



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

FABIANA DE MOURA SOUZA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO E DA SUA FRAÇÃO HIDROALCÓOLICA
OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro
(Malvaceae) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE ROEDORES**

TERESINA

2016

FABIANA DE MOURA SOUZA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO E DA SUA FRAÇÃO HIDROALCÓOLICA
OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro
(Malvaceae) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM FARMACOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

**Teresina
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

S719e Souza, Fabiana de Moura.
Efeito do extrato etanólico e da sua fração hidroalcóolica obtidos das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) sobre o sistema cardiovascular de roedores / Fabiana de Moura Souza. -- Teresina, 2016.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2016.

“Orientação : Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira.”

Bibliografia

1. *Sida santaremnensis*. 2. Vasorrelaxamento. 3. Pressão Arterial. I. Título.

CDD 615.32

FABIANA DE MOURA SOUZA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO E DA SUA FRAÇÃO HIDROALCÓOLICA
OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro
(Malvaceae) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE ROEDORES**

Aprovado em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Orientadora)**

**Profa. Dra. Rosemarie Brandim Marques
Universidade Estadual do Piauí - UESPI
(Examinador externo)**

**Prof. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Examinador Interno)**

Dedicatória

Aos meus pais Sebastião Clementino de Souza e Vaêdes Maria de Moura Souza pelo amor e pelo apoio incondicional.

A minha irmã Flaviane de Moura Souza pela torcida e amizade.

Ao meu tio e padrinho José Maria de Moura pelo incentivo e cuidado com minha educação.

Sem sonhos a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não tem alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”

(Augusto Cury)

Agradecimientos

Querido Deus, te agradeço pelas bênçãos sem fim, pela alegria de viver na tua presença.

À minha orientadora Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira pelo conhecimento transmitido, paciência, confiança e por me entender em todos os momentos que precisei.

Aos alunos de doutorado Daniel Arcanjo e Márcio Edivandro pela amizade e colaboração nos trabalhos experimentais.

Aos alunos de iniciação científica Pedro Simão e Aníbal Cantalice pela contribuição no trabalho realizado.

A Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira pelo excelente trabalho frente à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPI.

À Profa. Dra. Danielly Albuquerque da Costa pelo fornecimento dos extratos e frações de *Sida santraremnensis*.

Ao Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros pela receptividade em seu laboratório e pela liberação para a realização dos experimentos.

Aos professores da pós-graduação: Fernanda Regina Almeida, Francisco Oliveira, Rozeverter Moreno Fernandes, Rita de Cássia Oliveira, Aldeídia Oliveira, Salete Brito, Maria José Soares, Fernando Aécio Carvalho, Rosimeire Ferreira, pela formação, disponibilidade e constante incentivo.

A José Couras pelo carinho, pela disponibilidade em me ajudar sempre, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao todos os colaboradores do NPPM, Sr. Carlos Alberto, Josy, Patrícia e Gleyce pela simpatia, por auxiliarem no funcionamento do núcleo.

A todos os amigos da turma do mestrado: Nayra, Douglas, Deyna, Adriana, Lucas, Raylson, e Benedito pela amizade e força.

Aos amigos que conquistei no NPPM: Ilmara, Emanuella, Celyane, Carla, Marcelo, Josy, Valmor, Íris e Vinícius pela constante presença.

Aos amigos que conquistei no LAFFEX: Beatriz, Thiago, Luan, Simone, Patrícia, Naiara, Gabriela, Matheus, Bruno e Kerolayne pelo constante incentivo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí) pelo apoio financeiro.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo apoio financeiro e suporte técnico através do Portal de Periódicos.

À Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico.

À todos que direta ou indiretamente incentivaram e participaram da produção desta dissertação.

Fabiana de Moura Souza

RESUMO

A espécie *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) é um arbusto conhecido como “guaxuma” ou “vassourinha”. Estudo anterior demonstrou efeito vasorrelaxante do extrato etanólico (Ssan-EtOH) obtido das partes aéreas desta espécie em artéria mesentérica superior isolada de rato. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do (Ssan-EtOH) e da fração hidroalcoólica (Ssan-HA) sobre o sistema cardiovascular de roedores. Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g) e camundongos Swiss (25-30 g) todos provenientes do Biotério do NPPM. Os animais foram eutanasiados de acordo para Resolução 2012/CFMV e CEEA-UFPI 008/2012, a artéria mesentérica foi removida e limpa de tecido adiposo e seccionada em anéis (2-4 mm) que foram imersos em cubas para órgão isolado contendo solução de Tyrode (37°C com 95% de O₂ e 5% de CO₂). Após estabilização por 1 hora os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (10µM) ou KCl 80mM e os registros de tensões isométrica foram obtidas através do software AQCAD 2.06. Na avaliação da atividade antioxidante foi utilizado homogenato de coração de camundongos. A atividade hipotensora foi verificada através de implantação de cateter de polietileno na arterial femoral e veia femoral esquerda através de procedimento cirúrgico sob anestesia. Os registros foram obtidos após 24 horas seguintes a este procedimento e foram obtidos através do sistema de aquisição (AQCAD 2.06). Os resultados demonstram que a Ssan-HA (0,1 a 750 µg/mL) promove efeito vasorrelaxante em preparações com endotélio vascular (pD₂= 1,42 ± 0,04) pré-contraídas com fenilefrina. Este efeito foi atenuado após a remoção do endotélio (pD₂ = 2,01 ± 0,05) e na presença de L-NAME 100 µM (pD₂ = 1,84 ± 0,06* ou TEA 3 mM pD₂ = 2,18 ± 0,05*). As concentrações crescentes (81, 243, 500 e 750 µg/mL) de Ssan-HA inibiram de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por adição cumulativa de fenilefrina (10⁻⁹ – 10⁻⁵ M), (E_{máx} = 91,64 ± 2,27%, E_{máx} = 51,11 ± 6,32%, E_{máx} = 20,16 ± 2,15%, E_{máx} = 7,22 ± 0,01%, respectivamente), resposta semelhante a obtida por KCl (20 – 120 mM). Em anéis sem endotélio pré-contraídos com (KCl 80mM) Ssan-HA promoveu efeito vasorrelaxante (pD₂ = 2,22 ± 0,09) de maneira dependente de concentração. Em relação a atividade antioxidante nas dosagens de GSH, MDA e H₂S, observou-se que Ssan-HA não promove depleção de grupos sulfidrilas enquanto que os níveis de MDA mostram uma diminuição significativa após tratamento por via intraperitoneal em todas as doses testadas. Ocorreu ainda um aumento dos níveis de H₂S nas doses de 1, 10 e 20 mg/kg. Na avaliação dos parâmetros hemodinâmicos (PAM e FC) observou-se que o extrato etanólico Ssan-EtOH nas doses (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v.) induziu hipotensão associada a bradicardia. Esse efeito não foi alterada na presença de L-NAME (20 mg/kg, i.v.), no entanto, foi alterado na presença de atropina (2 mg/kg, i.v.). Conclui-se que a fração Ssan-HA induz vasorrelaxamento envolvendo a eNOS e canais de K⁺ além da inibição do influxo de cálcio. Adicionalmente a Ssan-HA induz alterações nos níveis de GSH, MDA e aumento do H₂S. Esses efeitos contribuem para a ação do Ssan-EtOH sobre a PAM uma vez que a fração Ssan-HA foi obtida a partir do extrato supracitado.

Palavras chave: *Sida santaremnensis*, vasorrelaxamento, pressão arterial.

ABSTRACT

The species *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) is a shrub known as "guaxuma" or "bassourinha". A previous study demonstrated a vasorelaxant effect of the ethanolic extract (Ssan-EtOH) obtained from the aerial parts of this species in the superior mesenteric artery isolated from the rat. The objective of this study was to investigate the effect of (Ssan-EtOH) and hydroalcoholic fraction (Ssan-HA) on the cardiovascular system of rodents. Male Wistar rats (250-300 g) and Swiss mice (25-30 g) were all obtained from the NPPM vivarium. The animals were euthanized according to Resolution 2012 / CFMV and CEEA-UFPI 008/2012, the mesenteric artery was removed and cleaned of adipose tissue and sectioned into rings (2-4 mm) that were immersed in vats for an isolated organ containing solution of Tyrode (37 °C with 95% with O₂ and 5% in CO₂). After stabilization for 1 hour the rings were pre-contracted with phenylephrine (10µM) or 80mM KCl and the isometric stresses were obtained through AQCAD software 2.06. In the evaluation of the antioxidant activity, mouse heart homogenate was used. The hypotensive activity was verified through implantation of a polyethylene catheter in the femoral artery and left femoral vein through a surgical procedure under anesthesia. The records were obtained after 24 hours following this procedure and were obtained through the acquisition system (AQCAD 2.06). The results demonstrate that Ssan-HA (0.1 to 750 µg / mL) promotes vasorelaxant effect in preparations with vascular endothelium (pD₂ = 1.42 ± 0.04) pre-contracted with phenylephrine. This effect was attenuated after removal of the endothelium (pD₂ = 2.01 ± 0.05) and in the presence of 100 µM L-NAME (pD₂ = 1.84 ± 0.06 * or TEA 3 mM pD₂ = 2,18 ± 0,05*). Increasing concentrations (81, 243, 500 and 750 µg / mL) of Ssan-HA inhibited concentration-dependent contractions induced by the cumulative addition of phenylephrine (10-9-10-5 M), (Em₅₀ = 91.64 ± 2.27%, Em₅₀ = 51.11 ± 6.32%, Em₅₀ = 20.16 ± 2.15%, Em₅₀ = 7.22 ± 0.01%, respectively), a response similar to that obtained by KCl (20 - 120 mM). In non-endothelial rings pre-contracted with (KCl 80 mM) Ssan-HA promoted vasorelaxant effect (pD₂ = 2.22 ± 0.09) in a concentration-dependent manner. In relation to the antioxidant activity in the dosages of GSH, MDA and H₂S, it was observed that Ssan-HA does not promote depletion of sulfhydryl groups whereas MDA levels show a significant decrease after intraperitoneal treatment at all doses tested. There was also an increase in H₂S levels at doses of 1, 10 and 20 mg / kg. In the evaluation of hemodynamic parameters (MAP and HR), it was observed that the ethanolic extract Ssan-EtOH at doses (0.5, 1, 5, 10, 20 and 30 mg.kg⁻¹ i.v.) induced hypotension associated with bradycardia. This effect was not altered in the presence of L-NAME (20 mg / kg, i.v.), however, it was altered in the presence of atropine (2 mg / kg, i.v.). We conclude that the Ssan-HA fraction induces vasorelaxation involving eNOS and K⁺ channels in addition to inhibition of calcium influx. In addition to Ssan-HA induces changes in GSH, MDA and H₂S increase levels. These effects contribute to the action of Ssan-EtOH on MAP since the Ssan-HA fraction was obtained from the aforementioned extract.

