 ou 0,5 g/Kg

Parâmetros Bioquímicos	Grupo		
	Controle	EAC 0,25 g/Kg	EAC 0,5 g/Kg
CRE (mg / dL)	1,433 ± 0,1308	1,250 ± 0,09574	1,400 ± 0,2309
GLI (mg /dL)	105,5 ± 5,445	101,8 ± 5,543	102,3 ± 9,597
ALT (U / L)	55,00 ± 7,047	62,00 ± 8,000	55,50 ± 19,50
AST (U / L)	84,14 ± 3,562	81,25 ± 5,822	75,50 ± 7,500
CT (mg / dL)	82,23 ± 6,764	76,57 ± 11,78	80,53 ± 7,478
TRI (mg / dL)	74,70 ± 26,10	71,00 ± 11,54	63,07 ± 7,275
UR (mg / dL)	56,60 ± 2,074	66,00 ± 3,055	49,50 ± 2,982
HDL (mg / dL)	52,95 ± 5,477	41,67 ± 4,978	52,35 ± 20,05
ALP (U / L)	43,12 ± 6,542	42,63 ± 4,135	53,00 ± 4,600

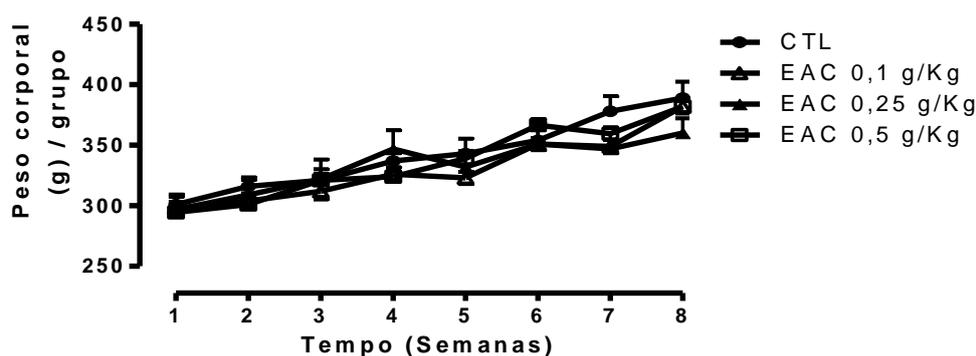
CRE (Creatinina), GLI (glicose), ALT (Alanina amino-transferase), AST (Aspartato amino-transferase), CT (Colesterol total), TRI (Triglicérides), UR (Uréia), HDL (p<0,05, ANOVA; Teste de Newman Keuls, n = 6).

*Resultados da Avaliação  
Farmacológica – In vivo e ex-vivo*

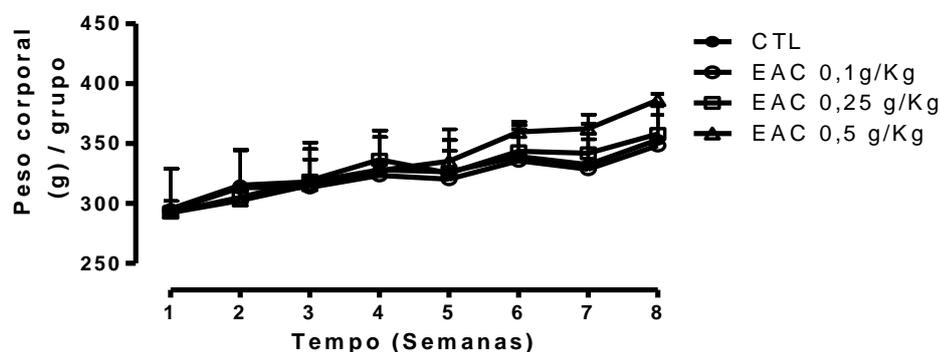
**11 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – *IN VIVO*****11.1 Avaliação do efeito da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a evolução ponderal; consumo de ração e órgãos autopsiados**

A administração oral do EAC (0,1, 0,25 e 0,5 g/kg) durante 60 dias a ratos normotensos e hipertensos SHR não produziu quaisquer sinais de toxicidade ou qualquer outra alteração no peso corporal dos animais (Gráfico 7 A e B), e nem na quantidade de ingesta de ração (Grafico 8 A e B) quando comparados ao controle. Não foram observadas alterações anatomopatológicas nos órgãos dos animais.

A = Normotenso

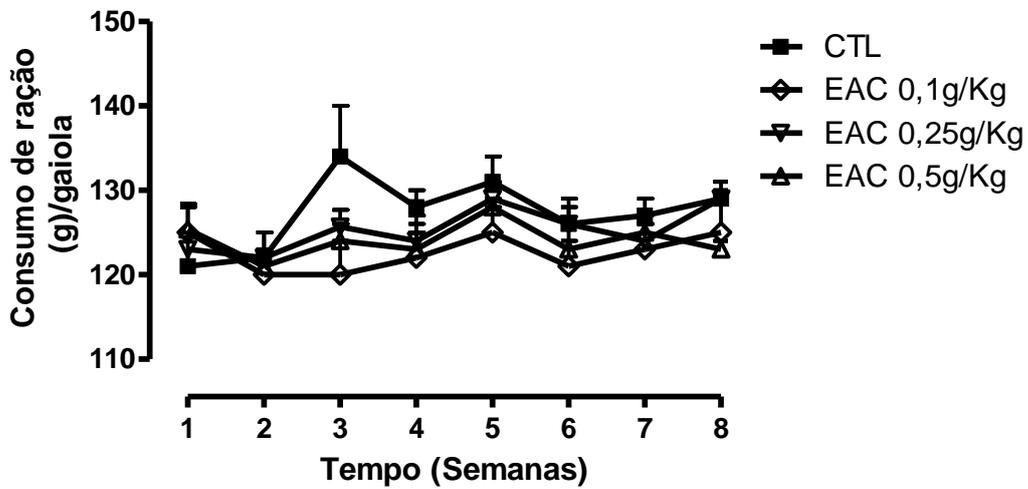


B = SHR

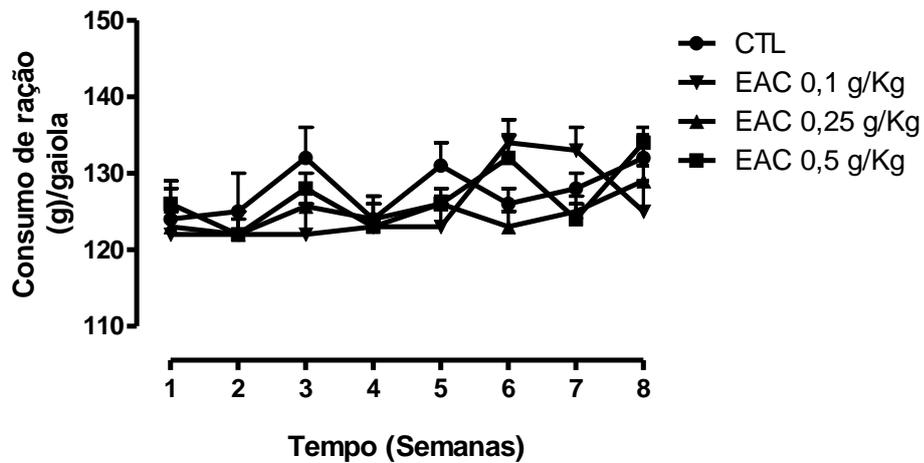


**Gráfico 7** - Efeito da administração crônica por via oral (v.o.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot no peso dos ratos normotensos (A) e SHR (B). Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 10 animais. ( $p < 0,05$ , ANOVA; Teste de Newman Keuls,  $n = 10$ ).

A = normotenso



B= SHR



**Gráfico 8** - Efeito da administração crônica por via oral (v.o.) do EAC de *Arrabidaea chica* Verlot no consumo de ração dos ratos normotensos (A) e SHR (B). Os pontos e barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 10 animais ( $p < 0,05$ , ANOVA; Teste de Newman Keuls).

### 11.2 Efeitos da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a frequência cardíaca e pressão arterial de ratos normotenso

A administração do EAC (0,1, 0,25 e 0,5 g/Kg/dia; v.o.) durante 8 semanas, não produziu alteração no peso corporal médio dos animais que apresentou padrão de crescimento normal semelhante aos animais controles até o término do tratamento. A pressão arterial média dos animais normotensos do grupo controle (CTL) e os grupos tratados com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg, v.o) permaneceu entre  $110 \pm 4$  e  $111 \pm 9$  mmHg (n=10) durante o período de adaptação de 15 dias. A pressão arterial começou a ser reduzida significativamente a partir da terceira semana nas doses de 0,1 e 0,25 g/Kg em 7,5 e 18,73% em relação ao controle (114,6 mmHg, n= 10). A maior dose (0,5 g/Kg, n=10) produziu redução de 19% durante a terceira semana, após o que apresentou uma cinética semelhante a dose de 250 mg/Kg. Ao atingir as 8 semanas de tratamento com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg) a pressão sanguínea apresentou-se reduzida comparada ao grupo controle (115,8 mmHg; n= 10) em 17,47%; 21,67% e 24,67% respectivamente. (Gráfico 9) O EAC nas doses utilizadas não causou alteração da frequência cardíaca quando comparada ao grupo controle (CTL) (Gráfico 10).

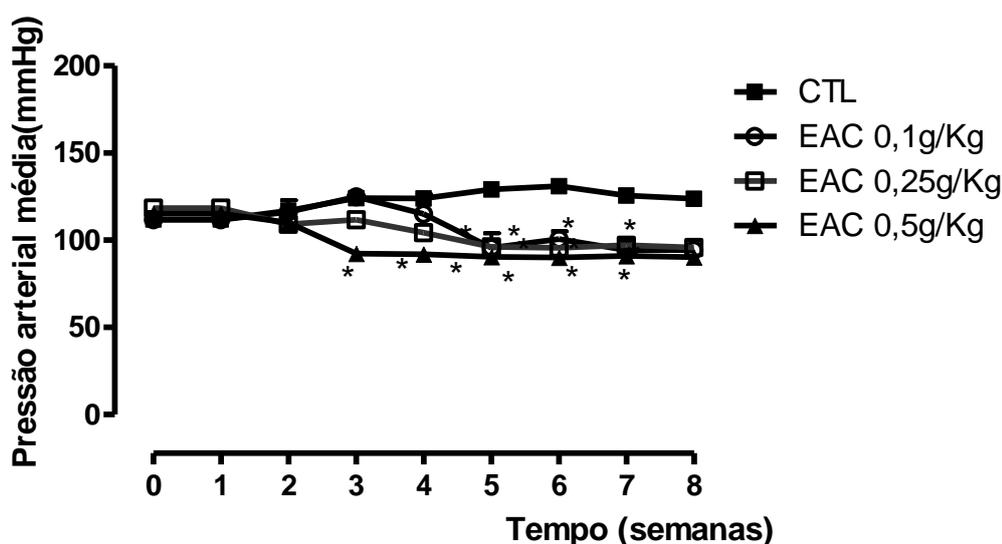
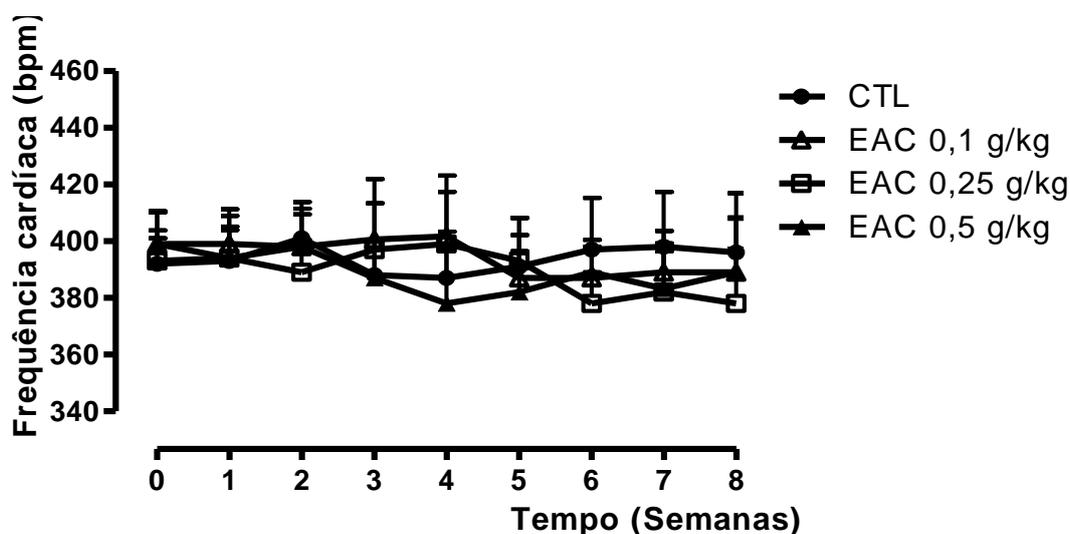


Gráfico 9 - Efeito do EAC de *Arrabidea chica Verlot.* administrado durante 8 semanas, na pressão arterial média de ratos normotensos n= 10. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 10 experimentos. (\*) Significativamente diferente do valor médio obtido no grupo controle ( $p < 0,05$ , teste *t* de Student)

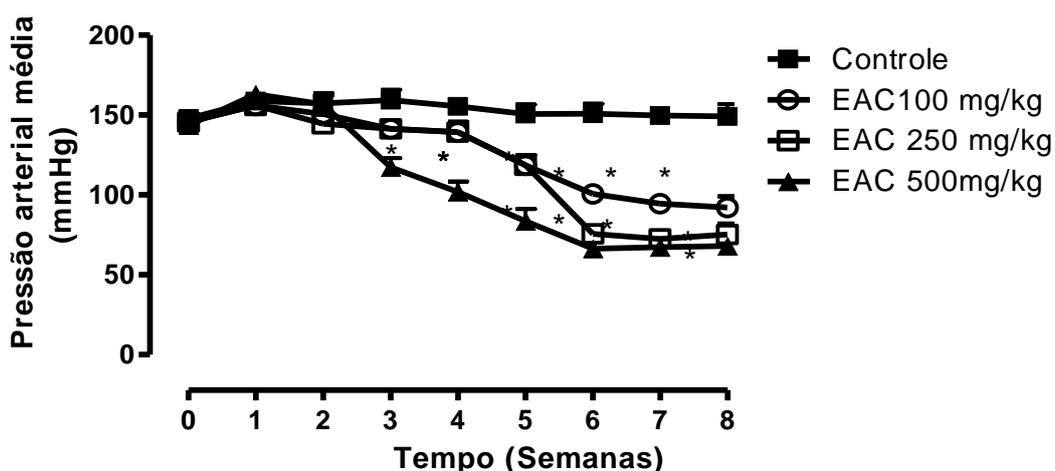


**Gráfico 10** - Efeito do EAC de *Arrabidea chica Verlot*. administrado durante 8 semanas, sobre a frequência cardíaca de ratos normotensos. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 10 experimentos

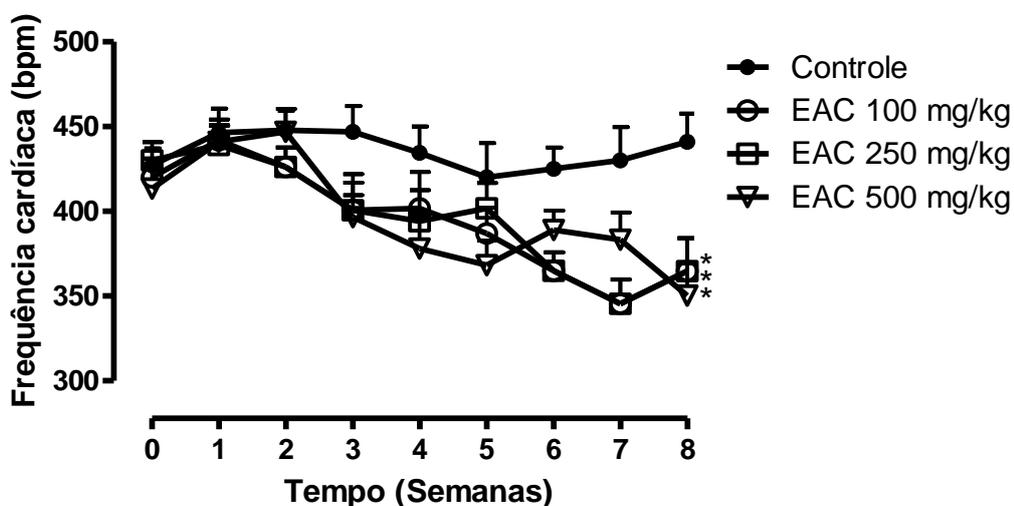
### 11.3 Efeitos da administração crônica de EAC (g/Kg/dia/v.o) sobre a frequência cardíaca e pressão arterial de ratos SHR

A pressão arterial média dos animais do grupo controle (CTL) e os grupos tratados com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/kg, v.o) permaneceu entre  $145 \pm 4$  e  $151 \pm 5$  mmHg (n=10) durante o período de adaptação de 15 dias.

O tratamento com o EAC nas doses de 0,1 e 0,25 g/kg/dia (n=10) causou redução de 21,2% no nível tensional da pressão arterial em ambas as doses, a partir da quinta semana de tratamento. Ao final do tratamento as doses de 0,1 e 0,25 mg/kg atingiram redução da pressão sanguínea de 38,2% e 49,6 %, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. A dose de 0,5 g/kg (n=10) causou uma redução de 34,4% nos níveis tensionais, a partir da quarta semana apresentando uma cinética linear e constante desde a sexta semana até a oitava semana de tratamento, atingindo um nível de redução de 54,4%, quando comparado ao grupo controle.(Gráfico 11). A frequência cardíaca acompanhou a queda da pressão arterial sendo reduzida em 13,4%; 15,35% e 15,25% ao final do tratamento com EAC 0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg, respectivamente (Gráfico 12).



**Gráfico 11** - Efeito do EAC de *Arrabidea chica Verlot.* administrado durante 8 semanas, na pressão arterial sistólica de ratos SHR. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 10 experimentos. (\*) Significativamente diferente do valor médio obtido no grupo controle ( $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student)



**Gráfico 12** - Efeito do EAC de *Arrabidea chica Verlot.* administrado durante 8 semanas, sobre a frequência cardíaca de ratos SHR. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 10 experimentos. (\*) Significativamente diferente do valor médio obtido no grupo controle ( $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student)

### 11.4 Avaliações dos parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos hipertensos SHR tratados cronicamente com EAC de *Arrabidaea chica* Verlot

Os resultados dos parâmetros bioquímicos no soro dos animais hipertensos SHR tratados com salina 0,9% (1mL/100g) ou EAC (0,1; 0,25 e 0,5g/kg/dia/v.o) estão apresentados na Tabela 7. A análise foi realizada comparando-se as médias das concentrações dos valores dos parâmetros bioquímicos obtidos nos diferentes grupos tratados com EAC de *Arrabidaea chica* Verlot com a média dos mesmos parâmetros obtidos no grupo controle.

A única alteração detectada foi nas concentrações séricas de glicose do soro dos animais que receberam EAC nas doses de 0,25 e 0,5 g/mL/dia/v.o. A glicose foi reduzida em 30 e 32% respectivamente quando comparada aos níveis sérico dos animais pertencente ao grupo controle.

**Tabela 7** - Parâmetros bioquímicos de ratos hipertensos SHR e tratados com EAC de *Arrabidaea chica* Verlot

Parâmetros Bioquímicos	Grupo			
	Controle	EAC 0,5g/kg	EAC 0,25 g/kg	EAC 0,1g/kg
GLI (mg /dL)	119 ± 9,96	<b>80,9 ±7,22*</b>	<b>83,8 ±5,62*</b>	118, 4 ±25,5
CT (mg / dL)	75,2 ± 3,42	70,1 ± 4,32	73,4 ± 2,34	73,2 ± 3,42
HDL (mg / dL)	32,9 ± 4,5	32,9 ± 5,17	33,1 ± 2,17	32,4 ± 3,18
TRI (mg / dL)	75,6 ± 10,5	71,9 ± 11,2	73,0 ± 6,45	74,2 ± 5,66
ALB (mg/dL)	2,5 ± 0,33	2,7 ± 0,25	2,4 ± 0,63	2,4 ± 0,56
UR (mg / dL)	60,5 ± 4,32	59,6 ± 2,32	58,7 ± 4,52	58,4 ± 5,60
CRE (mg/dL)	1,29 ± 0,08	1,13 ± 0,06	1,27 ± 0,66	1,19 ± 0,66
ALT (U / L)	56,2 ± 4,04	52,3 ± 3,60	54,1 ± 5,67	55,2 ± 6,57
AST (U / L)	87,2 ± 5,62	82,3 ± 6,25	83,2 ± 5,48	85,3 ± 5,78
ALP (U / L)	44,2 ± 4,56	40,2 ±1,34	39,8 ± 4,52	42,3 ± 2,32

CRE (Creatinina), GLI (glicose), ALT (Alanina amino-transferase), AST (Aspartato amino-

transferase), ALB (albumina), CT (Colesterol total), TRI (Triglicérides), UR (Uréia), HDL (Colesterol HDL), ALP (Fosfatase Alcalina). \*Significa diferença quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ , teste *t* de Student).

#### **11.5 Efeito do tratamento crônico com o EAC sobre a reatividade de artérias mesentéricas com endotélio funcional isoladas de ratos normotensos e hipertensos SHR com endotélio funcional**

A artéria mesentérica isolada de ratos normotensos, previamente tratados com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg/dia) contraiu-se à adição de noradrenalina com respostas proporcionais às doses no intervalo de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M, com  $EC_{50}$  do grupo controle de  $3,08 \times 10^{-7}$  M. O tratamento com o EAC nas doses utilizadas promoveu redução da contração quando comparada com a curva concentração resposta dos animais controles (Tabela 8, Gráfico 13).

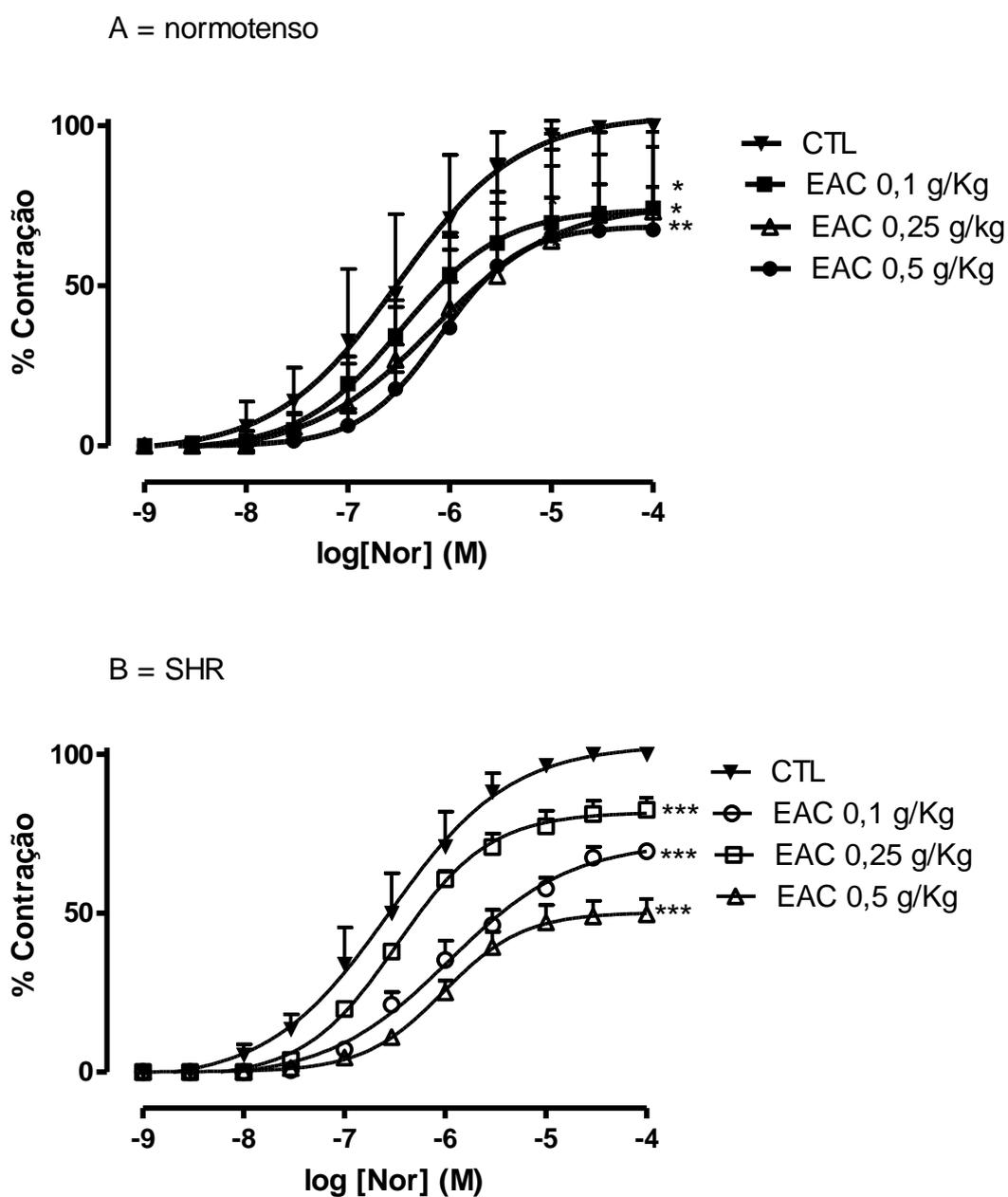
A artéria mesentérica isolada de rato hipertensos SHR, tratado cronicamente com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/kg/dia) contraiu-se à adição de noradrenalina com respostas proporcionais às doses no intervalo de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M, obtendo-se  $EC_{50}$  de  $3,4 \times 10^{-7}$  M para o grupo controle, que foi diferente das  $EC_{50}$  obtidos para os animais tratados com EAC nas doses de 0,1; 0, 25 ou 0,5 g/Kg/v.o. O tratamento, portanto, promoveu deslocamento do  $pD_2$  da noradrenalina para direita quando comparada às curvas do grupo controle (Tabela 8, Gráfico 13).

**Tabela 8** - Valores de  $CE_{50}$ ,  $pD_2$ , e  $E_{max}$  obtidos para a curva cumulativa de noradrenalina em preparações de artéria de ratos normotensos e SHRT tratados crônicamente

	Grupos	$CE_{50}$	$PD_2$	$E_{max}(\%)$
<b>Ratos Normotensos</b>	<b>Controle</b>	$3,08 \times 10^{-7}$	$6,51 \pm 0,097$	100
	<b>EAC (100mg/Kg)</b>	$3,32 \times 10^{-7}$	$6,47 \pm 0,08^{***}$	$74,17 \pm 6,05^*$
	<b>EAC(250mg/Kg)</b>	$6,87 \times 10^{-7}$	$6,16 \pm 0,12^{***}$	$73,1 \pm 2,54^*$
	<b>EAC (500mg/Kg)</b>	$8,06 \times 10^{-7}$	$6,09 \pm 0,13^{***}$	$67,4 \pm 9,55^{**}$
<b>Ratos hipertensos SHR</b>	<b>Controle</b>	$3,4 \times 10^{-7}$	$6,46 \pm 0,079$	100
	<b>EAC (100mg/Kg)</b>	$1,12 \times 10^{-6}$	$5,94 \pm 0,04^{***}$	$69,4 \pm 1,66$
	<b>EAC (250mg/Kg)</b>	$2,57 \times 10^{-7}$	$6,58 \pm 0,07^{**}$	$82,5 \pm 3,77$
	<b>EAC (500mg/Kg)</b>	$1,12 \times 10^{-6}$	$5,95 \pm 0,05^{***}$	$49,6 \pm 4,84$

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das médias (n=6).

\* Valor estatisticamente diferente do  $pD_2$  e  $E_{max}$  obtido na curva controle de noradrenalina ( $p < 0,05$ ; ANOVA).



**Gráfico 13** - Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NA) em artéria mesentérica de ratos Normotensos **(A)** e SHR **(B)** tratados por 8 semanas com EAC de *Arrabidaea chica* Verlot. Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  erro padrão das médias (n = 5). \*Indica diferença significativa do  $E_{max}$  em relação a curva controle de noradrenalina ( $p < 0,05$ , ANOVA)

*Resultados da Avaliação  
Farmacologica – In vitro*

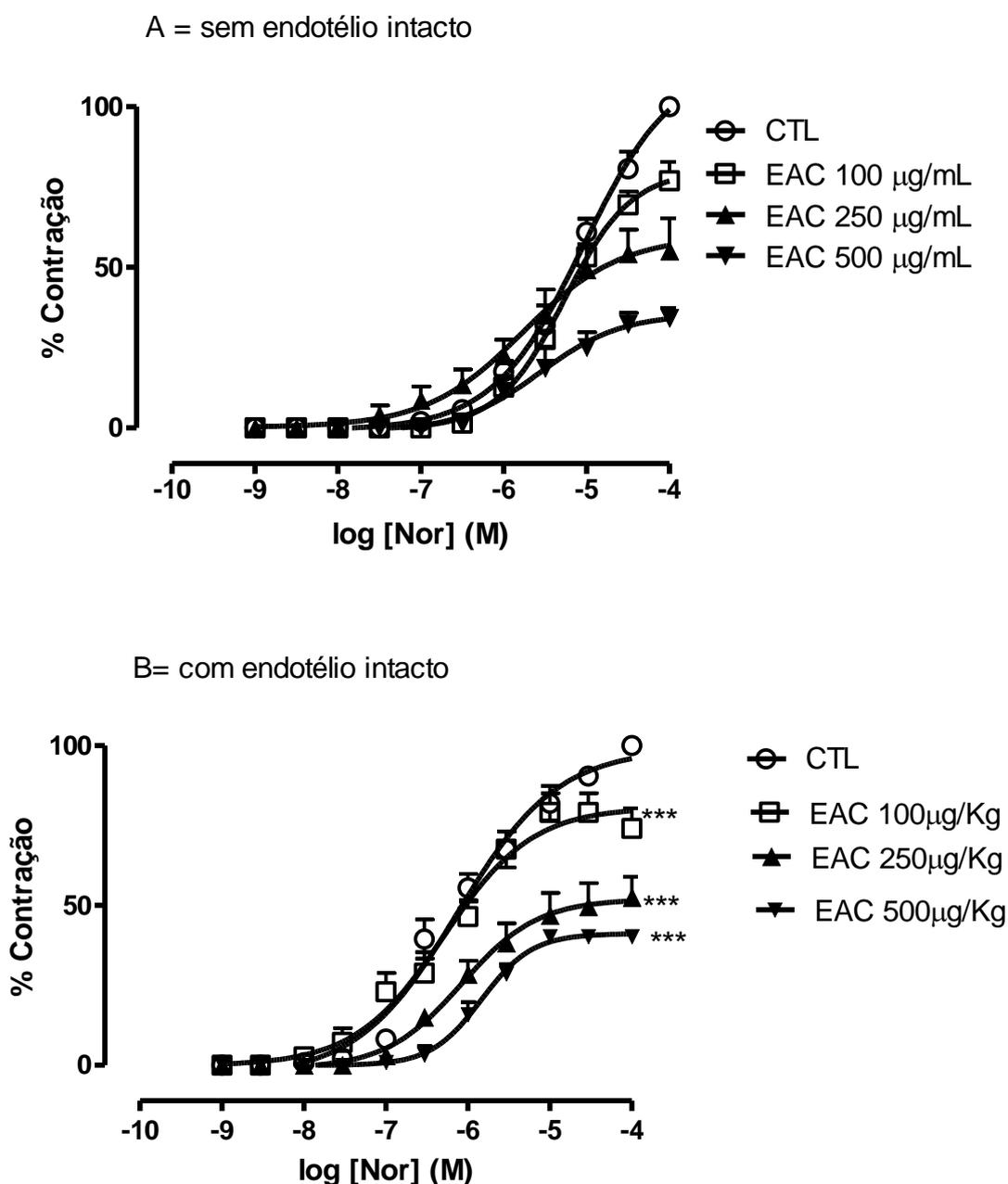
**12 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA – IN VITRO****12.1 Efeito do EAC sobre receptores adrenérgico de artéria mesentérica de ratos SHR à noradrenalina**

As artérias isoladas de ratos hipertensos SHR, em condições experimentais de ausência de endotélio e presença de EAC nas concentrações de (100; 250 e 500 µg/mL) reduziu a contração máxima induzida por concentrações crescentes de NA de modo estatisticamente diferente e deslocou as curvas concentração resposta (Tabela 9; Gráfico 14 A). Entretanto, o EAC (100; 250 e 500 µg/mL) na presença do endotélio reduziu a contração máxima em todas as doses e somente deslocou a curva concentração resposta para a direita nas concentrações de 100 e 500 µg/mL (Tabela 9; Gráfico 14B).