Key words: *Sida santaremnensis*, vasorelaxation, blood pressure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
Ca²⁺	Cálcio
Ca_v	Canais para cálcio sensíveis à voltagem
CCORs	Canais de cálcio operados por receptor
CMLV	Célula do músculo liso vascular
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de cálcio diidratado
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
DL 50	Dose letal mediana
E.p.m.	Erro padrão da média
E+	Com endotélio
E-	Sem endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Emáx	Efeito máximo
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico
GSH	Glutationa redutase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H₂S	Sulfeto de Hidrogênio

IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio
K⁺	Íon Potássio
K_{ATP}	Canais para potássio sensíveis a ATP
KIR	Canais retificadores de entrada
BKca	Canais para potássio de grande condutância ativados por Ca ²⁺
KV	Canais para potássio dependentes de voltagem
L	Lavagem
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil éster
MDA	Malondialdeído
Min	Minuto
MLV	Músculo liso vascular
MCLK	Quinase da cadeia leve de miosina
MCL	Miosina de cadeia leve
MgCl₂.6H₂O	Cloreto de magnésio hexahidratado
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHS	Hidrossulfeto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaH₂PO₄.H₂O	Fosfato de sódio monoidratado
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PE	Catéteres de polietileno
PKG	Proteína cinase G

pD₂	Logaritmo negativo da concentração que promove 50% da resposta máxima
RS	Retículo sarcoplasmático
RVPT	Resistência vascular periférica total
Ssan-HA	Fração hidroalcolica de <i>Sida santaremnensis</i>
Ssan-EtOH	Extrato etanólico de <i>Sida santaremnensis</i>
TEA	Tetraetilamônio
VES	Volume de ejeção sistólico
v.o.	Via oral
v.ip.	Via intraperitoneal
i.v.	Via intravenosa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Sida santaremnensis</i> H. Monteiro.....	26
FIGURA 2: A – Artéria mesentérica superior isolada de rato, B – Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolado de rato em solução de Tyrode, C - Sistema de cubas para órgão isolado do laboratório de Farmacologia Cardiovascular do NPPM - UFPI - AVS Projetos, SP.....	38
FIGURA 3: Sistema de aquisição de dados do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do NPPM - UFPI (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP).....	38
FIGURA 4: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito vasorrelaxante induzido por Ssan-HA (0,1 - 750 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica précontraídos com FEN na presença (A) e na ausência do endotélio vascular (B).....	39
FIGURA 5: Protocolo experimental para verificação da participação da eNOS e dos canais para potássio na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos na ausência do endotélio vascular.....	40
FIGURA 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da inibição das contrações de induzidas por concentrações de KCl ou FEN cumulativas em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional na presença e ausência do Ssan-HA (81, 243, 500 e 750 µg/mL).....	41
FIGURA 7: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito vasorrelaxante induzido por Ssan-HA (0,1 - 750 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl 80 mM, na ausência do endotélio vascular.....	42
FIGURA 8: Sistema de aquisição de dados para registro da PA e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	45
FIGURA 9: Curvas concentração-resposta de Ssan-HA (0,1 – 750 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídas com fenilefrina, na presença (●) ou na ausência (■) do endotélio vascular.....	48
FIGURA 10: Curvas concentração-resposta Ssan-HA (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos normotensos précontraídos com FEN (10 ⁻⁵ M) na ausência (●) e na presença de L-NAME (□).....	49
FIGURA 11: Curvas concentração-resposta do Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos, na ausência (●) ou na presença (□) de TEA 3 Mm.....	50

FIGURA 12: Curvas concentração-resposta para FEN na presença de concentrações isoladas do Ssan-HA. Controle (◇); 81 µg/mL (●); 243 µg/mL (○); 500 µg/mL (◆) e 750 µg/mL (Δ) em anéis de artéria mesentérica isolados de ratos sem endotélio funcional.....	51
FIGURA 13: Curvas concentração-resposta para o Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio e pré-contraídas com FEN (■) ou KCl 80 mM (□).....	53
FIGURA 14: Curvas concentração-resposta para KCl na presença de concentrações isoladas do Ssan-HA. Controle (◇); 81 µg/mL (●); 243 µg/mL (○); 500 µg/mL (◆) e 750 µg/mL (Δ) em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos sem endotélio funcional.....	54
FIGURA 15: Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a atividade da GSH no tecido cardíaco de camundongos.....	55
FIGURA 16: Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a atividade da GSH no tecido cardíaco de camundongos.....	56
FIGURA 17: – Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a concentração do H ₂ S no tecido cardíaco de camundongos.....	57
FIGURA 18: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados.....	58
FIGURA 19: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados, antes e após o bloqueio com L-NAME (20 mg/kg, i.v.) (2 mg/kg, i.v.).....	59
FIGURA 20: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados (n= 5), antes e após o bloqueio com atropina (2 mg/kg, i.v.).....	61
FIGURA 21: Mecanismo de ação dependente do endotélio vascular proposta para a Ssan-HA.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Composição da solução de Tyrode normal e outras soluções com modificações.....	36
Tabela 02 – Valores do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e do logaritmo negativo da concentração da fração que promove 50% da resposta máxima (pD_2) das contrações induzidas pela adição cumulativa de FEN (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas da Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$).....	52
Tabela 03 – Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) das contrações induzidas pela adição cumulativa de KCl (20 – 120 mM) na presença de concentrações isoladas da Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$).....	54

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Plantas Medicinais.....	22
1.2 Família Malvaceae.....	23
1.3 Gênero <i>Sida</i>	24
1.4 <i>Sida santaremensis</i> H. Monteiro.....	25
1.5 Sistema Cardiovascular e a Hipertensão arterial	26
1.6 Terapêutica.....	27
1.7 Considerações gerais sobre contração e relaxamento do músculo liso vascular.....	29
1.8 Considerações gerais sobre cardioproteção e atividade antioxidante.....	31
2.0 - OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.1 Objetivos específicos.....	34
3.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais.....	35
3.2 Substâncias Químicas e Sais.....	35
3.3 Soluções nutritivas.....	36
4.0 – ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	37
4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “ <i>IN VITRO</i> ”	37
4.1.1 Preparação de anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos com ou sem endotélio vascular.....	37
4.1.2 Investigação do efeito da Ssan-HA sobre contrações tônicas induzidas por fenilefrina em artéria mesentérica de ratos.....	39
4.1.3 Verificação da participação da eNOS e dos canais para potássio no	

efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	40
4.1.4 Investigação do efeito inibitório das contrações cumulativas de fenilefrina e KCl promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	40
4.1.5 Efeito do Ssan-HA sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica isolados de ratos.....	42
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “EX VIVO”	42
4.2.1 Protocolo experimental	42
4.2.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) em tecido cardíaco de camundongos.....	43
4.2.3 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no tecido cardíaco de camundongos.....	43
4.2.4 Determinação da concentração do sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) no tecido cardíaco de camundongos.....	44
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “IN VIVO”.....	44
4.3.1 Medida direta da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados.....	44
4.3.2 Protocolo experimental para verificação do efeito do EtOH-Ssan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos	45
4.3.3 Efeito de Ssan-EtOH em ratos normotensos não anestesiados antes e após o bloqueio com L-NAME.....	46
4.3.4 Efeito de Ssan-EtOH em ratos normotensos não anestesiados antes e após o bloqueio dos receptores muscarínicos	46
5.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6.0 - RESULTADOS	48
6.1 Efeito da Ssan-HA sobre às contrações tônicas induzidas por fenilefrina em artéria mesentérica superior isoladas de ratos.....	48
6.2 Efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos na presença do inibidor da eNOS	49

6.3 Efeito vasorrelaxante induzido pela Ssan-HA na presença de TEA 3 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	50
6.4 Efeito inibitório do Ssan-HA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	51
6.5 Efeito da Ssan-HA sobre contrações sustentadas induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos	52
6.6 Efeito inibitório da Ssan-HA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de KCl em anéis de artéria mesentérica de ratos	53
6.7 Efeito da Ssan-HA sobre os níveis de glutathione redutase em tecido cardíaco de camundongos	55
6.8 Efeito da Ssan-HA sobre a concentração de malondialdeído em tecido cardíaco de camundongos	56
6.9 Efeito da Ssan-HA nos níveis de sulfeto de hidrogênio em tecido cardíaco de camundongos	56
6.10 Efeito do Ssan-EtOH sobre a Pressão arterial e Frequência Cardíaca em ratos.....	57
6.11 Efeito do Ssan-EtOH sobre a PAM e FC antes e após a administração de L-NAME em ratos	58
6.12 Efeito de Ssan-EtOH em ratos não anestesiados antes e após o bloqueio com atropina	60
6.0 – DISCUSSÃO	61
7.0 – CONCLUSÕES	69
8.0 – PERSPECTIVAS.....	71
9.0 – REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO	88

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

As plantas são empregadas na medicina tradicional desde a antiguidade, e utilizadas como recurso terapêutico por aproximadamente 80% da população do planeta (AMIRMOHAMMADI et al., 2014). Sendo que em algumas partes do mundo as pessoas dependem essencialmente das plantas medicinais para cuidados médicos primários (ISMAIL, 2010).

O comércio internacional de produtos à base de plantas tem grande expressão na economia global e o crescimento da demanda é notório nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (NEWMASTER et al., 2013). Isso se deve em parte ao aumento da conscientização dos consumidores sobre a saúde, ao pressuposto das pessoas que os medicamentos à base de plantas são isentos de efeitos colaterais e o alto custo das drogas sintéticas (PANDEY et al., 2011).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais são a base da divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas como botânica, farmacologia e fitoquímica, que interligam os conhecimentos sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

Um recurso para a investigação de plantas medicinais são os estudos etnofarmacológicos que se baseiam na combinação de informações adquiridas junto a comunidades locais que utilizam a flora medicinal, com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados (SIMÕES et al., 2003). Esses estudos mostram efeitos promissores para uma ampla variedade de doenças, tais como câncer (SHIRZAD et al., 2013), diabetes (ASGARY et al., 2014), diarreia (ARAÚJO et al., 2015) aterosclerose e doenças cardiovasculares (ASGARY et al., 2014), inflamação (LIMA et al., 2015), dor (HASSAN et al., 2015), infecções (DUDA et al., 2015) entre outras doenças.

No Brasil o tratamento dos problemas de saúde da população com plantas medicinais é histórico, e deve ao fato do Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta, com

destaque para sua potencialidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. A importância do uso de plantas no Brasil foi reconhecida no ano de 2006, através do Decreto da Presidência da República nº. 5.813, de 22 de junho, criando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Os produtos à base de plantas são comercializados sob a forma de chás, tinturas, ervas secas e trituradas ou extratos de plantas secas e líquidos, os extratos secos estão disponíveis na forma de cápsulas e comprimidos (BANKER, RHODES, 2002).