**Tabela 9** - Valores de  $CE_{50}$ ,  $pD_2$ , e  $E_{max}$  obtidos para a noradrenalina na presença de EAC em comparações de artéria mesentérica de ratos hipertensos SHR

Artéria Mesentérica de ratos hipertensos (SHR)	GRUPO	$CE_{50}$ (M)	$PD_2$	$E_{max}$ (%)
Ausência do endotélio	Controle	$9,27 \times 10^{-6}$	$5,03 \pm 0,11$	100
	EAC (100µg/mL)	$5,50 \times 10^{-6}$	$5,26 \pm 0,06$	$77,0 \pm 5,8^*$
	EAC (250 µg/mL)	$1,79 \times 10^{-6}$	$5,74 \pm 0,24^{***}$	$55,1 \pm 10,0^*$
	EAC (500 µg/mL)	$2,72 \times 10^{-6}$	$5,56 \pm 0,19^{***}$	$34,1 \pm 3,1^{***}$
Presença do endotélio	Controle	$7,47 \times 10^{-7}$	$6,12 \pm 0,08$	100
	EAC (100µg/mL)	$5,08 \times 10^{-7}$	$6,29 \pm 0,12^*$	$74,1 \pm 6,2^{***}$
	EAC (250 µg/mL)	$8,41 \times 10^{-7}$	$6,07 \pm 0,13$	$52,5 \pm 6,41^{***}$
	EAC (500 µg/mL)	$1,47 \times 10^{-6}$	$5,83 \pm 0,05^{***}$	$40,3 \pm 1,78^{***}$

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das médias (n=5). \* Valor estatisticamente diferente do  $pD_2$  e  $E_{max}$  obtido na curva controle de noradrenalina ( $p < 0,05$ ; ANOVA).



**Gráfico 14** - Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NA) em artéria sem endotélio intacto (A) e com endotélio intacto (B) de ratos hipertensos SHR na presença de concentrações de EAC de *Arrabidaea chica* Verlot. Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). \*Indica diferença significativa do  $E_{max}$  em relação a curva controle de NA ( $p \leq 0,05$ , ANOVA)

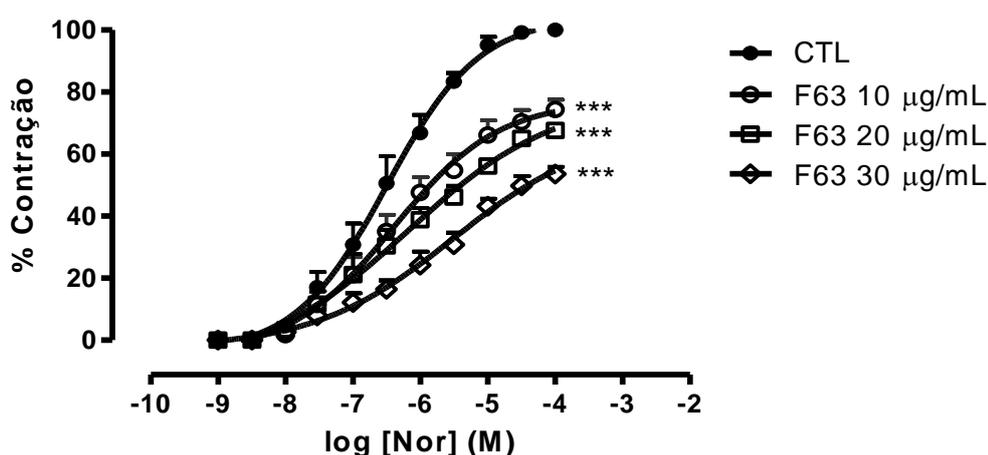
## 12.2 Efeito da F63 sobre adrenoceptores de artéria mesentérica de ratos SHR

A F63 (10; 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu o efeito máximo da noradrenalina nas artérias isoladas de ratos hipertensos SHR, com endotélio intacto nas três doses utilizada, de maneira concentração dependente. Entretanto, o deslocamento da curva na presença da F63 foi observado deslocamento nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 10, Gráfico 15).

**Tabela 10** - Valores de  $CE_{50}$ ,  $pD_2$ , e  $E_{max}$  obtidos para a noradrenalina na presença de F63 em preparações de artéria mesentérica isoladas de ratos SHR

GRUPO	$CE_{50}$	$pD_2$	$E_{max}(\%)$
Controle	$3,02 \times 10^{-7}$	$6,49 \pm 0,09$	100
F63(10 $\mu\text{g/mL}$ )	$3,96 \times 10^{-7}$	$6,40 \pm 0,12^*$	$74,1 \pm 6,2^{***}$
F63 (20 $\mu\text{g/mL}$ )	$6,54 \times 10^{-7}$	$6,18 \pm 0,88$	$52,5 \pm 6,4^{***}$
F63(30 $\mu\text{g/mL}$ )	$3,05 \times 10^{-6}$	$5,51 \pm 0,33^{***}$	$40,3 \pm 1,7^{***}$

\* Indica diferença significativa do  $pD_2$  e  $E_{max}$  em relação a curva controle de NAadrenalina (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; ANOVA).



**Gráfico 15** - Curvas concentração-resposta obtidas para noradrenalina (NA) em artéria mesentérica com endotélio intacto de ratos SHR na presença de concentrações de F63 de *Arrabidaea chica* Verlot. Os símbolos e barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 6$ ). \*Indica diferença significativa do  $E_{max}$  em relação a curva controle de NAadrenalina ( $p < 0,05$ , ANOVA).

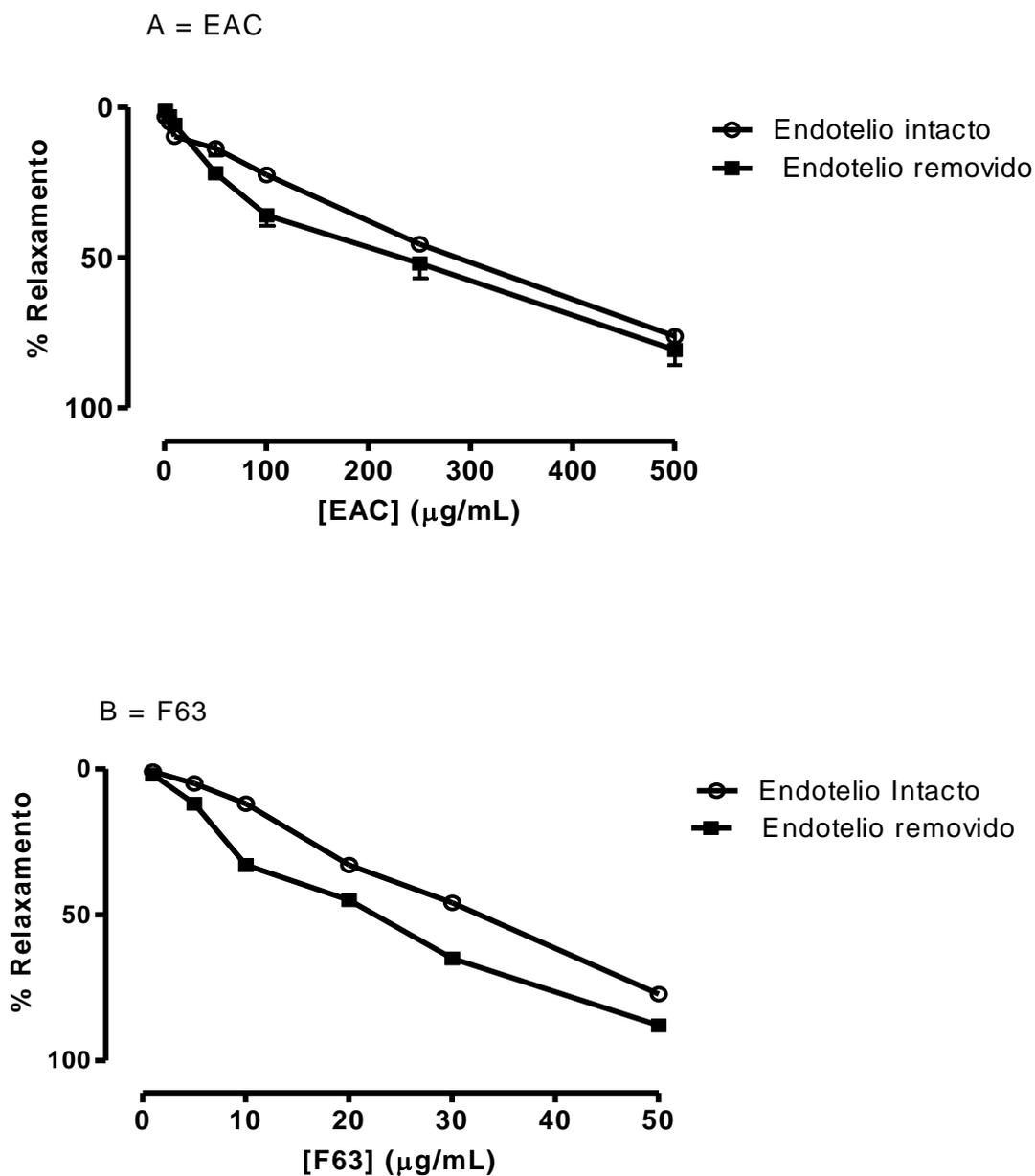
### 12.3 Avaliação da influência do endotélio funcional no efeito vasorelaxante do EAC ou F63 em artéria mesentérica de ratos SHR

O EAC (10 - 500 µg/mL) induziu um vasorelaxamento de maneira dependente de concentração em preparações de artéria mesentérica com endotélio funcional e, após a remoção do endotélio não foi observada diferença significativa no efeito máximo ( $E_{max}$ ) vasorelaxante do EAC em preparações pré-contraídas com noradrenalina. Entretanto observou-se um deslocamento para direita na curva com endotélio intacto (Tabela 11, Gráfico 16 A). A F63 nas concentrações utilizadas não apresentou diferença no padrão de resposta do relaxamento (Tabela 11, Gráfico 16 B). O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de aproximadamente 10 min, com uma duração máxima de relaxamento total em torno de 120 minutos. Após o experimento controle as preparações foram lavadas por 40 minutos e contraídas com NA para verificação da reversão do relaxamento induzido por EAC. Em todas as preparações houve uma reversão de 100 % da resposta (dados não apresentados).

**Tabela 11** - Valores de  $pD_2$  e intervalo de confiança de  $pD_2$  obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica na presença de EAC ou F63 de *Arrabidaea chica* com endotélio funcional em ratos SHR

GRUPO	$pD_2$	Intervalo de confiança
EAC (Endotélio intacto)	119,4	100,5 - 141,8
EAC (Endotélio removido)	174,1*	153,5 - 197,4
F63 (Endotélio intacto)	22,8	21,5 - 24,24
F63 (Endotélio removido)	16,18*	14,8 - 17,58

\* $p < 0,05$  versus endotélio intacto do EAC ou F63 respectivamente



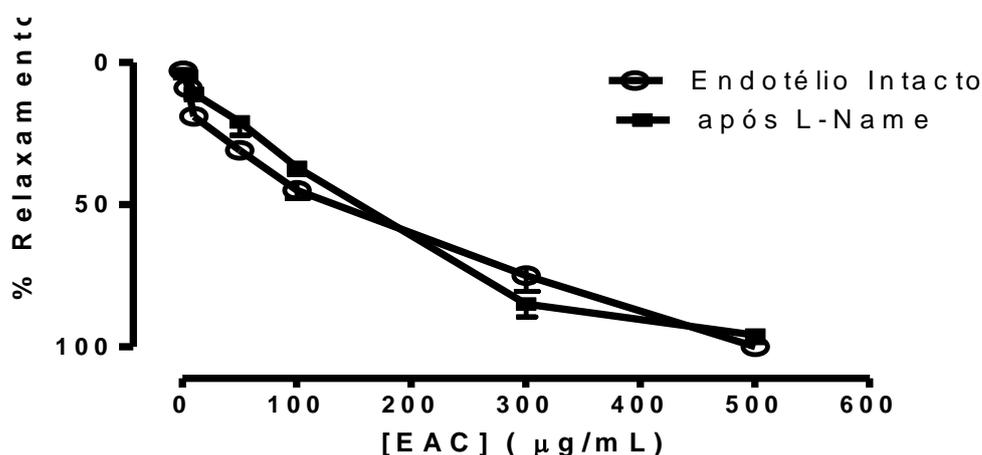
**Gráfico 16** - Curvas concentração-resposta do EAC (A) ou F63 (B) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), na presença (■) ou na ausência (○) do endotélio vascular e pré contraídos com noradrenalina (10µM). Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos. ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA)

### 12.4 Verificação da participação do NO na resposta relaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR com endotélio funcional e pré-contraídos com NA (10 $\mu$ M), o pré-tratamento com L-NAME (100  $\mu$ M) um inibidor não seletivos da enzima sintase de NO, não alterou a curva concentração-resposta para o EAC (1;5;10; 50; 100; 300 e 500 $\mu$ g/mL), nem promoveu alteração significativa no efeito máximo (NA  $E_{max}$ = 100%; após L-Name,  $E_{max}$ = 96  $\pm$  2,5 %) (Tabela 12, Gráfico 17).

**Tabela 12** - Valores de  $pD_2$  e intervalo de confiança de  $pD_2$  obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica superior pelo EAC para avaliação da participação do óxido nítrico

GRUPO	$pD_2$	Intervalo de confiança para $pD_2$
EAC (Endotélio intacto)	104,2	86,89 - 124,8
EAC (Após L-NAME)	121	107,7 - 137



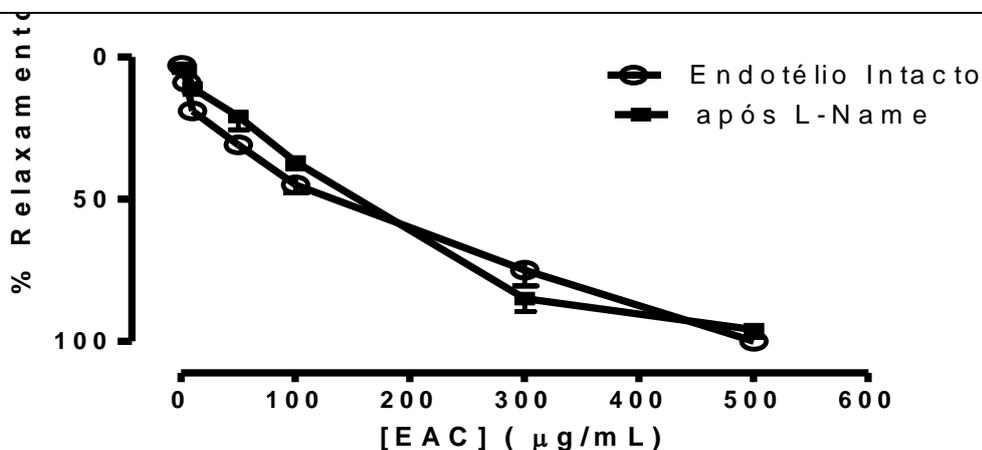
**Gráfico 17** - Curvas concentração-resposta de EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), pré-contraídos com noradrenalina (NA) na ausência (○) e na presença de L-NAME (■). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m de 6 experimentos. ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

### 12.5 Avaliação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR com endotélio intacto, pré-contraídos com NA (10  $\mu$ M), o pré-tratamento com indometacina (IND = 10  $\mu$ M) por 30 minutos, promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita caracterizando assim uma atenuação do relaxamento induzido por EAC, porém sem alteração nos valores de  $E_{max}$  (Endotélio intacto  $E_{max}$  = 100  $\pm$  0,0 %; após IND,  $E_{max}$  = 93,2  $\pm$  2,58 %) (Tabela 13, Gráfico 18).

**Tabela 13** - Valores de  $pD_2$  e intervalo de confiança de  $pD_2$  obtidos nas curvas de relaxamento de artéria mesentérica superior pelo EAC para avaliação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico

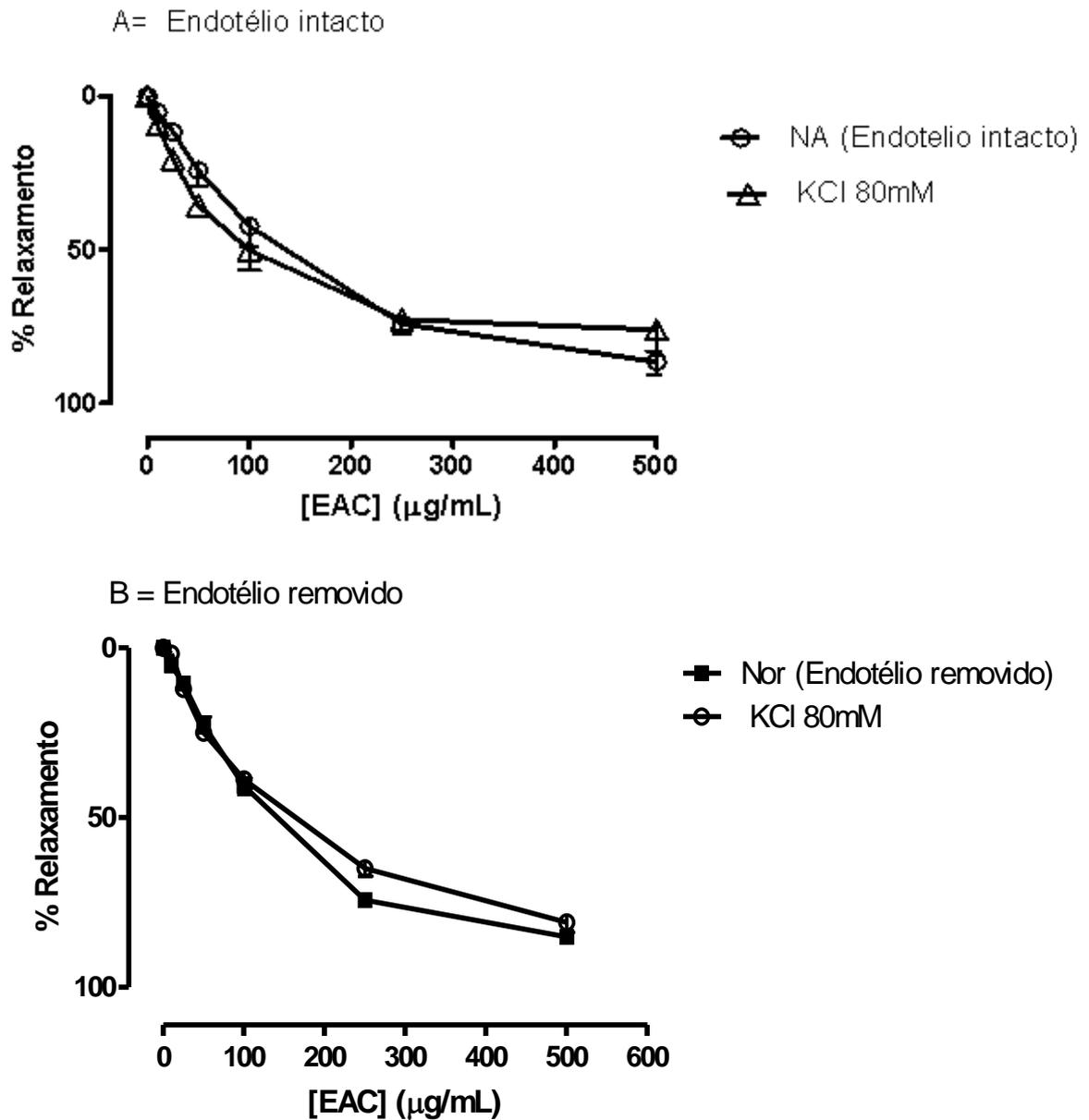
GRUPO	$pD_2$	Intervalo de confiança para $pD_2$
EAC (Endotélio intacto)	99,14	84,3 - 116,5
EAC (Após indometacina)	132,1	112,6 - 155,1



X  
**Gráfico 18** - Curvas concentração-resposta de EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR), pré-contraídos com noradrenalina (NA) na ausência (○) e na presença de Indometacina (■). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m de 6 experimentos. ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA).

**12.6 Efeito do KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR)**

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) com e sem endotélio vascular, pré-contraídos com um agente despolarizante KCl 80 mM, a adição cumulativa do EAC (10 a 500 µg/mL) promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente de concentração, com relaxamento máximo semelhante ao obtido com pré-contrações induzidas por NA: endotélio intacto (NA,  $E_{max} = 92, \pm 1,8\%$ ); (KCl 80 mM,  $E_{max} = 83 \pm 3,13$ ); endotélio removido (NA  $E_{max} = 85,2 \pm 1,82\%$ ); (KCl 80 mM,  $E_{max} = 81 \pm 2,94 \%$ ) (Gráfico 19 A e B).



**Gráfico 19** - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EAC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertensos (SHR) com endotélio intacto (A) ou removido (B) pré-contráidos com com NA(■) ou KCl 80 mM (○) . Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m de 6 experimentos. ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA)

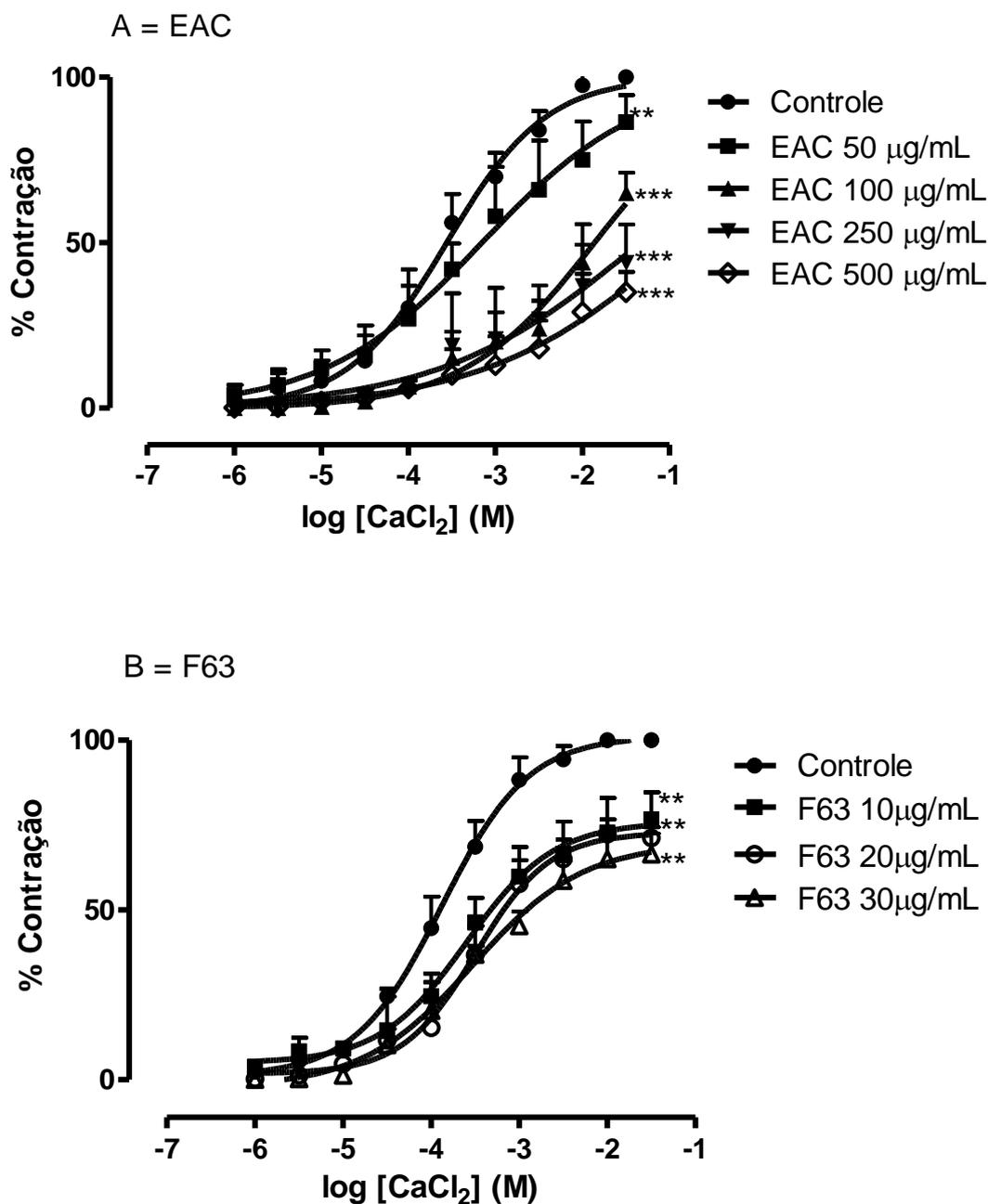
### 12.7 Avaliação do EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por $\text{CaCl}_2$ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos SHR

Em artérias mesentéricas de animais hipertensos SHR, sem endotélio, o EAC (50; 100; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) causou redução da contração máxima e deslocou  $\text{pD}_2$  da curva concentração resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$  a  $3 \times 10^{-2}$  M) para a direita em meio despolarizante nominalmente sem de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando comparada ao da curva controle (CTL) (Tabela 14, Gráfico 20A). A F63 em curvas concentração resposta promoveu uma redução do efeito máximo da contração dependente de concentração da curva concentração resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$  a  $3 \times 10^{-2}$  M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso SHR, sem endotélio funcional incubados com solução despolarizante (KCl 65,4 mM) e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ , não promovendo diferença de  $\text{pD}_2$  na presença de F63 quando comparada ao,  $\text{pD}_2$  do controle =  $3,87 \pm 0,080$  (Tabela 14, Gráfico 20 B).

**Tabela 14** - Valores de  $\text{CE}_{50}$ ,  $\text{pD}_2$ , e  $\text{E}_{\text{max}}$  obtidos para as curvas concentrações resposta de  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  na presença e na ausência de EAC e F63 em preparações de artérias mesentérica com endotélio removido de animais SHR

	$\text{CE}_{50}$ (M)	$\text{PD}_2$	$\text{Emax}(\%)$
Controle	$2,7 \times 10^{-4}$	$3,55 \pm 0,03$	100-
EAC (50 $\mu\text{g/Kg}$ )	$7,0 \times 10^{-4}$	$3,15 \pm 0,63$	$86,4 \pm 3,33^{**}$
EAC (100 $\mu\text{g/Kg}$ )	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,86 \pm 0,041^{**}$	$65 \pm 2,52^{***}$
EAC (250 $\mu\text{g/Kg}$ )	$4,66 \times 10^{-2}$	$1,33 \pm 0,15^{***}$	$44 \pm 4,69^{***}$
EAC (500 $\mu\text{g/Kg}$ )	$1,3 \times 10^{-1}$	$0,86 \pm 0,14^{***}$	$35 \pm 2,52^{***}$
Controle (F63)	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,87 \pm 0,08$	100
F63 (10 $\mu\text{g/Kg}$ )	$2,5 \times 10^{-4}$	$3,59 \pm 0,185$	$76,7 \pm 8,01^{**}$
F63 (20 $\mu\text{g/Kg}$ )	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,49 \pm 0,109$	$71,2 \pm 3,16^{**}$
F63 (30 $\mu\text{g/Kg}$ )	$2,9 \times 10^{-4}$	$3,52 \pm 0,162$	$66,4 \pm 6,09^{**}$

\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*versus a curva controle de NA, ANOVA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das médias (n=5).



**Figura 20** - Curvas concentração-resposta para CaCl<sub>2</sub> em solução despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso (SHR), desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de EAC (A) ou F63(B). Os valores estão expressos como média ± e.p.m. de 6 experimentos para cada concentração. \*Valor estatisticamente diferente do obtido na curva controle de CaCl<sub>2</sub> (\*\*p<0,01 ANOVA, *versus* controle)

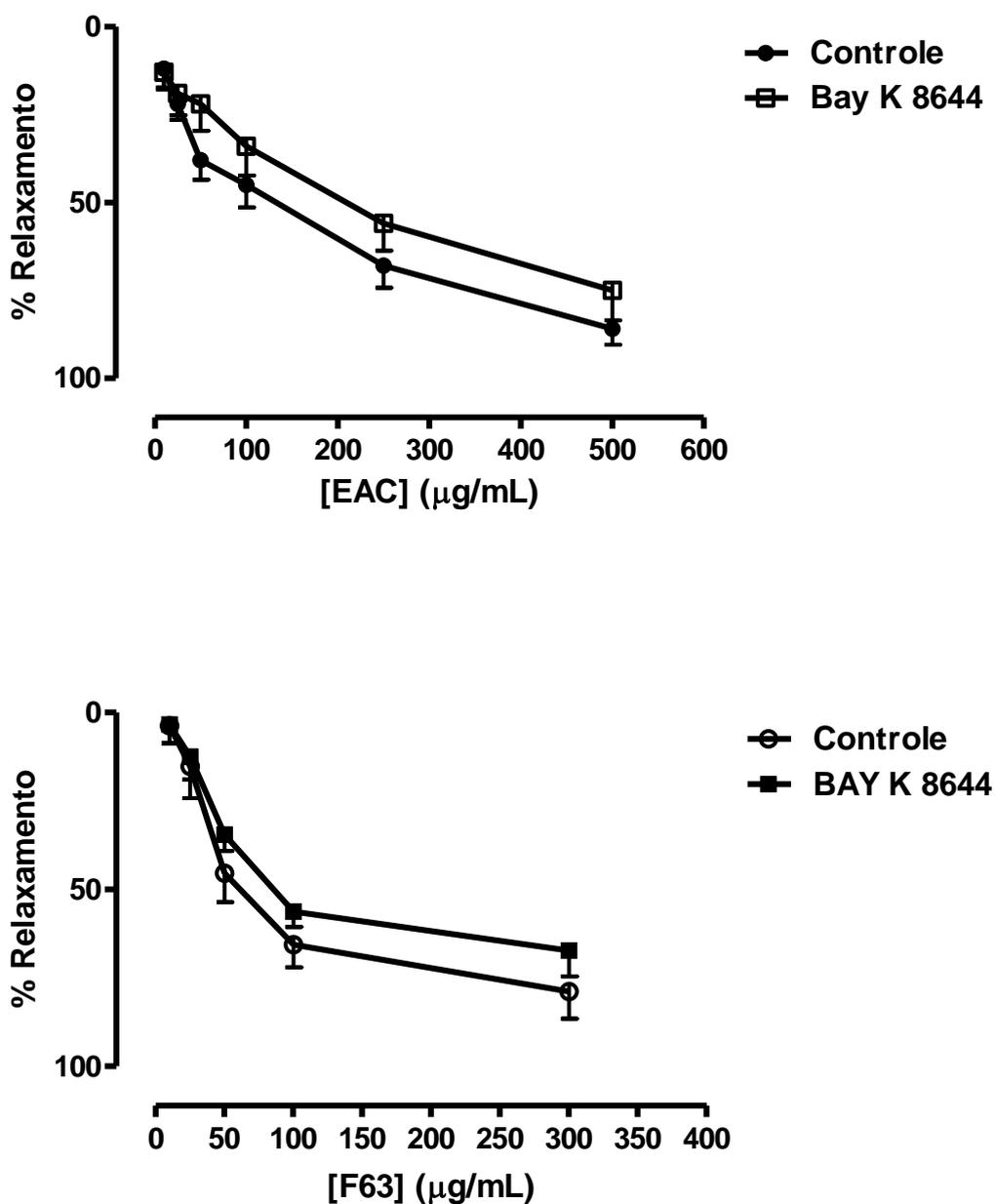
### 12.8 Efeito de EAC ou F63 sobre as contrações induzidas por S-(-) Bay K8644 em anéis sem endotélio de artéria mesentérica superior isolada de animais (SHR)

Os gráficos 21 A e B, mostram a resposta relaxante do EAC (10; 25; 50; 100; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) ou F63 (10; 25; 50; 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, sem endotélio funcional e pré-contraídos com Bay K8644 (0,1  $\mu\text{M}$ ), adicionado à cuba, 20 minutos após o meio nutritivo de Tyrode ser trocado por uma solução despolarizante de (KCl 20 mM). Como pode ser observado, o EAC ou a F63 promoveram um efeito vasorelaxante dependente de concentração nas duas condições estudadas.