As plantas medicinais e seus extratos já demonstraram ser uma fonte promissora para a aplicação no sistema medicinal (MEHTA et al., 2015). Entre os motivos de utilização dos extratos pode-se apontar o sinergismo dos diferentes compostos, a perda da atividade de substâncias após o isolamento, a instabilidade química, dificuldade na purificação e a possibilidade de atuar em múltiplos alvos (GERTSCH, 2011).

Pesquisas nas áreas de química medicinal e farmacologia que avaliam as plantas medicinais apontam um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002).

1.2 Família Malvaceae

A família Malvaceae pertence à ordem Malvales é constituída por 243 gêneros e 4225 espécies (STEVENS, 2003), no entanto segundo Hinsely, (2008) a família Malvaceae contém mais de 200 gêneros, com cerca de 2300 espécies, os dados diferentes podem estar relacionados a estudos fitogenéticos. As espécies desta família são amplamente distribuídas em quase todo o mundo, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais, com maior expressão na América do Sul (HEYWOOD, 1993). No Brasil, a família Malvaceae está representada por cerca de 35 gêneros e 400 espécies, disseminadas por todas as regiões do país (BARROSO et al., 1991; DINDA et al., 2015).

As investigações fitoquímicas realizadas com espécies da família Malvaceae, evidenciaram que estas espécies são ricas em ácidos graxos, óleos essenciais, sesquiterpenóides, esteróides, triterpenos, compostos fenólicos,

flavonóides, entre muitos outros compostos (SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2007; SILVA et al., 2010).

1.3 Gênero *Sida*

Faz parte da família Malvaceae o gênero *Sida* que apresenta ampla distribuição neotropical com várias espécies bem representadas nas Américas, África e Ásia, com um número aproximado de 200 espécies. No Brasil este gênero possui muitos representantes nas regiões Nordeste e Sul e, em menor proporção, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (SILVA et al., 2006). São herbáceas e semi-arbustivas, todas consideradas infestantes, invasoras de lavouras anuais e perenes, e com pouco ou nenhum valor comercial. São conhecidas genericamente como “guanxuma”, “vassourinha”, “guaxima” ou “malva” (PEIXOTO, 2007).

Algumas plantas deste gênero como, *Sida acuta* Burm. F., *Sida cordifolia* L., *Sida rhombifolia* L., *Sida alnifolia* V., *Sida spinosa* L. e *Sida veronicaefolia* L. tem uso etnobotânico abundante a séculos em muitos países asiáticos, africanos e americanos (DINDA et al., 2015).

As diferentes partes de plantas do gênero *Sida* são utilizados na medicina indígena no tratamento de distúrbios como: neurológicos e uterinos, cefaleia, tuberculose, diabetes, febre da malária, hemorróidas, úlceras, feridas, doenças reumáticas, problemas cardíacos, diarreia e doenças de pele (MILLS, 1994; PARROTTA, 2001).

A literatura científica relata que diferentes extratos e substâncias isoladas a partir das plantas desse gênero apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica, hepatoprotetora, anti-úlceras, cardioprotetora, neuroprotetora, antioxidante, nefroprotetora, antidiabética e antiobesidade, abortiva e atividades antipiréticas (AJITHABAI et al., 2012; PRADHAN et al., 2013; SRINITHYA, MUTHURAMAN, 2014; GALAL et al., 2015). Essas atividades são relacionadas aos componentes bioativos presentes nessas plantas sendo que cerca de 142 componentes químicos já foram identificados em diferentes espécies de *Sida*, onde os alcalóides, flavonóides e ecdisteróides são os grupos predominantes (DINDA et al., 2015). Vários grupos de pesquisa têm avaliado a toxicidade aguda e segurança dos extratos de diferentes espécies do gênero *Sida*. A toxicidade aguda de longo prazo do

extrato de acetona aquoso de *Sida rhombifolia* foi avaliada após administração por via oral (v.o.) nas doses 1-6 g/kg de peso corporal em ratos e não apresentou sintomas tóxicos (SIREERATAWONG et al., 2008), em outro estudo o extrato de *Sida rhombifolia* não demonstrou ser tóxico a ratos até à dose de 5 g/kg (OUEDRAOGO et al., 2013). Segundo Franco et al. (2005), a administração do extrato etanólico aquoso das folhas de *Sida cordifolia* em camundongos Swiss por via intraperitoneal (i.p.) (500 - 3000 mg/kg) mostrou que o valor de DL50 é 2639 mg/kg para essa via e no mesmo estudo o tratamento por v.o. (500-5000 mg/kg) não foi observado a morte dos camundongos.

1.4 *Sida santaremnensis* H. Monteiro

A espécie *Sida santaremnensis* H. Monteiro (figura 1) ocorre em quase todo o Brasil à exceção da Região Sul, onde não se tem registro (BOVINI, 2010). Apesar de sua ampla distribuição, não há relato da utilização dessa espécie na medicina popular. Contudo, verificando-se uma variedade de compostos naturais, propriedades farmacológicas e relatos de uso descritos para espécies da família Malvaceae, e do gênero *Sida* (NASCIMENTO et al., 2015), e com base em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa que mostrou que o extrato etanólico obtido a partir de partes aéreas da espécie promoveu efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica de ratos, envolvendo a participação de fatores relaxantes derivados de endotélio, como o óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante, bem como o bloqueio dos canais de cálcio (Ca^{2+}) (ARCANJO et al., 2011).

Como o estudo anterior demonstra que a espécie *Sida santaremnensis* possui atividade biológica importante que pode refletir sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, é oportuno biomonitorar a ação do extrato e sua fração hidroalcoólica sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos.

FIGURA 1. *Sida santaremnensis* H. Monteiro



FONTE: ARCANJO, 2009.

1.5 Sistema Cardiovascular e a Hipertensão arterial

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016) as doenças cardiovasculares, são líderes de mortalidade no Brasil, onde representam 29% dos óbitos e nos primeiros meses de 2016 são responsáveis por mais de 83.410 mil óbitos no país. Um dos principais fatores que influênciam no risco cardiovascular é a hipertensão arterial sistêmica (HAS) que também têm uma alta prevalência e impacto na morbi-mortalidade dos indivíduos (KEARNEY et al., 2005). Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pela HAS pode-se destacar: maior consumo de sal, obesidade, alteração dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático, e disfunção endotelial (PAGE et al., 1999; AMODEO, HEIMANN, 2003).

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial (PA), mas ele necessita da ação integrada de outros sistemas, como o renal, neural e endócrino. Estes, por outro lado, são responsáveis pela redistribuição dos vários fluxos sanguíneos regionais através de alterações na resistência vascular periférica total (RVPT) e no débito cardíaco (DC) (CAMPAGNOLE-SANTOS, HAIBARA, 2001; ROBINSON, GRIEVE, 2009).

A PA é uma entidade física definida como força ou unidade de área (IRIGOYENI et al., 2003). De maneira simplificada, a pressão arterial média (PAM)

pode ser determinada pelo produto de duas variáveis: DC e da RVPT. A interação dessas variáveis pode ser expressa pela seguinte equação: $PAM = DC \times RVPT$, onde o DC é determinado pelo produto entre o volume de ejeção sistólica e a frequência cardíaca (FC), expresso na equação: $DC = VES \times FC$. Desse modo, a FC participa da homeostase da PAM como um de seus determinantes primários (IRIGOYEN et al., 2005).

Uma elevação da PAM pode acontecer como resultado de um aumento do DC, RVPT, ou uma combinação de ambos. O DC é uma consequência da função do bombeamento do ventrículo esquerdo, que por sua vez depende de uma série de fatores que inclui a pré-carga (retorno venoso ou volume diastólico ventricular esquerdo), o estado contrátil do músculo ventricular, e a pós-carga, (complexa relação entre fluxo e a pressão instável durante todo o ciclo cardíaco) (MAYET, HUGHES, 2003; PATEL, BURNAND, 2009).

Assim, pequenas alterações no diâmetro da artéria (ou o raio) têm um profundo efeito sobre o fluxo (ou resistência). A curto prazo, o diâmetro das pequenas artérias e arteríolas é controlado pelo estado contrátil do músculo liso. Mudanças na estrutura da relação parede/lumem vascular, finalizam em um remodelamento dificultando a contração da musculatura lisa vascular (STAESSEN et al., 2003).

Considera-se hipertensão arterial, segundo critérios estabelecidos pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), quando a pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e a pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg.

1.6 Terapêutica

Fármacos anti-hipertensivos independentemente dos mecanismos moleculares envolvidos, tem como principal objetivo terapêutico reduzir a pressão arterial sistólica e diastólica a valores não considerados perigosos (SILVA et al., 2012). Como a HAS trata-se de uma patologia multiparamétrica, os principais tratamentos utilizados hoje em países desenvolvidos envolvem muitos fármacos, tais como beta-bloqueadores, doadores de NO, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores do receptor da angiotensina II, diuréticos e bloqueadores dos canais de cálcio (CALHOUN et al., 2008; CARRÉ et al., 2014).

Os diuréticos são drogas que promovem a produção e excreção de urina, compreendendo três tipos principais com base em seus locais de ação nos rins: os diuréticos de alça, os poupadores de potássio e os tiazídicos. Diuréticos de alça agem sobre o ramo ascendente da alça de Henle, bloqueando a reabsorção de até 20-30% do sódio filtrado através da inibição do sódio, K^+ , e co-transportador de cloreto; os poupadores de potássio produzem um efeito diurético suave, bloqueando a bomba de troca de sódio/ K^+ no túbulo distal e os diuréticos de tiazida atuam no túbulo distal, inibindo a reabsorção de sódio e cloreto, e bloqueando 10-15% da reabsorção de sódio. Esses últimos são os mais utilizados como anti-hipertensivos. (JESSUP et al., 2009; MCMURRAY et al., 2012; VAZIR, COWIE, 2016)

Os betabloqueadores tem um papel importante no tratamento das doenças cardiovasculares, são utilizados há anos por causa da sua atividade anti-isquêmica, anti-arrítmica, e propriedades anti-hipertensivas (LOPEZ-SENDON et al., 2004). Entretanto, recentemente o emprego de betabloqueadores como anti-hipertensivo de primeira escolha tem sido questionado especialmente para o tratamento de pessoas idosas (LINDHOLM et al., 2005; KAHN, McALISTER, 2006).

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os bloqueadores de receptores de angiotensina II são drogas que atuam no sistema renina angiotensina, que é um sistema endócrino de auto-regulação, com importante papel no controle da pressão arterial e na fisiopatologia da HAS. Os IECA reduzem a morbidade e mortalidade nos pacientes com insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, sendo úteis na prevenção secundária do acidente vascular encefálico (COSTA et al., 2009).