**Tabela 15** - Valores de  $pD_2$  e intervalo de confiança de  $pD_2$  obtidos nas curvas concentração-resposta do EAC ou F63 sobre contrações induzidas por Bay K8644 (0,1  $\mu\text{M}$ ), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) sem endotélio vascular

GRUPO	$pD_2$	Intervalo de confiança
EAC (CTL)	97,59	84,88 - 112,2
EAC (Bay K8644)	140*	119 - 166,7
F63 (CTL)	47,83	43,04 - 53,15
F63 (Bay K8644)	51,59	46,57 - 57,15

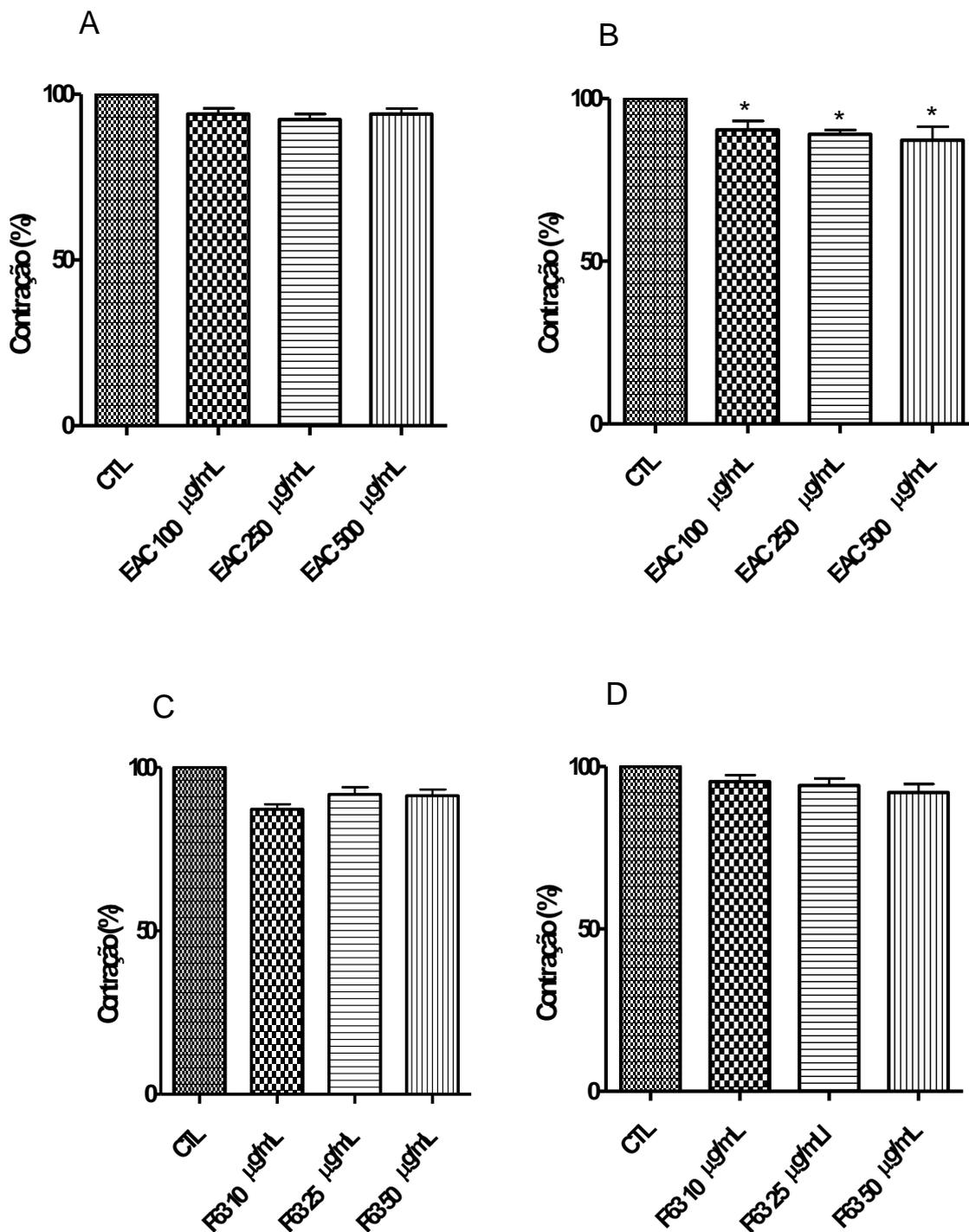
\*  $p < 0,05$ , \*versus a curva controle de NA . ANOVA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das médias (n=5).



**Figura 21** - Curvas concentração-resposta do EAC (A) ou F63 (B) sobre contrações induzidas por Bay K8644 (0,1 μM), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (SHR) sem endotélio vascular. Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos

### **12.9 Efeito do EAC ou F63 nas contrações induzidas por noradrenalina ou cafeína em anéis sem endotélio de artéria mesentérica de animais SHR**

O EAC nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mg não inibiu as contrações transientes induzidas por NA (10µM) em meio livre de Ca<sup>2+</sup> (Gráfico 22 A). Entretanto, quando tais contrações foram induzidas por cafeína (caf; 20 mM) nas mesmas condições experimentais, foi possível observar uma redução estatisticamente diferente quando comparada ao controle (Gráfico 22 A e B). As reduções ocorridas na presença do EAC (100, 250 e 500 µg/mL) foram de 9,6; 11 e 12,8% respectivamente (n = 6). Porém, nas artérias mesentérica superior isolada de ratos SHR, a F63 nas concentrações de 10, 25 e 50µg/mg não inibiu as contrações transientes induzidas por NA (10µM) ou caf( 20 mM) em meio livre de Ca<sup>2+</sup> (n =6) (Gráfico 22 C e D).



**Grafico 22** - Efeito do EAC (100, 250 e 500 µg/mL A e B) e F63 (10; 25 e 50 µg/mL C e D) nas contrações transitórias induzidas por NA (10µM) e caf (20 mM) em meio livre de Ca<sup>2+</sup>, anéis de artérias mesentéricas isoladas sem endotélios de ratos SHR. EAC = (A = noradrenalina, B = cafeína) e F63 (C = noradrenalina, D= cafeína)

*Discussão*

### 13 DISCUSSÃO

O pariri, *Arrabidaea chica* Verlot, é uma espécie popularmente empregada no Brasil e em outros países americanos como adstringente, antiinflamatório e antianêmico (ALBUQUERQUE, 1989; COSTA; LIMA, 1989). Além disso, No Maranhão é usualmente empregada pela população no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (RÊGO, 1995).

A utilização de plantas medicinais constitui uma prática generalizada na terapêutica popular como uma forma de suprir às necessidades de assistência primária a saúde (ELIZABETSKY, 1987), bem como, é uma alternativa de integrar a cultura e a ciência, fortalecendo os princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), especialmente quanto à integralidade e a participação popular (BRASIL, 2001).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de respaldar cientificamente a indicação popular do efeito anti-hipertensivo atribuído a espécie *Arrabidaea chica* Verlot, por meio de um tratamento crônico, por via oral a ratos espontaneamente hipertensos (SHR), bem como, determinar o(s) possível (eis) mecanismo(s) moleculares envolvidos neste efeito, ao nível da musculatura vascular.

O principal achado deste estudo foi que o EAC induziu um efeito anti-hipertensivo em ratos hipertensos SHR não anestesiados (item 11.2). O efeito anti-hipertensivo evidenciado foi provavelmente devido a uma diminuição da resistência vascular periférica, que possivelmente envolve a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais para  $Ca^{2+}$  do tipo L operados por voltagem.

No processo de validação do uso das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot como medicinal, foi realizada a análise toxicológica preliminar, por meio da determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos dos animais, após administração aguda e crônica do EAC.

Para a análise hematológica foram avaliados o número de eritrócitos, a dosagem de hemoglobina, o hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) e a contagem de leucócitos. Porém, não foi observada alteração em nenhum desses parâmetros avaliados.

O grupo tratado com EAC, na dose de 0,25 g/Kg, durante 90 dias (Tabela 5) apresentou neutrocitopenia e elevação do VCM quando comparado ao controle. Segundo Failace (1995) não se deve levar em consideração uma neutrocitopenia isolada, com eritrócitos e plaquetas normais, sem antes confirmá-las com hemogramas repetidos, o que não foi realizado neste trabalho. O VCM

elevado pode estar relacionado à presença de ferro assimilável e cianocobalamina na espécie *Arrabidaea chica* Verlot (KALIL FILHO et al., 2000), que são fatores da eritropoiese. Este processo pode gerar uma discreta macrocitose, embora não tenham sido observadas quaisquer alterações qualitativas nas células sanguíneas, e com isso, elevar o VCM (RAVEL, 1997).

Estes dados levam a sugerir que pequenas alterações isoladas, sem correlação entre os resultados da análise hematológica, poderiam ser atribuídas a um artefato laboratorial ao invés do tratamento com o EAC. O método manual para a contagem de leucócitos, que foi realizado neste trabalho, é capaz de produzir erros de execução que variam de 7 a 14% ou mais (RAVEL, 1997).

As análises bioquímicas do sangue dos animais, após 90 dias de tratamento com o EAC (0,25 ou 0,5 g/Kg) não mostraram alterações significativas em seus valores, quando comparados ao controle (Tabela 5).

Neste trabalho a avaliação da toxicidade aguda do EAC das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot foi realizada através da determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), em camundongos e ratos.

Segundo Cerutti et al. (2000), a determinação da toxicidade de uma substância é extremamente importante, principalmente considerando o uso indevido de medicamentos pela população. Um grande número de plantas tem sido utilizada pela população em razão dos seus efeitos terapêuticos. A grande maioria dos estudos realizados com espécies brasileiras aborda aspectos botânicos e químicos, porém, poucos estudos têm avaliado o potencial tóxico dos vegetais.

Os testes de toxicidade aguda têm por finalidade definir a amplitude da dosagem letal de uma droga administrada em dose única ou em algumas doses intercaladas por curtos intervalos de tempo. Estes testes fazem parte da triagem farmacológica inicial, durante a qual a ação da droga sobre importantes funções é observada (SILVA, 2002).

Os camundongos tratados com o EAC de *Arrabidaea chica* Verlot, por via intraperitoneal (i.p.), mesmo na maior dose (2,0 g/ Kg) não ocasionou óbito dos animais, apesar de que, a via i.p. apresenta maior absorção, devido à vascularização local e a ausência do metabolismo hepático de primeira passagem. Ainda nesta espécie animal, não foram observadas alterações comportamentais, segundo critérios de Malone (1997), bem como alterações macroscópicas dos órgãos e viscerais e no desenvolvimento ponderal dos animais (ITEM 10.1).

Nos grupos de ratos tratados por via oral (v.o) com o EAC não houve óbito, mesmo na dose mais elevada do EAC (5,0 g/Kg). Considerando-se que a população faz uso do chá das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot por via oral, é interessante o fato do EAC não provocar a morte dos animais tratados por esta via, em doses até mais elevadas do que utilizadas popularmente. Entretanto sabe-se que a DL<sub>50</sub> como parâmetro fundamental para a definição de toxicidade química é limitado, uma vez que, este teste mede apenas a toxicidade aguda produzida por uma dose única, e não a toxicidade em longo prazo e não mede as reações idiossincráticas (RANG; DALE; RITTER, 2001).

O comportamento dos animais, avaliado segundo os critérios estabelecidos por Malone (1997), mostrou-se normal na maioria das doses, semelhante ao dos animais do grupo controle, durante o estudo de toxicidade aguda. Na análise do peso corporal e anatomo-morfológica dos órgãos internos, observou-se que em todas as doses utilizadas do EAC independentemente da via de administração utilizada, não houve alteração em relação ao grupo controle durante os 14 dias de observação (Gráfico 4). O mesmo foi evidenciado no consumo diário de ração (Gráfico 5) e no consumo de água (Gráfico 6). A partir destes dados pode-se sugerir que o EAC de *Arrabidaea chica* Verlot não produziu toxicidade aguda em camundongos e ratos, levando-se em consideração os parâmetros fisiológicos gerais observados.

Os ratos utilizados na análise da toxicidade aguda foram submetidos à avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos após 14 dias de observação. Para avaliação dos parâmetros hematológicos foram considerados o número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e os índices eritrocitários. Na avaliação da toxicidade aguda ocorreu alteração dos parâmetros hematológicos na dose de 1,0 g/Kg (Tabela 3), onde houve aumento da dosagem de hemoglobina. Os demais parâmetros hematológicos não apresentam alterações significativas em relação ao controle. A hemoglobina contida nos eritrócitos tem papel importante no transporte do O<sub>2</sub> dos pulmões para os tecidos e do CO<sub>2</sub> recolhido dos capilares teciduais para os pulmões (LORENZI et al., 2003). As folhas de *Arrabidaea chica* Verlot apresentam em sua composição química, ferro assimilável e cianocobalamina (KALIL FILHO et al., 2000), que são fatores nutricionais importantes para a eritropoese, fato que justifica a sua utilização tradicional como antianêmico e que, provavelmente é responsável pelo aumento na concentração de hemoglobina detectada neste estudo.

Na análise dos parâmetros bioquímicos sanguíneos dos ratos após observação por 14 dias administração aguda do EAC de *Arrabidaea chica*, detectou-se um aumento significativo dos níveis de uréia nas doses de 0,5, 1,0 e 5,0 g/Kg (Tabela 4).

A uréia é produzida no fígado e é excretada pelos rins. Quando o rim é incapaz de depurar suficientemente a uréia, ela se acumula no sangue. Todavia, os níveis elevados de uréia não são específicos de doença renal intrínseca. Algumas drogas são capazes de gerar indução enzimática e, conseqüentemente, aumentar a toxicidade. A literatura científica sugere que, as dosagens bioquímicas de creatinina e uréia com aumento em animais submetidos a tratamento com drogas vegetais, indicando que o efeito da droga interfere no metabolismo e funcionamento do rim, entretanto, essa conclusão não é um consenso geral (BALIGA et al., 2004).

As concentrações de colesterol HDL aumentaram significativamente nas doses de 0,5, 1,0 e 5,0 g/Kg. Os níveis de HDL elevado promovem menor risco de doenças coronarianas (LIMA et al., 1992). Os triglicérides não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle.

Transaminases (ALT e AST) são bons índices para avaliação de alterações hepáticas (VIJAYIAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHDAMANDAM, 2000). No presente trabalho, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) não apresentaram alterações significativas em relação ao controle na

avaliação aguda. No entanto, os níveis de aspartato aminotransferase (AST) apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle, com aumento dos seus níveis na dose de 2,0 e 3,5 g/Kg. AST é uma enzima encontrada no citoplasma e mitocôndria de muitas células, principalmente no músculo cardíaco, fígado e músculo esquelético; sua concentração está diminuída no rim, pâncreas e eritrócitos. O aumento dos níveis das aminotransferases no plasma de animais tratados com EAC pode ser devido à liberação de enzimas das células do órgão alterado ou da mudança da permeabilidade das células (REBECCA et al., 2002).

O extrato hidroalcoólico (EAC) das folhas de *Arrabidaea chica* promoveu diminuição significativa dos níveis séricos de glicose nas doses de 2,0 e 3,5 g/Kg. Esses resultados corroboram a indicação popular dessa espécie vegetal no tratamento do *diabetes mellitus*, mesmo neste contexto, onde as avaliações foram realizadas em animais normoglicêmicos.

Ressaltar-se que a interpretação dos resultados das análises laboratoriais é muito mais complexa que a sua simples comparação com os valores de referência, classificando os testes como normais ou anormais, de acordo com os limites desta referência e, a seguir, comparando os resultados com padrões que indicam a presença de certas doenças (RAVEL, 1997).

Quando nos reportamos aos dados de referência em animais de laboratório, a análise e a interpretação dos resultados são mais difícil ainda, pois não há na literatura científica informações consistentes sobre valores padrões para análises laboratoriais na espécie animal utilizada neste trabalho. Sendo assim, os resultados obtidos com o tratamento dos animais com o EAC de *Arrabidaea chica* Verlot foram comparados por métodos estatísticos com os dados obtidos nos grupos de animais controle, conforme metodologias utilizadas por Rebecca et al. (2002), Vidal (2003), Owoyele (2004), Nijayalakshmi et al. (2000), García-González et al. (2002), que avaliaram a toxicidade de plantas em animais e utilizaram os seus próprios grupos controles como referência de normalidade na análise dos resultados.

De posse destes dados de avaliação de toxicidade aguda, partiu-se para avaliar a atividade do EAC sobre os parâmetros cardiovasculares, em experimentos utilizando animais não anestesiados, para minimizar as influências da anestesia (FLUCKIGER et al., 1985). A anestesia altera os valores de pressão arterial e frequência cardíaca por modificar o funcionamento dos principais sistemas básicos de regulação da pressão arterial, tais como, o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo, além de deprimir as sinapses nervosas e conseqüentemente comprometer a responsividade autonômica (BECK; ZIMPFER; RABERGER, 1982; DORWARD et al., 1990).

Durante o processo de verificação do efeito anti-hipertensivo das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot, foi realizada a análise de peso ponderal e observou-se

que o uso crônico do EAC (100; 250 e 500mg/Kg/dia; v.o) por 60 dias não causou alteração significativa em relação ao grupo controle, tanto em grupos de ratos Normotensos, quanto em grupos de ratos hipertensos (SHR) (Gráfico 7 A e B).

A análise dos parâmetros bioquímicos de ratos hipertensos (SHR) tratados durante 60 dias com o EAC, mostrou algumas alterações quando comparado ao grupo controle. O EAC promoveu diminuição dos níveis de glicose nas doses 250 e 500 mg, em animais hipertensos (SHR), entretanto, normoglicêmico. Este resultado corrobora com a indicação popular dessa espécie vegetal na terapêutica do *diabetes mellitus* e ratifica os dados encontrados quando este parâmetro foi analisado durante a administração aguda em ratos normotensos e normoglicêmicos. As demais dosagens de analitos realizadas, não apresentaram alterações significativas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 6).

Diante desta ausência de toxicidade evidenciada através dos resultados encontrados tanto em tratamento agudo quanto crônico, buscou-se avaliar a redução da pressão arterial média decorrente da administração diária de EAC (100; 250 e 500 mg/Kg/dia/v.o) a ratos normotensos e hipertensos (SHR) dividido em grupos de acordo com a dose ministrada de EAC (ITEM11.2 e 11.3). Observou-se uma redução da pressão arterial que possivelmente tenha ocorrido em decorrência da diminuição da resistência periférica (Gráfico 9 e 10). No grupo de animais hipertensos SHR, esta queda de pressão arterial foi acompanhada de uma diminuição da frequência cardíaca, que pode ter sido ocasionada por uma diminuição do débito cardíaco, pois, a hipertensão do SHR adulto está associada com um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (JUDY et al., 1976; POTTS; MCKEOWN; SHOUKAS, 1998).

Neste modelo de hipertensão essencial experimental tem sido demonstrado que as pequenas artérias, arteríolas e, possivelmente, os esfíncteres pré-capilares sejam os principais responsáveis pelo aumento da resistência vascular periférica (TRIPPODO; FROLICH, 1981). Os estudos realizados demonstram que este aumento da resistência periférica ocorra através de processos ativos e estruturais. Por exemplo: alterações da geometria vascular (FOLKOW; SVANBORG, 1993; HEAD, 1994), alterações da membrana celular da musculatura lisa vascular (OVERBECK; JOHSTON, 1972) ou diminuição da densidade arteriolar da musculatura esquelética (PREWITT; CHEN; DOWELL, 1982). Foi demonstrado

ainda um aumento da resistência venosa (GREENBERG; BOHR, 1975) possivelmente relacionada ao aumento da atividade simpática (LUNDIN; RICKSTEIN; THOREN, 1984; FROHLIC; PFEIFER, 1975; SANJA et al., 2006) e/ou hipertrofia venular (GREENBERG; BOHR, 1975).

A administração do EAC durante oito semanas reduziu a pressão arterial de animais normotensos a partir da quinta semana em 7,5 e 18,73% em relação ao controle (114,6 mmHg, n= 10) nas doses de 0,1 e 0,25 g/Kg respectivamente. A dose 0,5 g/Kg ( n=10) produziu redução de 19% durante a terceira semana, após o que apresentou uma cinética semelhante a dose de 0,25 g/Kg. Ao atingir as 8 semanas de tratamento com EAC (0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg) a pressão sanguínea apresentou-se reduzida comparada ao grupo controle (115,8 mmHg; n= 10) em 17,47%; 21,67% e 24,67% respectivamente. (Gráfico 9). O EAC nas doses utilizadas não causou alteração da frequência cardíaca dos animais normotensos quando comparada ao grupo controle (CTL) (Gráfico 10). Este mesmo tratamento administrado a animais hipertensos SHR, apresentou um padrão de resposta semelhante ao encontrado no tratamento crônico de animais normotensos e, ao final do tratamento, os animais hipertensos SHR atingiram redução da pressão sanguínea de 38,2% e 49,6 %, nas doses de 0,1 e 0,25 mg/kg respectivamente. A dose de 0,5 g/kg (n=10) causou uma redução nos níveis tensionais de 34,4% a partir da quarta semana apresentando uma cinética linear e constante desde a sexta semana até a oitava semana de tratamento, atingindo um nível de redução de 54,4%, quando comparado ao grupo controle.(Gráfico 11). A frequência cardíaca acompanhou a queda da pressão arterial sendo reduzida em 13,4%; 15,35% e 15,25% ao final do tratamento com EAC 0,1; 0,25 e 0,5 g/Kg, respectivamente (Gráfico 12).

A semelhança entre a hipertensão humana e a observada nos ratos SHR, inclui: a) predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica; b) aumento da resistência periférica total sem expansão do volume e c) igual resposta a drogas (TRIPPODO; FROLICH, 1981).

Sendo assim, neste estudo foram realizados experimentos *in vitro* utilizando a artéria mesentérica superior por se apresentar como vaso de resistência e está mais amplamente implicado na regulação do débito sanguíneo e da pressão capilar além de refletir melhor as evoluções da resistência periférica global (MULVANY; AALKJAER, 1990; AHUJA; ROBERTSON; BALL, 2009).

Existem várias evidências de que o sistema nervoso central está envolvido no desenvolvimento e manutenção de diferentes formas de hipertensão arterial (CAMPOS JR. et al., 2001).

O sistema nervoso autônomo simpático está envolvido na regulação homeostática de uma grande variedade de funções centrais e periféricas, entre as quais se podem citar a frequência cardíaca, força e contração cardíaca, tônus vasomotor e pressão arterial. Em virtude das diversas funções que são mediadas ou modificadas pelo sistema nervoso simpático, os agentes que mimetizam ou alteram a sua atividade são úteis no tratamento de varias enfermidades clínicas, incluindo a hipertensão arterial (RANG; DALE; RITTER, 2001; LAMARRE- CLICHÉ, 2008).

A resposta final de um órgão alvo as aminas simpatomiméticas é determinado não somente pelos efeitos diretos da droga, mas também, pelas adaptações homeostáticas reflexas do organismo. Um dos efeitos mais notáveis de muitas aminas simpatomiméticas é a elevação da pressão arterial decorrente da estimulação dos adrenoceptores nos leitos vasculares (HOFFMAN; LEFKOWITZ, 1996).

Para avaliar o efeito do EAC sobre estes receptores no músculo liso vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta para noradrenalina em artéria mesentérica superior de animais tratados cronicamente por via oral com EAC (100, 250 e 500mg/Kg/dia). Foi possível observar uma redução do efeito máximo e um deslocamento da EC50 paralelamente a direita (Tabela 8, Gráfico 13A e B) em ambos os grupos de animais, normotensos e os hipertensos tratados com EAC. Considerando-se que a via oral é protegida por barreiras naturais gastrointestinais, que dificultam e prolongam a absorção de substâncias, os resultados do tratamento crônico foram promissores, pois, a administração crônica do EAC por via oral provocou redução da pressão arterial de ratos normotensos e hipertenso e interferiu na resposta reativa da musculatura vascular das artérias mesentéricas oriundas destes animais tratados, diminuindo a reatividade das mesmas na presença de noradrenalina.

Outro protocolo experimental com o objetivo de avaliar a resposta reativa do músculo liso vascular foi realizado, buscando-se a interação direta do EAC no receptor alfa-adrenérgico. Utilizou-se para isso o modelo *in vitro* de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR na presença do agonista alfa-adrenérgico noradrenalina, em concentrações cumulativas crescentes, na ausência ou presença

do EAC (ITEM 12.1). O tratamento com EAC nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, em seguimentos de artéria mesentérica desprovida de endotélio promoveram deslocamento à direita nas concentrações 250 e 500 µg/mL e redução do efeito máximo nas três concentrações utilizadas. (Tabela 9). Este mesmo protocolo foi realizado com as mesmas concentrações do EAC, porém em artéria mesentérica com endotélio funcional e também foi possível observar redução do efeito máximo nas concentrações utilizadas, bem como deslocamento da curva à direita nas concentrações de 100 e 500 µg/mL.

Em artéria mesentérica superior isolada a F63 nas concentrações de 10, 20 e 30 µg/mL demonstraram um antagonismo do tipo competitivo e dependente da concentração utilizada. Estes resultados em conjunto, sugerem que o EAC e a F63 possuem substância(s) em sua composição capaz(es) de inibir a ativação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ou interferir com as vias de sinalizações intra-celular.

As contrações induzidas por noradrenalina são decorrentes em parte da liberação de cálcio dos estoques intracelulares e em parte devido o influxo intracelular de cálcio, dentro da célula, após a ativação de receptores alfa do tipo 1( $\alpha_1$ ) (NICASIO; MECKES, 2005).

Está estabelecido na literatura que a noradrenalina promove o aumento o tônus vascular pela estimulação do receptor e elevação do influxo de cálcio (VASCONCELOS et al., 2008), entretanto, este efeito vasoconstrictor de agonistas  $\alpha_1$  adrenérgico podem ser modulados pelos fatores relaxantes derivado do endotélio vascular, especialmente o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (CERONI et al., 2007).

O NO é um gás formado a partir do aminoácido L-arginina, reação esta catalisada pela sintase do NO, uma enzima dependente de  $Ca^{2+}$ . Devido a sua natureza, o NO difunde-se facilmente através das células da musculatura lisa adjacente, o que estimula a ciclase da guanilil solúvel (CGs) (COHEN; VANNHOUTE, 1995), metabolizando o GTP e transformando-o em GMPc. O GMPc, por sua vez, ativa a PKG, resultando em: estimulação da bomba de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático; aceleração da recaptção de  $Ca^{2+}$  para os estoques intracelulares (CORNWELL et al., 1991); abertura dos canais para  $K^+$ ; fechamento dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem e fosforilação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), inativando-a. Estes eventos em conjunto causam uma redução da

concentração de  $[Ca^{2+}]_i$  e vasorelaxamento, diminuindo assim a resistência periférica (FURCHGOTT, 1983; VANHOUTE; BOULANGER, 1995).

A literatura científica mostra que a inibição crônica da sintase de NO induz um aumento na pressão arterial que é dependente da elevação da resistência periférica total (DANANBERG; SIDER; GREKIN, 1993; PRIVIERO et al., 2007). Alguns estudos sugerem que a vasoconstrição exija que o sistema nervoso simpático esteja intacto (TODA; KITAMURA; OKAMURA, 1993) e é mediada pelo aumento do tônus adrenérgico (OUIU et al., 1994), que pode ser causado pelo aumento ou liberação de catecolaminas ou pelo aumento da sensibilidade do músculo liso vascular às catecolaminas. Com base nessa teoria torna-se possível hipotetizar que a diminuição da pressão arterial induzida pelo EAC possa ser devido um efeito relaxante decorrente da liberação de NO do endotélio vascular e conseqüente diminuição da resistência vascular periférica. Para verificar esta possibilidade, foram realizados experimentos *in vitro* com o EAC buscando-se avaliar o efeito modulatório do óxido nítrico. Foram obtidas curvas concentração resposta do EAC na presença de bloqueador da enzima sintase de óxido nítrico (L-NAME) (Gráfico 17). Nestes experimentos foi observado que a resposta vasorelaxante do EAC (1; 5; 10; 50; 100; 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ) não foi alterada, pelo L-NAME, sugerindo que o NO não está envolvido na ação do EAC em artérias mesentéricas de ratos.

Negri e Camargo (2003) demonstraram em extrato diclorometano das folhas de *Arrabidaea chica*, a capacidade de seqüestrar radicais livres, com base neste achado, pode-se hipotetizar que o EAC de *Arrabidaea chica* Verlot, poderia prevenir a reação do NO com radicais livres, aumentando a disponibilidade deste mediador (MARK; WEGLIKI, 2004).

Outra via muito importante para o vasorelaxamento e conseqüente regulação do tônus é a que envolve a produção e liberação de metabólitos da via da enzima cicloxigenase (COX). A COX é uma enzima que catalisa a reação de metabolismo do ácido araquidônico em metabólitos, dentre eles a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) que são prostanóides de origem endotelial e também não endotelial que pode ter ação direta sobre o músculo vascular e induzir vasodilatação (MONCADA; VANE, 1978; TRIGGLE, 1994). A prostaciclina formada no endotélio vascular se difunde até as células musculares onde promove a ativação dos receptores IP que estão acoplados a proteína  $G_S$  (COLEMAN et al., 1994), este acoplamento induz a ativação da enzima quinase A (PKA) levando um aumento dos níveis de AMPc no

citossol. O aumento do AMPc gera ativação de uma proteína cinase dependendo de AMPc-PKA. Esta proteína quando ativada promove fosforilação da bomba do retículo sarcoplasmático, aumentando a recaptação de cálcio do citossol para os estoques promovendo a abertura e canais para potássio, o fechamento de canais para cálcio na membrana e a inibição da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Estas seqüências de fosforilação levam a uma diminuição das concentrações de cálcio na célula muscular acarretando em uma diminuição do tônus (FROLICH, 1990).

Para avaliar a participação da COX na resposta relaxante induzida por EAC, foram obtidas curvas concentração–efeito do EAC na presença de indometacina, um inibidor não seletivo desta enzima (CLARK; FUCHS, 1997). E nestas condições, a resposta vasorelaxante de EAC não foi afetada, excluindo o envolvimento da prostaciclina e de outros metabólitos do ácido araquidônico nestas ação do EAC de *A. chica* (Grafico 18).

Existem evidências que muitas substâncias derivada de plantas medicinais alteram o metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$  nas células (SENESCH et al., 1993).

A entrada dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  no citossol é uma etapa fundamental de vários processos intracelulares, tais como: contração e relaxamento muscular, secreção, crescimento e diferenciação celular, regulação da expressão gênica, metabolismo celular. O tônus vascular é controlado pela concentração de cálcio citoplasmático  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , sendo que a contração das células do músculo liso vascular inicia com o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Isto pode ocorrer pelo aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor, ou pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques do retículo sarcoplasmático (LAGAUD et al., 1999; ALLEN; WALSH, 1994).

O KCl induz contração em músculo liso através da ativação de canais para cálcio dependentes voltagem (Cav) promovendo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e subsequente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (GURNEY, 1994), enquanto a vasoconstricção induzida por NA é devida a estimulação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos acoplados a proteína G, com consequente aumento dos níveis de  $\text{IP}_3$  e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares e também pelo influxo da via ROCC's (Canais para cálcio operados por receptor) (PÉREZ-VISCAINO, 1999).

Vários subtipos de canais para  $\text{K}^+$  já foram caracterizado na musculatura lisa vascular, no entanto, apenas quatro parecem estar envolvidos na regulação do tônus vascular: os sensíveis ao ATP (KATP), os sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  de grande

condutância (BKCa) e de pequena condutância (SKCa) e os dependentes de voltagem (Kv) (ADEAGBO, 1999). Os canais para K<sup>+</sup> que estão envolvidos nos efeitos induzidos por FDREs tem sido bem estudados, mas ainda existem controvérsias com relação ao tipo de canal e a via de ativação. Um grande número de estudos tem mostrado que os relaxamentos induzidos por FRDEs (NO ou PGI<sub>2</sub>) são inibidos por bloqueadores de canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de grande condutância (BKCa), como TEA e caribidotoxina (CAMPBELL et al., 1993; GARLAND et al., 1995; JACKSON, 2005).

Os canais para potássio ativados pelo cálcio (KCa) foram os primeiros membros na família a serem identificados (MARLY, 1981). A ativação destes canais ocorre em decorrência da elevação dos níveis citósolicos de Ca<sup>2+</sup>, quanto pela despolarização de membrana, surpreendentemente, estes canais podem abrir mesmo na ausência de cálcio (PALLOTA, 1985). Existem três tipos de canais para potássio sensíveis ao cálcio, eles variam de denominação de acordo com sua sensibilidade; canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BKCa), canais para potássio sensíveis ao cálcio de condutância intermediária (IKCa) e canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância (SKCa) (JACKSON, 2005).

A musculatura lisa vascular utiliza Ca<sup>2+</sup>, como um mecanismo de acionamento no processo de contração. O influxo de Ca<sup>2+</sup> através de Ca<sub>v</sub> da membrana plasmática e liberação de cálcio dos estoques intracelulares são as principais fontes para a ativação do mecanismo de contração (JACKSON, 2000). O aumento das concentrações extracelulares de potássio gera uma despolarização de membrana promovendo a ativação dos canais Ca<sub>v</sub> ocasionando o influxo de cálcio gerando uma contração (REMBOLD, 1996).

As drogas vasodilatadoras, no geral, apresentam a propriedade de abrirem os canais de K<sup>+</sup>, este aumento moderado na concentração extracelular de K<sup>+</sup> (< 40mM) inibe efetivamente a contração, porém níveis mais altos de concentrações de K<sup>+</sup>, não ocorre o efluxo deste íon e conseqüentemente não acontece a hiperpolarização. Esta propriedade permite estabelecer distinção entre os abridores de canais para K<sup>+</sup> e os antagonistas de canais para Ca<sup>2+</sup>, que demonstram comportamento diferenciado nesta circunstancia (GURNEY, 1994).

Sob a hipótese de que o efeito vasorelaxante do EAC pudesse estar sendo devido a uma atividade bloqueadora sobre os canais de Ca<sup>2+</sup> ou por

hiperpolarização, foram realizados experimentos tendo o KCl como agente despolarizante. Esses experimentos foram realizados em artéria mesentérica isolada de rato SHR e, o relaxamento induzido pelo EAC sobre as contrações induzidas pela solução de KCl (80mM) foram significativamente potentes, quando comparadas ao relaxamento da contração induzida por NA (Gráfico 19).

Os bloqueadores de VOCC's (canais para cálcio operados por voltagem) são mais potentes em inibir as contrações induzidas por altas concentrações extracelulares de  $K^+$  (KCl 80mM) do que as induzidas por NA ou aquelas induzidas por concentrações moderadas de  $K^+$  (KCl 30mM) extracelular (SAKATA; KARAKI, 1991).

O conjunto destes resultados permite sugerir que o EAC apresenta características de um bloqueador de VOCC's reforçando hipótese de que a resposta hipotensora observada no tratamento crônico possa ser por inibição do influxo  $Ca^{2+}$ , através de bloqueio ao VOCC's no músculo liso vascular.

Para ratificar a hipótese de que o EAC atuando por bloqueio de VOCC's, realizou-se experimentos de curvas concentrações-resposta cumulativa de  $CaCl_2$ . As curvas cumulativas ao  $CaCl_2$  em meio nominalmente sem cálcio foram deslocadas para a direita na presença do EAC (50; 100; 250 e 500  $\mu$ g/mL) com depleção da resposta máxima, sugerindo um antagonismo do tipo não competitivo (Gráfico 20 A). Entretanto na presença da F63 (10, 25 e 30  $\mu$ g/mL) só foi possível observar diminuição da contração máxima, porém sem deslocamento da curva (Gráfico 20 B).