Os bloqueadores de canais de cálcio (chamados comumente de antagonistas de cálcio) têm exercido um importante papel no tratamento da hipertensão por mais de 20 anos. Segundo Ribeiro, Muscará (2001), o aumento do número de bloqueadores de canais de cálcio (sejam novas formulações ou novas estruturas químicas) tem contribuído para uma mudança no cenário, possibilitando um emprego mais apropriado quando comparado com outros agentes anti-hipertensivos.

Os doadores de NO têm sido utilizados na prática clínica há décadas (por exemplo, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio). O NO liberado de doadores de NO ou cGMP têm mostrado sua capacidade em ativar canais de K^+ no músculo liso,

promovendo vasorrelaxamento reduzindo a pressão arterial (BOLOTINA et al., 1994; IGNARRO et al., 2002).

Outra alternativa utilizada para o tratamento da hipertensão são os fitoterápicos, que são medicamentos produzidos a partir de plantas. Sendo a fitoterapia caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados (SCHENKEL, GOSMAN, PETROVICK, 2000). Uma das plantas usadas no tratamento da hipertensão arterial é o alho (*Allium sativum*) (PANTOJA et al., 1991), que também apresenta efeitos natriurético e diurético (PANTOJA et al., 2000), antiagregante plaquetário e fibrinolítico (RAHMAM, 2001) e cardioprotetor na reperfusão e na isquemia (PEDRAZZA-CHAVERRI, 1998). Outra planta que tem efeito sobre a pressão arterial é o capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cuja ação anti-hipertensiva, e também diurética, foi citada por Carbajal et al. (1989). E estudo anterior mostrou que os extratos hidroalcoólicos do alho e do capim-limão foram igualmente potentes na redução da pressão arterial média de ratos anestesiados (SINGI et al., 2005).

1.7 Considerações gerais sobre contração e relaxamento do músculo liso vascular

Uma das funções essenciais do sistema vascular é permitir a troca de substâncias entre o sangue e os tecidos, que ocorre em nível de capilares, sendo as artérias e veias as condutoras do sangue entre o coração e os capilares (SCANLON, SANDERS, 2007). O músculo liso vascular (MLV) contribui fundamentalmente na regulação da pressão arterial através de seu estado contrátil. As células do músculo liso vascular (CMLVs) relaxam e contraem, distribuindo assim o sangue para áreas onde a oxigenação tecidual e os nutrientes são necessários (LI et al., 1999; DAVANI et al., 2003).

As células CMLVs recebem inervação neural do sistema nervoso autônomo simpático e, além disso, o estado contrátil do MLV é controlado por hormônios, agentes autócrinos/parácrinos e outros sinais químicos locais (WEB, 2003).

Os mecanismos responsáveis pela contração do MLV estão divididos em duas classes: acoplamento eletromecânico, contração dependente das mudanças

no potencial de membrana celular e farmacomecânico, contração induzida por agonista de receptores acoplado a proteína-G (SOMLYO, 1994; ZHU et al., 2007).

O acoplamento eletromecânico ocorre por despolarização da membrana, ativando canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e canais de Ca^{2+} operados por receptor (CCORs); e no acoplamento farmacomecânico ocorre a interação de agonistas com receptores ligados à proteína G, gerando uma mudança conformacional fazendo com que diminua a afinidade de GDP este é substituído por GTP, em seguida acontece o desacoplamento da subunidade α da $\beta\gamma$, a subunidade α ativa a fosfolipase C do tipo β que irá fosforilar fosfolípidos de membrana dando origem ao 1,4,5- fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga ao seu receptor (IP₃R) presente na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), promovendo assim, a liberação do Ca^{2+} do RS e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que irá ativar proteínas envolvidas com a contração como quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2), Rho quinase e a proteína quinase dependente de calmodulina (CaM) II e também atuara na fosforilação dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem na membrana, aumentando a condutância do íon Ca^{2+} , este então combina-se com a proteína calmodulina (CaM), um dímero com quatro sítios de ligação ao Ca^{2+} , o complexo Ca^{2+}/CaM complexo ativa quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) para fosforilar a miosina de cadeia leve (MLC), permitindo a interação da miosina com a actina, resultando na ativação da miosina ATPase, que hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico, a energia liberada pela quebra da ligação do grupamento fosfato é utilizada para continuar a interação miosina-actina, promovendo a contração do músculo (HOROWITZ et al., 1996; BERS, 2002; WEBB, 2003; PAIVA, FARIAS, 2005). Em CMLVs, a fosforilação da MLC é mantida em níveis reduzidos capazes de manter a contração ainda que na ausência de estímulos mecânicos ou da ativação de receptores e esta atividade resulta no tônus do músculo liso (NELSON et al., 1990; WEBB, 2003; KROON, 2011).

Quando ocorre a diminuição ou desaparecimento do estímulo (remoção de agonistas, hiperpolarização da membrana), o Ca^{2+} intracelular diminui para valores menores que $1\mu M$, o complexo cálcio/calmodulina se desfaz e se separa da MCLK, o que inativa a mesma, que por sua vez deixa de fosforilar a MLC, causando a inativação da miosina ATPase, conseqüentemente, o relaxamento do MLV (AKATA,

2007). Dentre os mecanismos de diminuição da concentração de Ca^{2+} no citosol e posterior vasorrelaxamento, pode-se citar o sequestro do Ca^{2+} para RS, diminuição da formação do IP_3 , extrusão dos íons Ca^{2+} pelas cálcio-ATPase e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ da membrana plasmática; diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; ou bloqueio direto dos canais de Ca^{2+} da membrana ou do RS (SALAMANCA; KHALIL, 2005).

Outro mecanismo importante para o relaxamento do MLV envolve o endotélio. O controle do tônus da musculatura lisa vascular pelo endotélio esta relacionada a produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são: o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina.

O NO é uma molécula gasosa lipofílica que atua em vários processos biológicos (COCKCROFT, 2005; VILLANUEVA GIULIVI, 2010). A precursora da síntese de NO é a L-arginina, na presença da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) que é a enzima responsável pela síntese do NO (MONCADA et al., 1991). Três isoformas de eNOS são descritas, sendo uma eNOS indutiva e duas eNOS constitutivas (ŠIMKO et al., 2007). O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) e a consequente formação de cGMP (guanosina monofosfato cíclico) intracelular. O aumento no GMPc ativa a proteína cinase G (PKG) (RASCADO, BENDHACKT, 2005) levando a ativação de canais para K^+ na membrana plasmática, e consequente hiperpolarização, reduzindo o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v do tipo L, diminuindo portanto o Ca^{2+} intracelular, com isso a miosina deixa de ser fosforilada, este estímulo no músculo liso vascular, promove vasodilatação. (REMBOLD, 1996; SALAMANCA, KHALIL, 2005). Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada (WENNMALM, 1994).

1.8 Considerações gerais sobre cardioproteção e atividade antioxidante

A manutenção da saúde cardíaca é essencial e qualquer disfunção que comprometa o coração resulta em consequências para todo o organismo (AKINMOLADUN et al., 2014). Para a manutenção da homeostase cardíaca, compostos considerados cardioprotetores são aliados, dentre esses compostos

pode-se ressaltar os que apresentam propriedades anti-trombótica, anti-isquêmica, vasorrelaxante, propriedades anti-hipertensivas e antioxidantes (ZERN, LUZ, 2005).

Os antioxidantes são considerados benéficos para o sistema cardiovascular, já que evidências bioquímicas, biológicas e clínicas mostram o envolvimento do estresse oxidativo induzido por radicais livres na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor do oxidantes, conduzindo a efeitos prejudiciais (SIES, 1997). Ao longo do processo evolutivo, o organismo vivo desenvolveu diversas maneiras de combater as espécies de reativas radicais através de ações enzimáticas como as da, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e também através de processos não enzimáticos utilizando substâncias com atividade antioxidante como, por exemplo, glutathione e ácido ascórbico (GONZÁLEZ-TORRES et al., 2000; CARTAYA, 2001; MARTÍNEZFLÓREZ et al., 2002).

A glutathione, possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, uma enzima envolvida no ciclo catalítico da glutathione é a glutathione redutase (GSH), que exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991; ROSS, 1988). A atividade antioxidante do GSH é mediada por dois mecanismos: primeiro, a GSH pode diretamente remover radicais livres; segundo, a GSH pode funcionar como um substrato para a glutathione peroxidase, eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (REED; FARISS, 1984).

Os oxidantes, também chamado de espécies reativas de oxigênio (EROs), são produto do metabolismo celular aeróbico por redução da molécula de oxigênio, inclui radicais livres, como superóxido, peroxinitrito e hidroxilo, e não-radicaís, tais como peróxido de hidrogênio (NICKENING, HARRISON, 2002). As EROs podem lesar moléculas como os lipídeos que são mais suscetíveis à oxidação. Os danos em lipídios são de grande importância, pois acarretam consequências importantes para a estrutura e função da membranas. Peroxidadas as membranas tornam-se rígidas e perdem permeabilidade e integridade. Além disso, o dano oxidativo de lipídeos tem efeitos generalizados, provocado pela peroxidação lipídica que

desencadeia uma reação em cadeia complexa que envolve uma série de reativos intermediários que podem causar danos a proteínas e também ao DNA (HULBERT et al., 2007). A degradação dos lipídeos de membrana e a peroxidação lipídica, leva a produtos finais como malondialdeído (MDA), considerado um marcador de estresse oxidativo (TUKAMOTO, 2008).

Outro componente que causa resistência ao estresse oxidativo é o sulfeto de hidrogênio (H₂S) que é considerado um regulador crítico de funções cardiovasculares e desempenha um papel protetor na patogênese e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (POLHEMUS, LEFER, 2014). De acordo com Yu et al., 2014 o H₂S é capaz de prevenir a geração de ROS, limpeza de ROS e fortalecimento do sistema antioxidante endógeno.

Considerando a importância das pesquisas com plantas medicinais com potencial atividade sobre o sistema cardiovascular para a obtenção de novos fármacos ou como modelos e ferramentas farmacológicas que direcionem o desenvolvimento destes fármacos, o extrato etanólico (Ssan-EtOH) e a fração hidroalcoólica de *Sida santaremnensis* (Ssan-HA) podem ser aliados em potencial, visto que, as pesquisas tem demonstrado que extratos de plantas desse gênero apresentam potencialidade farmacológica no sistema cardiovascular (KUBAVAT, ASDAQ, 2009; MENAKA et al., 2011).

O fracionamento dos extratos de plantas é um importante passo para a obtenção de compostos bioativos isolados, assim o extrato etanólico da espécie *S. santaremnensis* foi particionado em solventes de ordem crescente de polaridade, sendo obtido a fração hidroalcoólica, que foi fornecida pela Profa. Dra. Danielly Albuquerque da Costa da Universidade Federal de Campina Grande, Parnaíba.

Objetivos

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do extrato etanólico (Ssan-EtOH) e da fração hidroalcoólica (Ssan-HA) de *Sida santaremnensis* H. Monteiro sobre o sistema cardiovascular de roedores.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito vasorrelaxante da Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos.
- Examinar a participação das vias de relaxamento dependentes do endotélio vascular no vasorrelaxamento promovido pela fração (Ssan-HA) em anéis de artéria mesentérica.
- Verificar a participação dos canais para potássio no efeito induzido pela Ssan-HA; em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.
- Avaliar a participação dos canais para cálcio no efeito vasorrelaxante induzido pela Ssan-HA e anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.
- Investigar a atividade antioxidante do Ssan-HA em tecido cardíaco de camundongos.
- Verificar o efeito da Ssan-HA sobre a concentração de sulfeto de hidrogênio em tecido cardíaco de camundongos.
- Caracterizar o mecanismo de ação hipotensora do extrato etanólico (Ssan-EtOH) em ratos.

Material e métodos

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo* ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250 - 300 gramas e nos experimentos *ex vivo* camundongos Swiss pesando de 25 - 30 gramas, provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) mantidos sob condições controle de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Os experimentos foram realizados no período de 7:00 às 19:00hs.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI/Nº 08/12). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais (anestésico tiopental sódico 100 mg/kg i.p) estão em conformidade ao Parágrafo Único do Art. 2º da Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV.

3.2 Substâncias Químicas e Sais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados o cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN); o cloridrato de acetilcolina (ACh); cremofor; nitroprussiato de sódio (NPS); atropina; cloridrato de tetraetilamônio (TEA); L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil éster); ácido tricloroacético, ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoico); heparina; Tris 0,4M (tris(hidroximetil)aminometano); EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); Cloreto de potássio; Ácido fosfórico, ácido tiobarbitúrico; n-butanol; NaHS (Hidrossulfeto de sódio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), tiopental sódico (Cristália), salicilato de sódio, ácido ascórbico, NaOH (hidróxido de sódio) (Dinâmica).

Para a preparação das soluções-estoque, as drogas foram dissolvidas em água destilada e diluídas a concentrações adequadas. O extrato e a fração foram solubilizados em cremofor (0,1% v/v) e diluídos em salina ou água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações e doses, respectivamente, desejadas para cada protocolo experimental. Todas as soluções foram armazenadas a 0º C.

3.3 Soluções Nutritivas

A preparação das soluções nutritivas (Tyrode normal e KCl 80 mM) foram baseadas na metodologia desenvolvida por Tanaka et al. (1999). Foram utilizados os seguintes sais para a composição da solução de Tyrode normal e com modificações: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). A solução despolarizantes de KCl 80 mM foi obtida com alterações isosmolar nas concentrações de NaCl e KCl. Após o preparo das soluções mediu-se o pH e ajustou-se para 7,4 quando necessário (tabela 1).

TABELA 01. Composição da solução de Tyrode normal e outras soluções com modificações.

Soluções/ Substâncias	Tyrode Normal	KCl 80 mM	KCl 20 mM
NaCl	158,3*	82,3*	142,3*
KCl	4,0*	80,0*	20,0*
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0*	2,0*	2,0*
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0*	1,0*	1,0*
NaHCO_3	10,0*	10,0*	10,0*
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,4*	0,4*	0,4*
Glicose	5,6*	5,6*	5,6*

*Concentrações em mM

FONTE: SILVA-FILHO, 2012; SANTOS, 2014.

4.0 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Foram realizados ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos normotensos, ensaios farmacológicos *ex vivo*, utilizando tecido cardíaco de camundongos. Na abordagem *in vivo*, foram utilizados animais normotensos.

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “IN VITRO”

4.1.1 Preparação de anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos com ou sem endotélio vascular

Os animais foram submetidos ao processo de eutanásia por anestesia com tiopental sódico (100 mg/Kg, i.p.) de acordo com a resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012, sob a responsabilidade da médica veterinária Dr. Adeline de Andrade Carvalho.

Após laparotomia, a artéria mesentérica superior foi retirada e livre de tecido conectivo e adiposo. Anéis do primeiro segmento da artéria (2- 4 mm) foram obtidos, livres de tecido conectivo e mantidos em cubas contendo 6 mL de solução de Tyrode, a 37 °C e aerados com uma mistura de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis foram acoplados a alças de aço inoxidável e suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de tensão acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 1604, software AQCAD 2.3.6, AVS Projetos, SP) para o registro das tensões isométricas (figura 2 e 3). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 gf por um período de 60 minutos. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA, ALTURA, 1970).

Os anéis sem endotélio vascular foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes externa do vaso com uma haste de metal. A presença do endotélio vascular foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10⁻⁵ M de acetilcolina (ACh). Foram considerados com endotélio funcional os anéis com relaxamento superior a 70% da pré-contracção com fenilefrina (10⁻⁵ M). Já os anéis com relaxamento inferior a 10%, foram considerados sem endotélio funcional (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamento entre 10 e 70% foram descartados.

Efeito do extrato etanólico e da sua fração hidroalcolólica obtidos das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) sobre o sistema cardiovascular de roedores. Fabiana de Moura Souza. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia–UFPI, 2016.

FIGURA 2 - A – Artéria mesentérica superior isolada de rato, B – Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolado de rato em solução de Tyrode, C - Sistema de cubas para órgão isolado do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do NPPM - UFPI - AVS Projetos, SP.

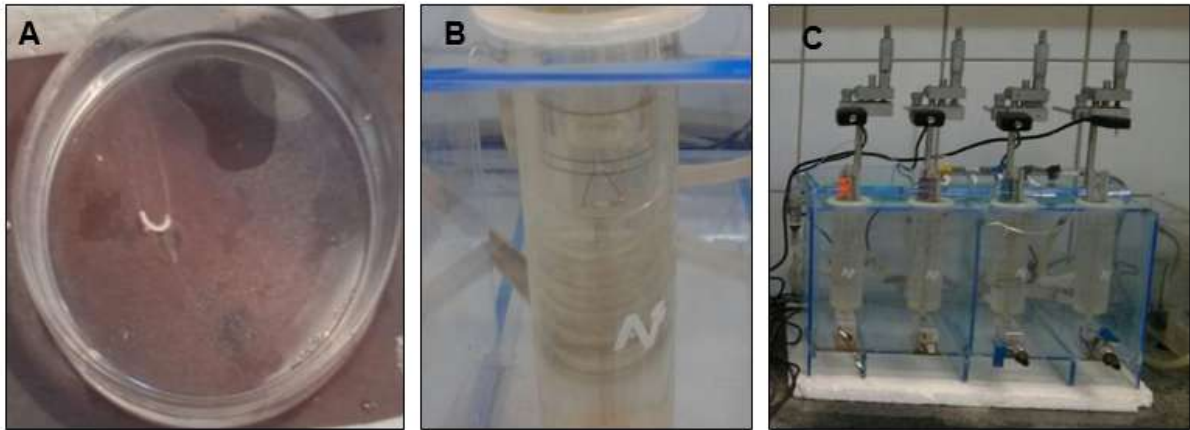


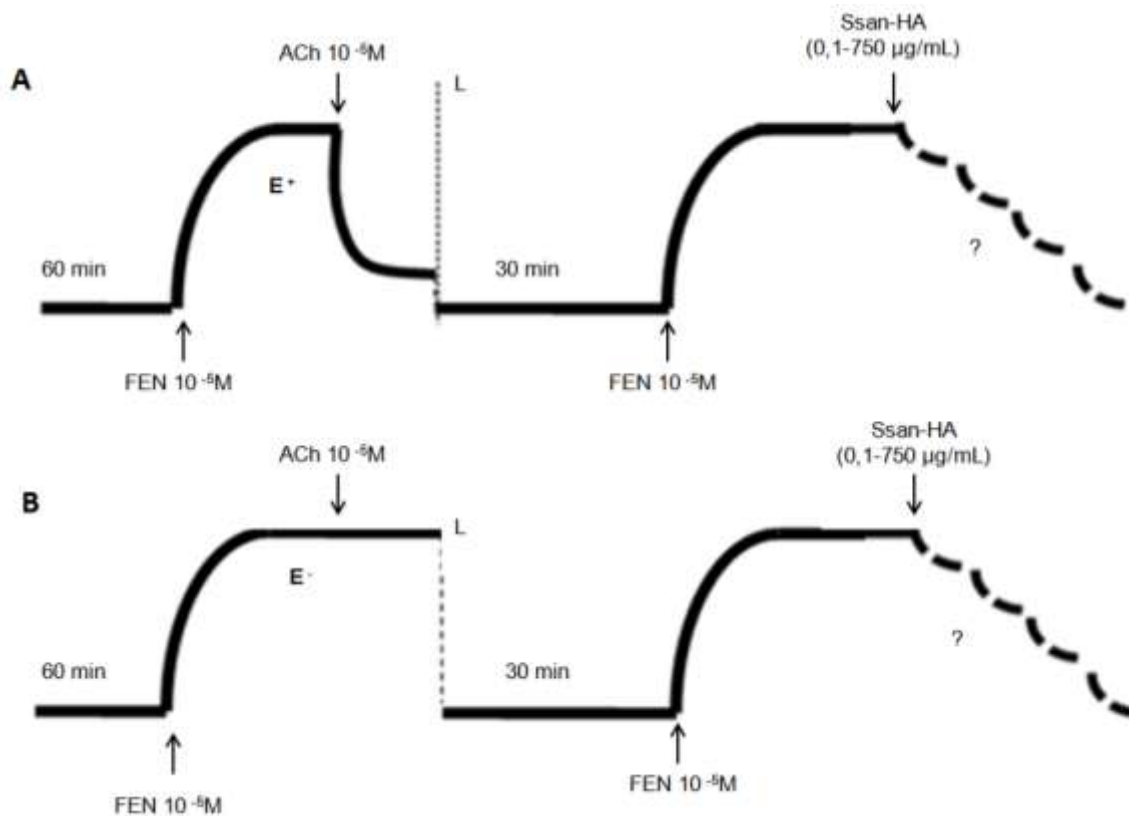
FIGURA 3 - Sistema de aquisição de dados do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do NPPM - UFPI (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP).



4.1.2 Verificação do efeito do Ssan-HA sobre contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica de ratos

Após um período de estabilização de 60 minutos, durante a fase tônica de uma pré-contracção com fenilefrina 10^{-5} M, foi adicionado cumulativamente o Ssan-HA nas concentrações (0,1 - 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) às cuba, (figura 4) para obtenção de uma curva concentração-resposta. Os experimentos foram realizados de acordo com ADARAMOYE et al. (2009). A potência vasorrelaxante e a resposta por Emáx da Ssan-HA foi avaliada através dos valores de pD_2 na presença ou na ausência do endotélio vascular.