Em seguida, buscou-se analisar a possibilidade deste efeito vasorelaxante ser consequência da inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  por ação do EAC e F63 sobre os canais  $Ca_vL$ . Com esta finalidade foram realizados experimentos na presença de BayK 8644 (0,1 $\mu$ M) que é um ativador de  $Ca_vL$  de ação direta na subunidade  $\alpha_1$  do canal de  $Ca^{2+}$  do tipo L (SPEDDING; PAOLETTI, 1992; BARRÚS; REVIRIEGO; MARÍN, 1996). Conforme pode ser visto nos gráficos 21A e B, respectivamente, o EAC e a F63 causaram relaxamento em contrações induzidas por NA (10 $\mu$ M) e na presença de Bay K8644. Estes resultados são de extrema importância, visto que, confirma a hipótese de que o EAC e F63 promove o bloqueio de canais  $Ca_vL$  (Gráficos 21 A e B).

A liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares tem um papel importante na atividade celular, incluindo, o acoplamento excitação-contração no músculo liso (FLYNN et al., 2001).

Com a finalidade de investigar se o EAC poderia está exercendo seus efeitos sobre a liberação de cálcio dos estoques intracelulares de cálcio sensível ao  $IP_3$  (fosfoinositol trifosfato) e à cafeína (Caf), foram realizados experimentos em que seguimentos de artéria de ratos hipertensos SHR, eram contraídos com NA ou Caf na ausência e na presença do EAC em meio livre de  $Ca^{2+}$ . A cafeína tem sido referida como um instrumento farmacológico padrão para demonstrar a ativação do receptor rianodina na liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares (SMHITH; HUTCHINS, 1989) e a fenilefrina, um agonista  $\alpha$ -adrenérgico, que induz rápido e transiente aumento na formação de  $IP_3$  no músculo liso de artéria mesentérica de rato (LANGLANDS; DIAMOND, 1990), o qual libera cálcio dos estoques intracelulares de cálcio sensível ao  $IP_3$  (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Sob estas condições o EAC não inibiu as contrações induzidas por NA, porém, reduziu as contrações induzidas por cafeína ( EAC 100; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) sugerindo que o EAC não interfere com a mobilização de cálcio do estoque sensível ao  $IP_3$ , mas interfere no estoque sensível a cafeína (Gráfico 22 A e B). Entretanto, este mesmo protocolo utilizando a F63, não foi possível observar nenhuma interferência desta fração com estes estoques de cálcio (Gráfico 22 C e D).

Por fim, estes resultados em conjunto sugerem que o EAC de *Arrabidaea chica* produz efeito anti-hipertensivo e vasorelaxante em artéria mesentérica de rato mediado por uma via independente do endotélio, e que parece envolver o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  na membrana citoplasmática e atividade sobre os receptores rianodínicos. Além disso, sugerem que a F63, fração obtida a partir do EAC de *Arrabidaea chica*, possui componentes que também interferem com influxo de  $Ca^{2+}$ , mas não apresentam atividade nos receptores rianodínicos.

*Conclusão*

## 14 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através de uma abordagem fitoquímica preliminar e farmacológica *in vivo* e *in vitro* do EAC e fração F63 de *Arrabidaea chica* em ratos SHR demonstram que:

- a) O EAC possui na sua composição taninos flobafênicos, em quantidades moderada e flavononóis, flavonononas e compostos esteroidais em alta quantidade;
- b) A fração F63 apresenta sinais característicos para flavonóides glicosilados;
- c) A administração aguda de *Arrabidaea chica* Verlot não interfere no aumento de peso dos camundongos bem como não produziu morte e nem alterações macroscópicas dos órgãos vitais em camundongos e ratos quando administrado em tratamento agudo por via intraperitoneal e por via oral, respectivamente;
- d) A administração aguda do EAC reduz os níveis séricos de glicose e aumenta os níveis séricos de AST, Uréia e Colestrel – HDL;
- e) O EAC induziu diminuição da pressão arterial sistólica em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR);
- f) O EAC e a F63 apresentaram efeito inibidor da sinalização de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos;
- g) O EAC e a F63 induziram relaxamento das artérias mesentéricas com e sem endotélio funcional,
- h) O efeito relaxante do EAC e F63 não parece depender do endotélio e nem envolver a via NO-sintase e metabolitos derivados da cicloxigenase;
- i) O EAC e a F63 inibiram o influxo de cálcio através dos  $Ca_vL$ ;
- j) O EAC mostrou ter uma atividade inibitória sobre os receptores rianodínicos;

Em conjunto estes resultados demonstram que a administração crônica do EAC a ratos normotensos e hipertensos SHR induziu um efeito hipotensor com ausência de efeitos toxicológicos dentro dos parâmetros analisados. Este efeito hipotensor provavelmente está relacionado à inibição da disponibilidade de cálcio intracelular.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

ADEAGBO, A.S.O. 1-ethyl-2-benzimidazolinone stimulates endothelial K<sub>Ca</sub> channel and nitric oxide formation in rat mesenteric vessel. **Eur. Journal. Pharmacol.**, v. 379, p.151-159, 1999.

[AHLQUIST, R.P.](#) Comparative effects of sympathomimetic amines on the vasomotor resistance of the kidney, mesentery and leg. **Fed Proc.**, v. 7, n. 1, Pt 1, p.202, Mar. 1948.

[AHUJA, K.D.](#); [ROBERTSON, I.K.](#); [BALL, M.J.](#) Acute effects of food on postprandial blood pressure and measures of arterial stiffness in healthy humans. **Am J Clin Nutr.**, v. 90, n. 2, p. 298-303, Aug. 2009.

ALLEN, B.G; WALSH, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **TIBS**, v. 19, p. 362-368, 1994.

ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989.

[ALTURA, B.M.](#); [ALTURA, B.T.](#) Calcium content and force of drug-induced contractions of arterial muscle during recovery *in vitro*. **EProc Soc Exp Biol Med.**, v.135, n. 3, p.739-744, Dec. 1970.

AMODEO, C.; HEIMANN, J. C. Endotélio e Hipertensão Arterial Sistêmica: mecanismo de lesão / novo alvo terapêutico? **Rev. Soc. Cardiol Estado de São Paulo**, v. 13, n. 1, jan. /fev. 2003.

ANDRADE, J.S.C.S.; OLIVEIRA, D.P.C.; SANTOS, L. A. Atividade analgésica e antiedematogênica da *Arrabidaea chica* Verl. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 1997. **Resumos....** Caxambu: FESBE, 1997.

ARAÚJO, L.C. L. et al. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático do extrato fluido de *Calea pinnatifida* (R. Brown) Banks ex Steudel, em camundongos. **LECTA – USF**, Bragança Paulista, v. 14, n. 1, p.87-110, 1996.

[ARUMANAYAGAM, M.](#) Antioxidant properties of carvedilol and metoprolol in heart failure: a double-blind randomized controlled trial. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 48-54, Jan. 2001.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 23. ed. São Paulo: A Edificação do lar, 1990. v.2.

BALIGA, M. S. et al. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of *Sapthaparma* (*Alstonia scholaris*) im mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 151, p 317-326, 2004.

BARDAI, E.I. et al. Lyoussi and J. Quetin-Leclercq. **Planta Med.**, v. **69**, 2003.

BARRÚS, M. T.; REVIRIEGO, J.; MARÍN, J. Effect of the Ca<sup>2+</sup> channel agonist BayK8644 on the contractile responses in human placental veins. **Journal Auton. Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 161-167, 1996.

BECK, A.; ZIMPFER, M.; RABERGER, G. Inhibition of the carotid chemoreceptor reflex by enflurane in chronically instrumented dogs. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 321, n. 2, p. 145-148, Nov. 1982.

[BEGONHA, R.](#); [MOURA, D.](#); [GUIMARÃES, S.](#) Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. **J Pharm Pharmacol.**, v. 47, n. 6, p. 510-513, Jun. 1995.

BEHRENS, A. Inhibition of rabbit keratocyte cell proliferation by retrovirus-mediated transfer of antisense cyclin g1 and antisense mat1 constructs to prevent corneal haze development after photorefractive/phototherapeutic keratectomy. **Journal Information**, v. 19, Supl. 2, p. 277-374, 2002.

BIRGIT, E.; DOBROMIR, D. Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 376, p. 145-155, 2007.

BORGES, A. C. R. et al. Effect of cholecalciferol treatment on the relaxante responses of SHR arteries to acetylcholine. **Hypertension (Dallas)**, New Orleans, v. 34, n. 4, p. 897-901, 1999.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas?: plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer / Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Datasus**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov>>. Acesso em: 28 jan. 2006.

[BRISTOW, M.R.](#) et al. Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 247, v. 3, p. 1039-1045, Dec. 1988.

[BRODDE, O.E.](#); [MICHEL, M.C.](#) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. [Pharmacol Rev.](#), v. 51, n. 4, p. 651-690, Dec. 1999.

[BROEDERS, M.A.](#) et al. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. [Circulation](#), v. 102, n. 6, p.677-684, 8 Aug. 2000.

BYRON, K. L. Estimula a vasopressina Ca<sup>2+</sup> + Cravação de Atividades em A7r5 pilhas de músculo liso vascular através da ativação da fosfolipase A2 **Circ. Res.**, v. 78, p. 813-820, 2008.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos caridovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, n. 8, p. 30-40, 2001.

CAMPBELL, W.B. et al. Identification of epoxyeicosatrenoc acids as endothelium derived hyperpolarizing factors. **Circ. Res.**, v. 78, p. 415-423, 1993.

CAMPOS JR., R. et al. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, n. 1, jan./mar. 2001.

CARVALHAES, M. A. de B. L; MOURA, E. C de; MONTEIRO, C. A. prevalência de fatores de risco para doenças crônicas: inquérito populacional mediante entrevistas telefônicas em Botucatu, São Paulo, 2004. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 11, n. 1, 2008.

CERONI, L. et al. Calcium-activated potassium channel and connexin expression in small mesenteric arteries from eNOS-deficient (eNOS<sup>-/-</sup>) and eNOS-expressing (eNOS<sup>+/+</sup>) mice. **European Journal of Pharmacology**, 2007.

CERUTTI, S. M. et al. Análise da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de *Erythrina falcata* em camundongos (*Mus musculus*). **LECTA – USF**, Bragança Paulista, v. 18, n. 2, p.75-83, 2000.

CESARINO, C. B. et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto - SP. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 91, n. 1, jul. 2008.

[CHITALEY, K.](#); [WEBER, D.](#); [WEBB, R.C.](#) RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. [Curr Hypertens Rep.](#), v. 3, n. 2, p.139-144, Apr. 2001.

CHOBANIAN, A.V. et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, n. 42, p.1206-1252, 2003.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca<sup>++</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J. Pharmacol Exper Ther**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

COHEN, J.D. Managing hypertension: state of the science. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, n. 8, p. 5-11, 2006.

COHEN, A. C.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. **Circulation**, n. 92, p. 3337-3349, 1995.

COLEMAN, T. G. et al. The role of the kidney in spontaneous hypertension. **American Heart Journal**, n. 89, p. 94-98, 1994.

CORNWELL, T. L. et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol**, v.40, p. 923-931, 1991.

COSTA P.R.C. et al Caracterización Farmacognóstica del Crajiru - *Arrabidaea chica* Verlot. Bignoniaceae. In: X CONGRESO ITALO LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA, 10., Caracas, 2001. Memórias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina. **Anais...** Caracas: Sociedad Italo Latinoamericana de Etnomedicina – SILAE, 2001. v.10. p. 217-220.

COSTA, P.R.C.; LIMA, E. A. **Brazilian – Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products**. Rio de Janeiro, 1989.

CRIBBS, L. L. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell Biologic**, v. 40, n. 2, p. 81-260, 2006.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia: Univ. Press, 1981.

CUNHA I.G.B. et al Effects of *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae) aqueous extract on experimental gastric ulceration. In: LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 16., 2000, Aguas de Lindoia, SP. From new molecules to new methods for health and knowledge in the beginning of a new millennium. **Anais...** 2000. p. 217-218.

DAMPEY, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, n. 2, p. 323-364, 1994.

DANANBERG, J.; SIDER, R.S.; GREKIN, R.J. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. **Hypertension**, n. 21, p. 359-363, 1993.

[DENNINGER, J.W.](#); [MARLETTA, M.A.](#) Guanilato ciclase e os NO / cGMP signaling pathway. [Biochim Biophys Acta](#), v.1411, n. 2/3, p. 334-50, 5 May 1999.

DE SIMONE, G. et al. Strong Heart Study Investigators. Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: the Strong Heart Study. **Hypertension**, v. 47, n. 2, p.162-167, 2006.

DEVIA, B. et al. New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 114-120, 2002.

DICKHOUT JG, LEE RMKW. Structural functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, p.781-789, 1997.

DIDIER, L. et al. Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, n. 293, p. 1169-1177, 2007.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 5. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Arq Bras Cardiol.**, supl. 4 p. 1-40, 2007.

[DORWARD, P.K.](#) et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effect of anesthesia. [Physiol Rev.](#), v. 70, n. 4, p. 921-961, Oct. 1990.

DZAU, V.J. Significance of endothelial-derived vasoactive substances. **J Vasc MedBiol.**, n. 1, p. 43-55, 1989.

[EDVINSSON, L.](#); [OWMAN, C.](#) Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. [Circ Res.](#), v. 35, n. 6, p. 835-849, Dec. 1974.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. **Suma Etnológica Brasileira**, Petrópolis, v. 1, p.135-148, 1987.

ENDO, M. et al. And the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes. **Circ. Res.**, v. 68, p. 1179-1190, 1991.

EVORA, P.R.; LEVIN, R.L. Methylene blue as drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.127, n. 3, p. 895-896, 2004.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

[FARACI, F.M.](#); [SOBEY, C.G](#) Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. **[J Cereb Blood Flow Metab.](#)**, v. 18, n.10, p.1047-1063, Oct. 1998.

FERREIRA, C. **Hipertensão arterial**. Disponível em: <[http://www.emedix.com.br/artigos/car001\\_1r\\_hipertensao.shtml](http://www.emedix.com.br/artigos/car001_1r_hipertensao.shtml)>. Acesso em: 12 mar. 2003.

FLUCKIGER, J.P.M. et al. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the NAotensive rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 109, p. 105-109, 1985.

FLYNN, E.R.M. et al. Functionally separate intracellular Ca<sup>2+</sup> store in smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001.

FOLKOW, B.; SVANBORG, A. Physiology of cardiovascular aging. **Physiol Rev.**, v. 73, n. 4, p. 725-764, Oct. 1993.

[FREGLY, M.J.](#) Factors affecting indirect determination of systolic blood pressure of rats. **[J Lab Clin Med.](#)**, v. 62, p. 223-230, Aug. 1963.

FROHLIC E.D; PFEIFER M.A; Adrenergic mechanism in human hypertension and in spontaneously hypertensive rat. **Clin Sci. Mol. Med**, n. 2, p. 225s -238s, 1975.  
FROLICH, J. D. Prostacyclin in hypertension. **J Hypertension Suppl.**, v. 8, p. S73-S78, 1990.

[FUJIHARA C.K.](#) et al. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. **[Am J Physiol.](#)**, v. 266, n. 5, Pt 2, p. F697-705, May 1994.

FURCHGOTT, R. F. Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscles. **Circulation Research**, v. 53, p. 557-573, 1983.

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

[GAO, J.](#) et al. Isoprenaline, Ca<sup>2+</sup> and the Na(+)-K<sup>+</sup> pump in guinea-pig ventricular myocytes. **[J Physiol.](#)**, v. 449, p. 689-704, Apr. 1992.

GARCÍA -GONZÁLEZ, M. et al. Toxicidad subcronica del extracto acuoso de las hojas y los brotes florares de *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae). **Rev. Cubana Plant Med.**, Ciudad de la Habana, mayo/ago. 2002.

GARLAND, C. et al. Endothelium dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p.23-30, 1995.

GAW, A. et al. **Bioquímica clínica**: um texto ilustrado em cores. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GHOFRANI, H. A.; WILKINS, M. W.; RICH, S. Uncertainties in the diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 118, p. 1195-1201, 2008.

GREENBERG, S.; BOHR, D.F. Venous smooth muscle in hypertension. Enhanced contractility of portal veins from spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v.36, n. 6, suppl 1, p. 208-215,1975.

GRYGLEWSKI, R.; BOTTING, R.; VANE, J.R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, n. 12, n. 6, p. 530-548, Dec. 1988.

GURNEY, A.M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **J Pharm Pharmacol**, v. 46, p. 242-251, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Tradução de Charles Alfred Esberard. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

HEAD, G.A. Cardiac baroreflex and hypertension. **Clin Exp. Pharmacol Physiol.**, v. 21, p. 791-802, 1994.