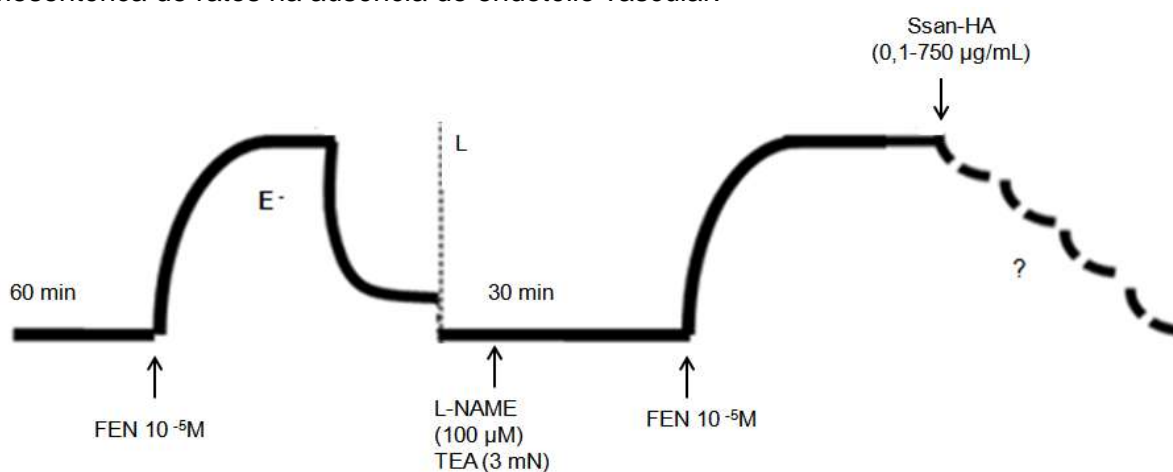
FIGURA 4. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito vasorrelaxante induzido por Ssan-HA (0,1 - 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica pré-contráidos com FEN na presença (A) e na ausência do endotélio vascular (B).



4.1.3 Verificação da participação da eNOS e dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos

Os anéis de artéria mesentérica com endotélio vascular foram pré-incubados por 30 minutos com L-NAME (100 μM), um inibidor competitivo da NO sintase (REES et al, 1989) ou TEA (3 mM), um bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (MA et al, 2008). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M), na fase sustentada da contração adicionou-se de maneira cumulativa a Ssan-HA (0,1 - 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (figura 5). A resposta obtida foi comparada com o controle na ausência do L-NAME ou TEA 3 mM. A potência vasorrelaxante da Ssan-HA foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 na presença e na ausência do inibidor competitivo da eNOS ou do TEA 3 mM. Os experimentos foram realizados de acordo com Monteiro et al. (2012).

FIGURA 5. Protocolo experimental para verificação da participação da eNOS e dos canais de potássio na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos na ausência do endotélio vascular.

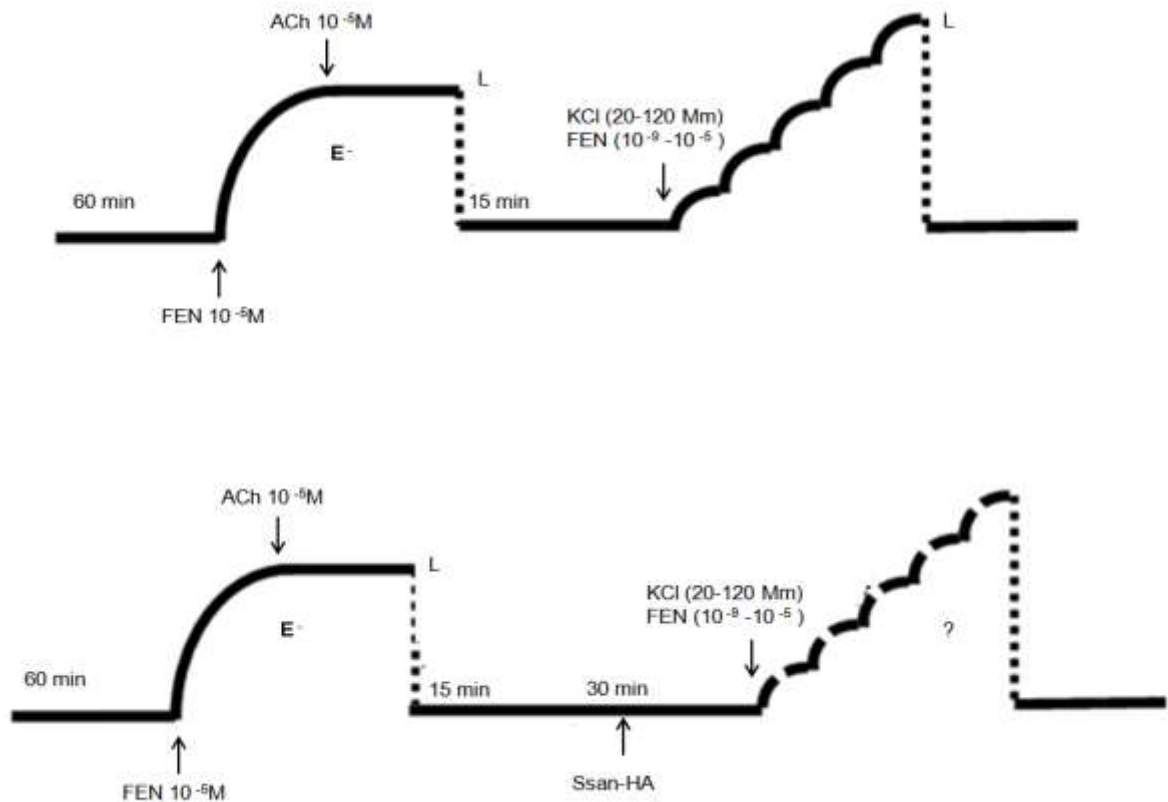


4.1.4 Investigação do efeito inibitório das contrações cumulativas de FEN e KCl promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos

Após a obtenção de uma curva controle a partir de adições cumulativas de FEN (10^{-9} - 10^{-5}) ou KCl (20 - 120 mM), as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores ao tônus basal, incubou-se por 30 minutos, separadamente concentrações do Ssan-HA (80, 250, 500 e 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após esse processo as preparações foram submetidas novamente a adição cumulativa de FEN (10^{-9} - 10^{-5}) ou KCl (20 - 120 mM) para obtenção de uma segunda curva concentração-resposta

(figura 6). Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do Ssan-HA com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do Ssan-HA).

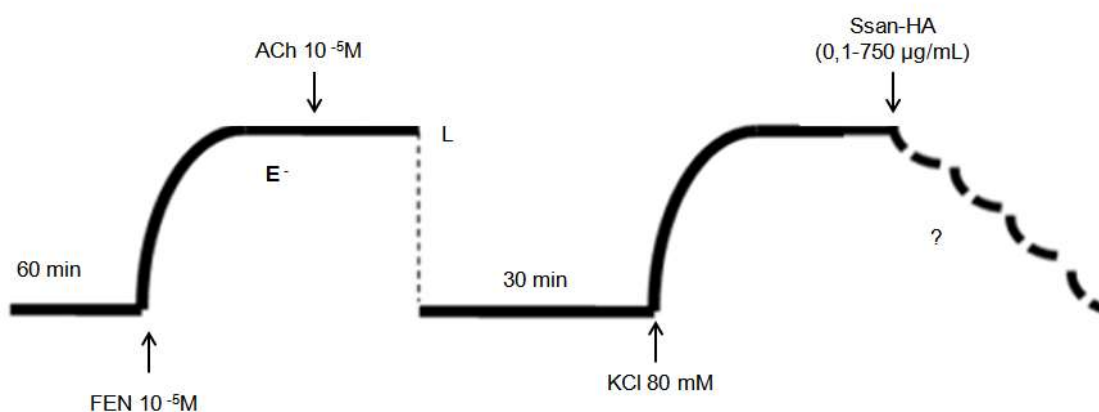
FIGURA 6. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da inibição das contrações induzidas por concentrações de KCl ou FEN cumulativas em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional na presença e ausência do Ssan-HA (81, 243, 500 e 750 µg/mL).



4.1.5 Investigação da participação dos canais de Ca^{2+} no efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos

Após procedimentos realizados para verificação da presença ou da ausência do endotélio vascular, como descrito no item 4.1.1, nos anéis de artéria sem endotélio vascular a solução de tyrode da cuba foi substituída por uma solução de KCl 80 mM (tabela 1) que permaneceu durante todo o experimento (figura 7). Nesta concentração de potássio externo ocorre uma despolarização que promove uma contração por aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular através de Ca_v tipo L e T (OLIVEIRA et al, 2006). No componente tônico desta contração, a fração Ssan-HA foi adicionada de maneira cumulativa (0,1 - 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para obtenção de uma curva concentração-resposta. A potência vasorrelaxante da fração foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 .

FIGURA 7. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito vasorrelaxante induzido por Ssan-HA (0,1 - 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl 80 mM, na ausência do endotélio vascular.



4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “EX VIVO”

4.2.1 Protocolo experimental

Camundongos Swiss (25 - 30g), foram divididos aleatoriamente em 04 grupos: Grupo I, os animais foram pré-tratados por via i.p. com salina, no grupo II foi administrado a Ssan-HA 1mg/kg i.p., no grupo III foi administrado 10 mg/Kg (i.p.) da Ssan-HA e o grupo IV foi tratado com a Ssan-HA na dose de 20 mg/kg (i.p.). Quatro

horas após o tratamento os animais foram eutanasiados e o coração foi removido para dosagem de glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e sulfeto de hidrogênio (H₂S).

4.2.2 Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH) em tecido cardíaco de camundongos

Conforme os procedimentos de Horn e Burns (1978), 100 µL de homogenato do tecido cardíaco foi precipitado pela adição de 200 µL de TCA 5% (ácido tricloroacético) e em seguida agitados. A mistura então foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Retirou-se 75 µL do sobrenadante e adicionou-se 150 µL de Tris 0,4M EDTA 0,2 M pH 8,9 e 40 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico). As dosagens foram realizadas em espectrofotômetro de luz visível a 412 nm (ELLMAN, 1959).

4.2.3 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no tecido cardíaco de camundongos

Os níveis de MDA foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Para avaliar os níveis de MDA, fragmentos do tecido cardíaco pesando entre 50 e 100 mg foram homogeneizados com KCl 1,15% para preparar 10% do homogenato. Em seguida, 250 µl do homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 mL, contendo 1,5 ml de H₃PO₄ (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água a 100°C e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram homogeneizadas em agitador por 1 minuto, e centrifugados a 1200 x g por 10 minutos. A absorvância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535 nm, sendo o resultado obtido pela diferença de absorvância nas duas leituras (ELLMAN, 1959).

4.2.4 Determinação da concentração do sulfeto de hidrogênio (H₂S) no tecido cardíaco de camundongos

Após o tratamento os animais foram eutanasiados, o coração foi removido em seguida o tecido cardíaco foi homogeneizado no tampão antioxidante diluído (que contém salicilato de sódio, ácido ascórbico e NaOH), que converte o H₂S em S²⁻, que então foi mensurado nesse homogenato a 10% por um microeletrodo de íon sulfeto (Laboratório de Físio-Farmacologia Experimental – UFPI) ligado a um medidor de pH modelo 6230M (Jenco Instruments), seguindo as especificações do fabricante. As soluções padrões foram preparadas usando-se NaHS (GU et al., 2013).

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL “IN VIVO”

4.3.1 Medida direta da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal dos animais foi realizada separando a musculatura para localização do feixe de vasos e nervos, seguido da dissecação e exposição da artéria e veia femorais. Catéteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na artéria e veia femoral esquerda. Após a inserção e fixação, os catéteres foram encapsulados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*) e foram mantidos com solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PA (OLIVEIRA et al., 1996) (figura 10).

A PA e FC foram medidas 24 h após a cirurgia pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (AVS projetos – SP/Brasil) conectado a um microcomputador equipado com placa conversora analógico-digital e com o programa AQCAD (AVS projetos – SP/Brasil) (figura 8). A frequência

escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca).

FIGURA 8. Sistema de aquisição de dados para registro da PA e FC em ratos normotensos não anestesiados.



4.3.2 Protocolo experimental para verificação do efeito do EtOH-Ssan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, as aferições da pressão arterial foram realizadas conforme a descrição de Lahlou, (2002). Os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 60 min para estabilização dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Em seguida administrou-se nitroprussiato de sódio (10 µg/Kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter. Após 30 min, doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v.) foram administradas com intervalos de tempo suficiente (± 30 min) para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais normotensos que receberam nitroprussiato de sódio (10 µg/Kg i.v.).

Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, e suas variações foram expressas como diferença da pressão arterial média/frequência cardíaca final menos a inicial: $\Delta PAM = PAM_f - PAM_i$ / $\Delta FC = FC_f - FC_i$, onde PAM_f: pressão arterial média final, PAM_i: pressão arterial média inicial, FC_f: frequência cardíaca final, FC_i: frequência cardíaca.

4.3.3 Investigação da participação da eNOS no efeito hipotensor e bradicárdico promovido pelo Ssan-EtHO em ratos

Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos utilizou-se NPS 10 µg/Kg (i.v.), um doador de óxido nítrico (CASTRO et al., 2011), como controle positivo. Após o retorno ao seu estado basal (\approx 30 min) os animais foram tratados com L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima NO-sintase na dose de (20 mg/kg⁻¹ i.v.), e após 30 min do bloqueio uma curva dose-resposta para Ssan-EtOH (0,5, 1, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) foi obtida e os valores da PAM e FC foram então registrados como descrito no item 4.3.1.

4.3.4 Investigação da participação dos receptores muscarínicos no efeito hipotensor e bradicárdico do Ssan-EtOH de ratos

Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos utilizou-se NPS 10 µg/Kg (i.v.), um doador de óxido nítrico (CASTRO et al., 2011), como controle positivo. Após o retorno ao seu estado basal (\approx 30 min) os animais foram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984), e após 30 min do bloqueio uma curva dose-resposta para Ssan-EtOH (0,5, 1, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) foi obtida e os valores da PAM e FC foram então registrados como descrito no item 4.3.1.

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para os ensaios *in vitro* foram utilizados:

- Teste-*t* de “*Student*” para análise de significância entre as médias para amostras não pareadas;

- Foram analisados também, os parâmetros farmacológicos de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência pelos valores pD_2 (Logaritmo negativo da concentração da droga que promove 50% da resposta máxima) através de regressões não lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas obtidas com as substâncias testadas.

- Para os ensaios *in vivo* foram utilizados:

- Teste-*t* de “*Student*” não pareado para avaliar se há significância nas diferenças entre as médias.

- Para os ensaios *ex vivo* foram utilizados:

- ANOVA “one-way”, seguido do teste de Newman Keuls, para análise de significância entre as médias.

Consideraram-se estatisticamente significantes os valores para $*p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico Graph-PadPrims[®] 6.00 (Graph-PadPrism Software Inc., San Diego, CA, USA).

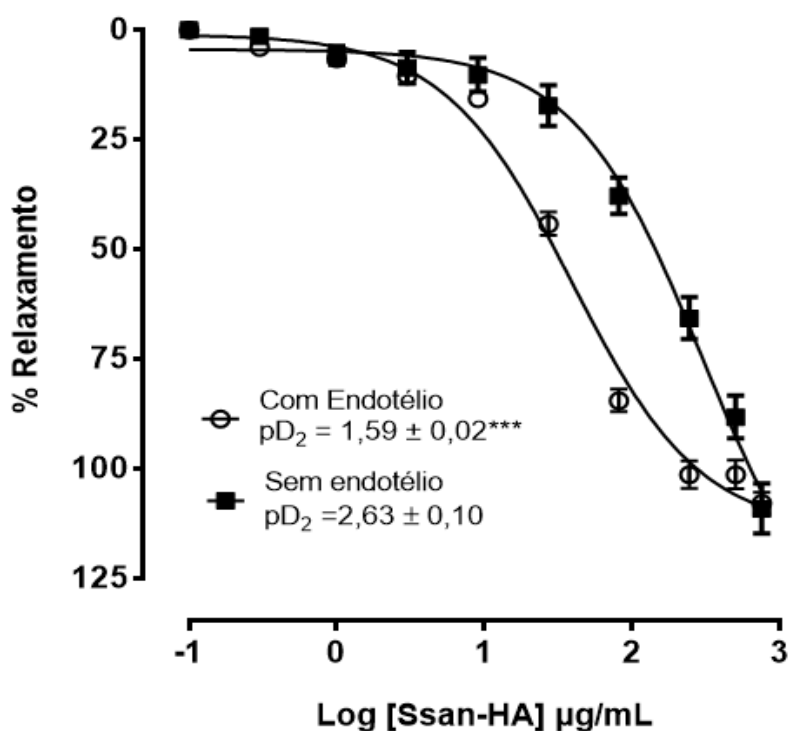
Resultados

6.0 RESULTADOS

6.1 Efeito da Ssan-HA sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isoladas de ratos

A fração Ssan-HA promoveu vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração (0,1 – 750 µg/mL) em preparações de artéria mesentérica com endotélio funcional ($pD_2 = 1,42 \pm 0,04$), este efeito foi atenuado após a remoção do endotélio vascular ($pD_2 = 2,01 \pm 0,05$), porém sem alteração no efeito máximo (Com endotélio $E_{m\acute{a}x} = 107,79 \pm 2,45$; sem endotélio $E_{m\acute{a}x} = 109,08 \pm 5,71$ %) (figura 9). Após o experimento controle, as preparações foram lavadas por 30 min e induziu-se então uma contração com fenilefrina para verificação da reversão do relaxamento induzido por Ssan-HA, e em todas as preparações houve uma reversão de 100% da resposta contrátil.

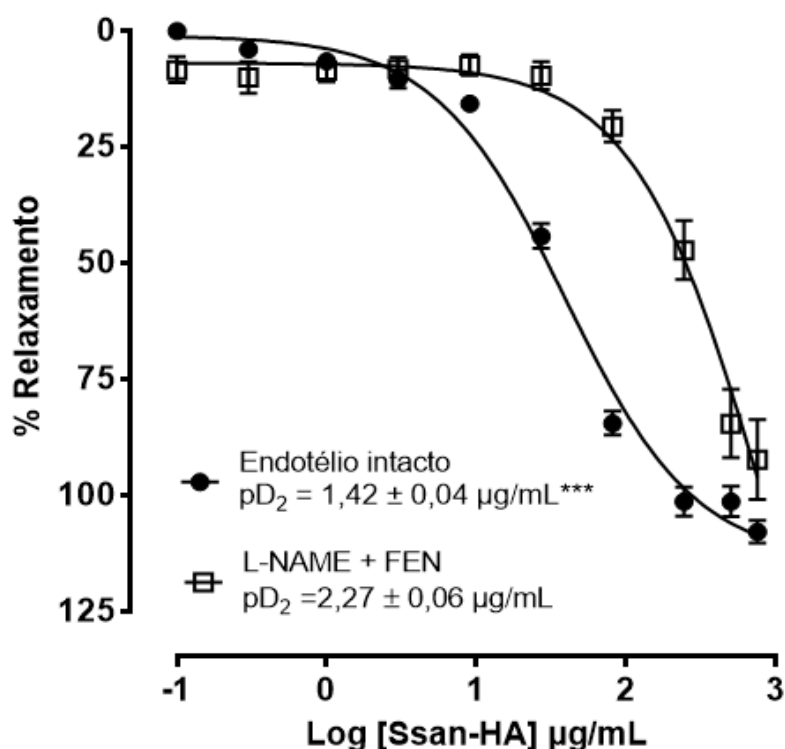
FIGURA 9 – Curvas concentração-resposta de Ssan-HA (0,1 – 750 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídas com fenilefrina, na presença (○) ou na ausência (■) do endotélio vascular. Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos.*** $p < 0,05$, teste de *t* de Student.



6.2 Efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos na presença do inibidor da eNOS

Na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo da eNOS, a curva concentração-resposta da Ssan-HA foi deslocada para a direita de maneira significativa com aumento significativo do pD_2 (Endotélio intacto $pD_2 = 1,42 \pm 0,04$; L-NAME+FEN $pD_2 = 2,27 \pm 0,06$), com diminuição do efeito máximo 1,6 vezes na presença do L-NAME ($E_{\text{máx}} = 107,79 \pm 2,45$; L-NAME + FENIL $E_{\text{máx}} = 92,31 \pm 8,58$ %) (figura 10), caracterizando assim uma atenuação do vasorrelaxamento induzido pela Ssan-HA na presença do L-NAME.