HILL, M.A. et al. [Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca\(2+\) signaling pathways underlying myogenic reactivity.](#) **J Appl Physiol.**, v. 91, n. 2, p. 973-983, Aug. 2001.

[HOENICKA, M.](#); [SCHIMID, C.](#) Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v. 6, n. 4, p. 287-301, Oct. 2008.

HOFFMAN, B.B.; LEFKOWITZ, R.J. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptors antagonists. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman & Gilman's**: the pharmacological basis of therapeutics. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw Hill, 1996. p. 199-248.

HORIE, O.Y. et al. On activates soluble guanylate cyclase and Kv channel to vasodilate resistance arteries. **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003.

IBARROLA, D. A. et al. Hipotensive effect of crude root extract of *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) in NAMo- and hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p.7-12, 1996.

IMÍZCOZ, M.A. La hipertensión arterial como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. **ANALES Sis San Navarra**, v. 21, Supl. I, p.18-27, 1998.

IRIGOYEN, M.C. et al. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? **Rev. Soc. Cardiol Estado de São Paulo**, v. 13, n. 1, jan./fev. 2003.

JACKSON, W. F. Ions channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.

JACKSON, W. F. Potassium channel in peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v.12, n. 1, p.113-127, 2005.

JARDIM, P. C. B. V. Educação em saúde e controle da pressão arterial. **Revista Cor & Ação – ciência, cultura e lazer**, São Paulo, n. 11, p. 28-29, abr. 1999.

JUDY, W.V. et al. Sympathetic nerve activity: role in: regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, 1976.

KALIL FILHO, A. N. et al. Conservação do Germoplasma de Plantas Aromáticas e Medicinais da Amazônia Brasileira para Uso Humano. **Comunicado técnico**, Embrapa, n. 50, p.1-4, 2000.

KAPLAN, N. M. **Systemic hypertension**: mechanisms and diagnosis in branwald zippes libby. 6th ed. Saunders/HIE: Heart Disease, 2001. Cap. 28.

KRIEGER, J. E. Hipertensão arterial: bases genéticas da hipertensão arterial. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.15, p. 24-26, 2000.

[KUROSAKI, K.](#) et al. Carvedilol stimulates nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. [J Mol Cell Cardiol.](#), v. 32, n. 2, p. 333-339, Feb. 2000.

LAGAUD, G. J.L. et al. Hetrogeneity of Endothelium-Dependent Vasodilatation in Pressurezed Cerebral and Samall Mesenteric Resistance Arteries of The Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 290, p. 832-839, 1999.

LAMARRE-CLICHÉ, M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of midodrine on blood pressure, the autonomic nervous system, and plasma natriuretic peptides: a prospective, randomized, single-blind, two-period, crossover, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 9, p. 1629-1638, Sep. 2008.

LANDS, A.M.; LUDUENA, F.P.; BUZZO, H.J. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. **Life Sci.**, v. 6, p. 2241-2249, 1967.

[LANGER, G.A.](#) Calcium in mammalian myocardium. Localization, control, and the effects of digitalis. **Circ Res.**, n. 35, Suppl 3, p. 91-98, Sep. 1974.

LANGLANDS, J.M.; DIAMOND, J. The effect of phenyleprine on inositol 1,4,5-triphosphate levels in vascular smooth muscle measured using a protein binding assay system. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 173, p.1258-1265, 1990.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS /Ed. da UFSC, 2001.

LARINI, Lourival. **Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1997.

LECOINTÉ, P. A. **Amazônia brasileira III: apontamentos sobre as plantas úteis e medicinais da Amazônia Brasileira**. Belém: [s-n], 1934.

LEDOUX, J. et al. Calcium activated potassium channel and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v 21, p.69-78, 2006.

LEVY, R. J. et al. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.113, p.143-155, 1983.

LEWINGTON, S. For the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, p. 1903-1913, 2002.

LIMA, A. O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LIMA, C. et. al. Primeiras observações sobre o fracionamento e purificação dos princípios ativos da *Arrabidaea chica* Bur. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 1995. **Anais...** [S.l.:s.n], 1995. p. 35.

LIMA-LANDMAN, M.T.R. et al. Efeito anti-hipertensor de um extrato padronizado aquosa de *Cecropia glaziovii* Variação na intensidade em ratos: um in vivo abordagem ao mecanismo hipotensor. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314-320, 21 maio. 2007.

LORENZI, T. et al. **Manual de Hematologia**: propedêutica e clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

LORY, P.; BIDAUD, I.; CHEMIN, J. T-type calcium channels in differentiation and proliferation. **Cell Calcium**, v. 40, p. 135-146, 2006.

LOTUFO, P. A.; LOLIO, C. A. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil. In: SOCESP CARDIOLOGIA. São Paulo: Atheneu, 1996. v .2.

LUNDIN, S.; RICKSTEIN, S.E.; THOREN, P. Interaction between “mental stress” and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rat. **Acta Physiol. Scand**, v. 120, p. 81, 1984.

MAIA, V.C. et al. Estudo de plantas nativas da Amazônia Ocidental com aplicação em dermatologia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 46, Vitória. **Resumos...**, Vitória: SBPC, 1994.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOULFF, P. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Springer Verlag 1997. p.23-53.

MARK, I.T; WEGLIICKI, W.B. Potent antioxidant proprieties of 4-hydroxyl-propranolol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v 308, p. 85-90, 2004.

MARLY, A. Ca-dependent K channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. **Nature**, v. 291, p.497-500, 1881.

MARSBOOM, G. et al. Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Stem Cells**, v. 26, p. 1017-1026, 2008.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Ed. UFC, 1997.

MATTA, A. **Flora Médica Braziliensis**. Manaus: Imprensa Oficial, 1913.

MELLO, B.S.M. et al. Avaliação da atividade antialérgica do extrato bruto de *Arrabidaea chica* verl. (bignoniaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002. **Anais...** [S.l.:s.n.], 2002. MENDES A.G.R. et al. Avaliação da atividade cicatrizante da *Arrabidaea chica* Verl. em pacientes com escoriações e pequenas queimaduras, atendidos em Centro de Saúde de Manaus, AM. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...**, Águas de Lindóia, 2001.

[MOMBOULI, J.V.](#); [VANHOUTTE, P.M.](#) Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 31, n. 1, p. 61-74, Jan. 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, v. 30, p. 293-331, 1978.

[MOSTAGHIM, R.](#); [MADDOX, Y.T.](#); [RAMWELL, P.W.](#) Endothelial potentiation of relaxation response to beta adrenoceptor blocking agents. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 239, n. 3, p.797-801, Dec. 1986.

MULVANY, M.J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiol Rev.**, v. 70, n. 4, p. 921-61, Oct. 1990.

MURAD, F. et al. Effects of Nitrovasodilators, Endothelium-dependent Vasodilators, and Atrial Peptides on cGMP. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 53, p. 1005-1009, 1988.

NEEDLEMAN, P. et al. Arachidonic acid metabolism. **Ann Rev Biochem**, n. 5, p. 69-102, 1986.

NEGRI, M. L. S.; CAMARGO, E. A. Óxido nítrico: uma alternativa no tratamento da hipertensão pulmonar. **J. Bras. Med.**, v. 85, n. 1, p. 15-23, jul. 2003.

NICASIO, P.; MECKES, M. Hipotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacarnada mimoxofolia* leaves in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 301-304, 2005.

NOBRE, F.; LIMA, N. K. C. Hipertensão arterial: Conceito, Classificação e Critérios Diagnósticos. In: \_\_\_\_\_. **Manual de Cardiologia SOCESP**. São Paulo: Atheneu, 2000. Cap. 70.

OATES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBRIND, L. E. **GOODMAN & GILMAN'S: the pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. USA: McGraw-Hill, 1996.

OATES, J.A.; BROWN, N. J. Anti- hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. In: \_\_\_\_\_. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jopn Circ J.**, v. 27, p. 282-293, 1963.

[O'DONNELL, S.R.](#); [WANSTALL, J.C.](#) Responses to the beta 2-selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional beta-adrenoceptor populations. [Br J Pharmacol.](#), v.84, n. 1, p. 227-235, Jan. 1985.

OLIVEIRA D.P.C. et al. Estudo da atividade da *Arrabidaea chica* verl. sobre parâmetros hematológicos em ratos wistar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 14., 1996. Caxambu. **Anais...**, Caxambu, MG, 1996a.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Estudo da atividade biológica da *Arrabidaea chica* verl. – crajiru I. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ESTADO DO AMAZONAS, 5., 1996. Manaus. **Anais...** Manaus, 1996b. p. 255.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Atividade cicatrizante da *Arrabidaea chica* Verl., Bignoniaceae. In: FESBE, 1998, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 1998a. p. 102.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória da *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verl. sobre o edema produzido por venenos de serpentes amazônicas. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 18., 2004, Manaus. **Anais...** Manaus, 2004. p. 140.

OLIVEIRA, D.P.C. et al. Estudo da atividade farmacológica da *Arrabidaea chica* verl. (bignoniaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 14., 1996. Caxambu. **Anais...** Caxambu, MG: FESBE, 1996c.

OLIVEIRA, D.P.C. Estudo da atividade cicatrizante da *Arrabidaea chica* em pacientes portadores de úlcera flebopática e de pé diabético. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO AMAZONAS, 6., Manaus. **Anais...** Manaus, 1998b.

ONO, H.; ONO, Y.; FROHLICH, E. D. Nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. Systemic, renal, and glomerular hemodynamics. **Hypertension**, v. 26, p. 249-255, 1995.

- ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Papéis emergentes de cátions alcalinos / protão na homeostase organellar. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 483-492, ago. 2007.
- OVERBECK, H.W.; JOHSTON, R.F. Experimental variation in vascular response studies. **Proc. Soc. Exp.Med.**, v. 141, p. 1041-1043, 1972.
- OWOYELE, B. V. Haematological evaluation of ethanolic extract of *Allium ascalonicum* in male albino rats. **Fitoterapia**, v.75, p.322 - 326, 2004.
- PAES, E. R. C. et al. Formulação de um gel de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verl e sua ação em feridas provocadas na pele de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Fitoterapia**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 67-73, 2005.
- PALLOTTA, B. S. N-Bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. **J. Gen. Physiol.**, v. 86, p. 601-612, 1985.
- [PATEL, S.P.](#); [CAMPBELL, D.L.](#) Transient outward potassium current, 'I<sub>to</sub>', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. **J Physiol.**, v. 569, Pt 1, p. 7-39, 15 Nov. 2005.
- PÉREZ-VIZCAÍNO, F. Vasodilatadora do nitroprussiato de sódio, levcromakalim e sua combinação de aorta isolados de ratos. **Br J Pharmacol.**, v. 128, n. 7, p. 1419-1426, dez. 1999.
- POIRIER, P. et al. Impact of Waist Circumference on the Relationship Between Blood Pressure and Insulin The Quebec Health Survey. **Hypertension**, n. 45, p. 363-367, 2005.
- PONNIAH, L.; SHEDARI, T.R., Nuclear oxidation in flavones and related compounds. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v.38, p. 77-83, 1953.
- POTTS, J.T.; McKEOWN, K.P.; SHOUKAS, A. A. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in model of hypertension. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. H1121-H1131, 1998.
- PREWITTS, R. L.; CHEN, I.I.; DOWELL, R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Physiol**, v. 243, p. H243 – H251, 1982.
- PRIVIERO, F.B.M. et al. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. **European Journal of Pharmacology**, v. 571, p. 189-196, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório clínico**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REBECCA, M. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p.101-104, 2002.

RÊGO, T. J. A. **Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão**. 2. ed. São Luís: EDUFMA, 1995.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth contraction**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 227-239.

RIBEIRO, R. M. **Estudo da Atividade Hipotensora de *Syzygium jambolanum* D.C. (jambolão)**. 2002. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2002.

ROCHA, A. P. et al. Antihypertensive and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *euterpe oleracea* MARTI (ACAI). **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, p. 435-448, 2008.

ROCKMAN, H.R.; KOCH, W.J.; LEFKOWITZ, R.J. Seven transmembrane-spanning receptors and heart function. **Nature**, n. 415, p. 206-212, 2002.

SAKATA, K.; KARAKI, H. Effects of a novel smooth muscle relaxant, KT-362, on contraction on cytosolic  $Ca^{2+}$  level in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 102, p. 147-178, 1991.

SAMPAIO, A.L.F. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 1998. **Resumos...**Caxambu: FESBE, 1998a. p. 102.

SAMPAIO, A.L.F. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* verl. (bignoniaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, SP, 1998b.

SANJA, C. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of 2 Satureja essential oils. **Food Chem.**, v. 111, p. 648-653, 2006.

SASAKI, K.; SATO, M.; UMEZAWA, Y. Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 33, p. 30945-30951, 15 Aug. 2003.

SENESCH, O et al. Calcium-channel bloking effect of constituents of clove oil. **Planta Med. Suppl.**, v.59, n.7, p. A687-690, 1993.

SHEPHARD, R. J. et al. A influência da nd employe fitness e um programa de modificação do estilo de vida sobre as despesas médicas cara. **Journal Public Health**, Canadian, n.73, p.259-263, 1982.

SILVA, G. F. C. **Estudo toxicológico de Syzygium jambolanum D. C. (jambolão)**. 2003. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SMHITH, T. L.; HUTCHINS, P.M. Anaesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and wistar-Kyoto rats. **Americam Journal Physiology.**, v. 238, p. H539-H544, 1989.

SOARES A.O. Estudo dos compostos iNAGânicos presentes nas folhas de *Arrabidaea chica Verlot* em relação a sua utilização popular como antianêmico. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FESBE, 17., 2003. **Resumos...** [S.l.:s.n], 2003.

[SOBEY, C.G.](#) Potassium channel function in vascular disease. **[Arterioscler Thromb Vasc Biol.](#)**, v. 21, n. 1, p. 28-38, Jan. 2001.

SOLARO, R. J. Myosin Light Chain Phosphatase: a cinderella of cellular signaling. **Circ. Res.**, n. 87, p. 173-175, Aug. 2000.

SOMANADHAN, B. et al. An ethnopharmacological survey for potential angiotensin converting enzyme inhibitors from Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p.103-112, 1999.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation im smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SPEEDING, M.; PAOLETTI, R. III Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol Rev.**, n. 44, p. 363-376, 1992.

[STEINFATH, M.](#) et al. Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. [Br J Pharmacol.](#), v.107, n. 1, p. 185-188, Sep. 1992.

SUZUKI, K.K. et al. Effects of lithium and valproate on agonist-induced platelet intracellular calcium mobilization: relevance to myosin light chain. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Japan, n. 28, p.67-72, 2004.

TODA, N.; KITAMURA, Y.; OKAMURA, T. Neural mechanism of hypertension by nitric oxide synthase inhibitor in dogs. **Hypertension**, v. 21, p. 3-8, 1993.

[TRIGGLE, D.J.](#) Molecular pharmacology of voltage-gated calcium channels. [Ann N Y Acad Sci.](#), v.15, n. 747, p. 267-281, Dec. 1994.

TRIPPODO, N.C.; FROLICH, E.D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension man and rat. **Circ Res.**, v. 48, p. 309-319, 1981.

VAN HOVE, C.E. et al. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. **Br J Pharmacol.**, v. 158, n. 3, p. 920-30, Oct. 2009.

VANE, J.R.; ANGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med.**, v. 323, p. 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C. M. Function the endothelium in arterial hypertension. **La Revue Du Praticien**, v.45, n. 20, p. 2513-2518, 1995.

VASCONCELOS, C. M. L. et al. Aqueous leaf extract of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) reduces both the inotropic effect of BAY K 8644 on the guinea pig atrium and the calcium current on GH3cells. **Rev. bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 4, 539-543., Dec. 2008.

VIDAL, A. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 295-300, 2003.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDAMANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug - milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 9-15, 2000.

VRINTS, G.; HERMAN, A.G. Role of the endothelium in the regulation of coronary artery tone. **Acta Cardiol.**, v. 46, p. 399-418, 1991.

WIJETUNGE, S.; HUGHES, A. D. Src family tyrosine kinases mediate contraction of rat isolated tail arteries in response to a hyposmotic stimulus. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 9, p. 1871- 1878, set. 2007.

YUSUF, S. et al. Study Investigators **Ramipril and the Development of Diabetes JAMA**, v. 286, n. 15, p.1882-1885, 2001.

ZIPES, D.P. et al. Task Force 7: Arrhythmias. **JACC**, v. 45, n. 8, p.1354–1363, 19 Apr. 2004.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831-835, 2001.

C322i Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa.

Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae) / Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.  
-- João Pessoa: UFPB, 2009.

147 f. : il.

Orientadora: Isac Almeida de Medeiros.

Co-orientador: Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

1. Substâncias naturais. 2. *Arrabidaea chica* Verlot . 3. Artéria mesentérica. 4. Hipertensão (SHR).

UFPB/BC

CDU: 547.9 (043)