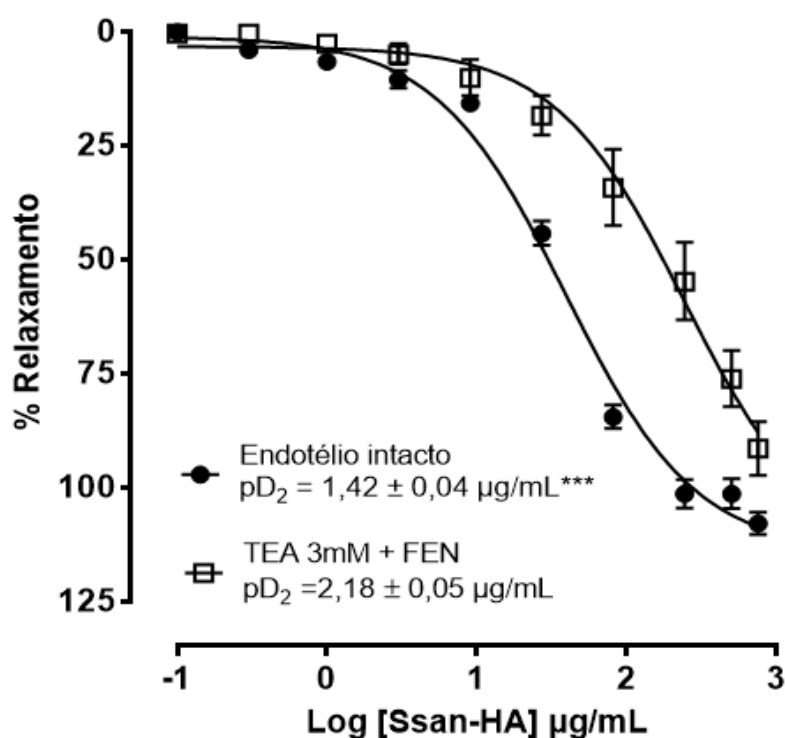
FIGURA 10– Curvas concentração-resposta Ssan-HA (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio isolados de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10^{-5} M) na ausência (●) e na presença de L-NAME (□). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,05$, teste de t de Student.



6.3 Efeito vasorrelaxante induzido pela Ssan-HA na presença de TEA 3mM em anéis de artéria mesentérica de ratos

Na presença do TEA 3mM, um bloqueador inespecífico dos canais para potássio, a curva concentração-resposta da Ssan-HA foi deslocada para a direita de maneira significativa com aumento significativo do pD_2 (Endotélio intacto $pD_2 = 1,42 \pm 0,04$; TEA 3mM + FEN $pD_2 = 2,18 \pm 0,05$), com diminuição do efeito máximo 1,54 vezes na presença do TEA 3mM ($E_{max} = 107,79 \pm 2,45$; TEA 3mM + FEN $E_{max} = 91,39 \pm 5,84$ %) (figura 11), caracterizando assim uma atenuação do vasorrelaxamento induzido pela Ssan-HA na presença do TEA 3mM.

FIGURA 11 – Curvas concentração-resposta do Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio isolados de ratos, na ausência (●) ou na presença (□) de TEA 3 Mm + FEN. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,05$, teste de t de Student.



6.4 Efeito inibitório da Ssan-HA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica de ratos

As curvas concentração-resposta da cumulativa para fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) foram deslocadas para direita com redução do efeito máximo: 1,40 vezes na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$, 1,61 vezes na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1,82 vezes na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, (pD_2 : Controle = $7,11 \pm 0,04$; 81 $\mu\text{g/mL}$ = $6,00 \pm 0,04$; 243 $\mu\text{g/mL}$ = $5,09 \pm 0,06$; 500 $\mu\text{g/mL}$ = $4,41 \pm 0,02$; 750 $\mu\text{g/mL}$ = $3,90 \pm 0,041$ respectivamente) ($E_{\text{máx}}$: 98,71 \pm 0,00; 91,64 \pm 2,27; 51,11 \pm 6,32; 20,16 \pm 2,15; 7,22 \pm 0,01 respectivamente). Caracterizando um efeito inibitório da Ssan-HA de maneira dependente de concentração (figura 12, tabela 02).

FIGURA 12 – Curvas concentração-resposta para FEN na presença de concentrações isoladas do Ssan-HA. Controle (\diamond); 81 $\mu\text{g/mL}$ (\bullet); 243 $\mu\text{g/mL}$ (\circ); 500 $\mu\text{g/mL}$ (\blacklozenge) e 750 $\mu\text{g/mL}$ (\triangle) em anéis de artéria mesentérica isolados de ratos sem endotélio funcional. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,05$, ANOVA.

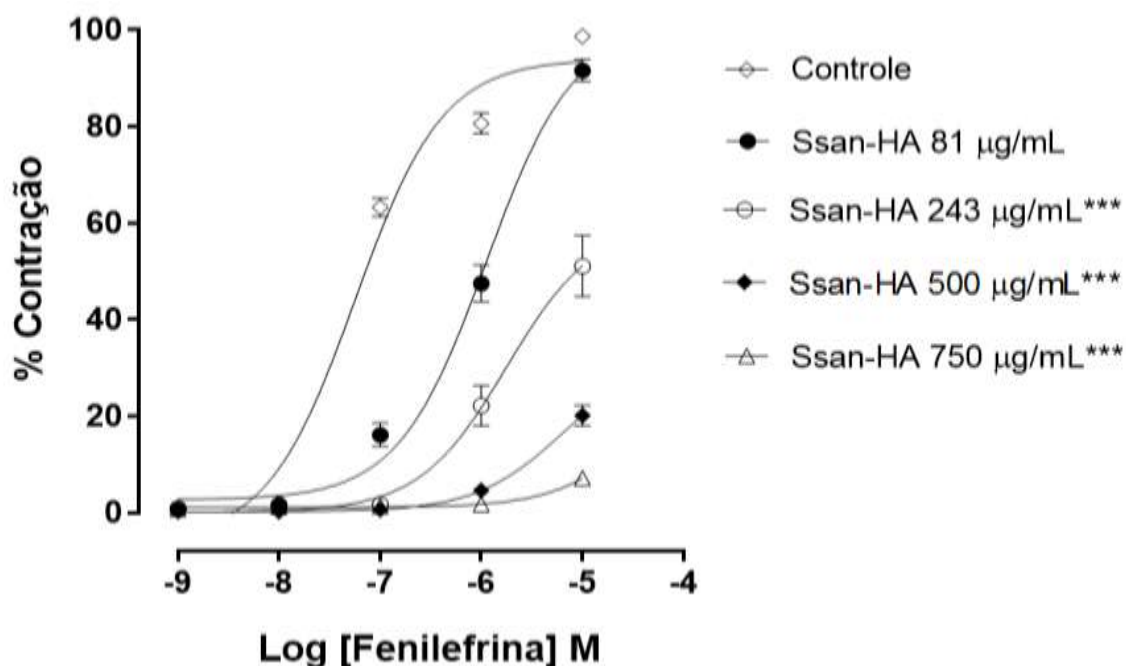


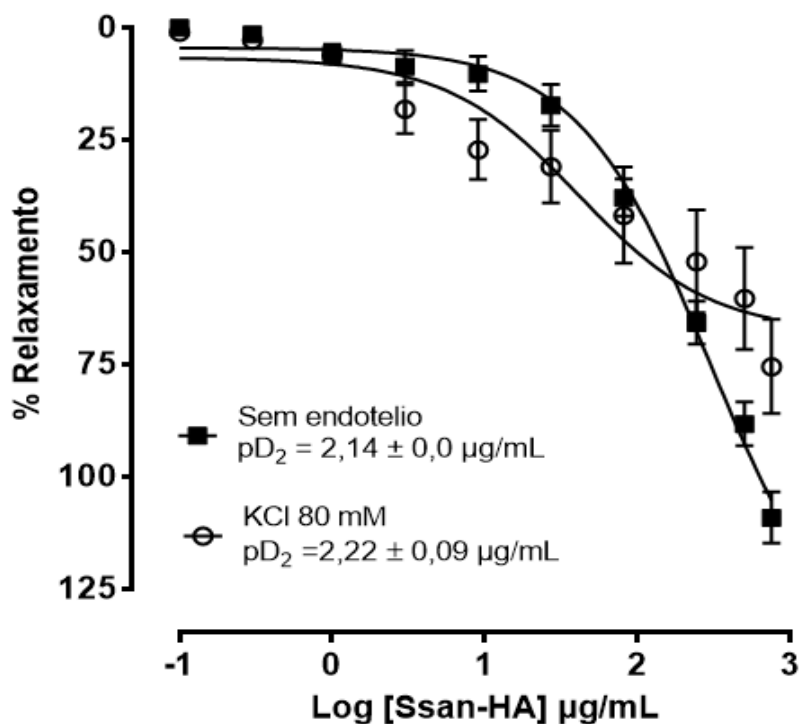
Tabela 02 – Valores do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e do logaritmo negativo da concentração da fração que promove 50% da resposta máxima (pD_2) das contrações induzidas pela adição cumulativa de FEN (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas da Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$).

Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2 FEN
Controle	98,71 \pm 0,00	7,11 \pm 0,04
81	91,64 \pm 2,27	6,00 \pm 0,04
243	51,11 \pm 6,32***	5,09 \pm 0,06
500	20,16 \pm 2,15***	4,41 \pm 0,02
750	7,22 \pm 0,01***	3,90 \pm 0,041

6.5 Efeito da Ssan-HA sobre contrações sustentadas induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional pré-contraídas com KCl 80 mM, concentrações cumulativas de Ssan-HA promoveram vasorrelaxamento (pD_2 : Sem endotélio = 2,14 \pm 0,05; KCl 80 = 2,22 \pm 0,09 $\mu\text{g/mL}$) com redução do efeito máximo 1,03 vezes na presença do KCl 80 mM ($E_{m\acute{a}x}$: Sem endotélio = 109,08 \pm 5,71 %; KCl 80 mM = 75,42 \pm 10,51), não ocorrendo diferença estatística quando comparado com o vasorrelaxamento após uma pré-contração com FEN (figura 13).

FIGURA 13 - Curvas concentração-resposta para o Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio e pré-contraídas com FEN (■) ou KCl 80 mM (○). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,05$, teste de *t* de Student.



6.6 Efeito inibitório da Ssan-HA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de KCl em anéis de artéria mesentérica de ratos

A pré-incubação com concentrações isoladas (81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$) da Ssan-HA por 30 minutos inibiu significativamente, as contrações induzida por KCl (20 – 120 mM) com redução do efeito máximo: 1,34 vezes na concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$, 1,26 vezes na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$, 1,25 vezes na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 3,10 vezes na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, ($E_{\text{máx}}$: $100,00 \pm 2,63$; $70,25 \pm 2,74$; $67,53 \pm 2,44$; $73,04 \pm 3,69$; $34,06 \pm 4,40$ respectivamente) (pD_2 : $1,35 \pm 0,04$; $1,81 \pm 0,03$; $1,71 \pm 0,06$; $1,69 \pm 0,03$; $2,30 \pm 0,03$). Caracterizando um efeito inibitório da Ssan-HA de maneira independente de concentração (figura 14, tabela 3).

FIGURA 14 – Curvas concentração-resposta para KCl na presença de concentrações isoladas do Ssan-HA. Controle (\diamond); 81 $\mu\text{g/mL}$ (\bullet); 243 $\mu\text{g/mL}$ (\circ); 500 $\mu\text{g/mL}$ (\blacklozenge) e 750 $\mu\text{g/mL}$ (\triangle) em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos sem endotélio funcional. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,05$, ANOVA.

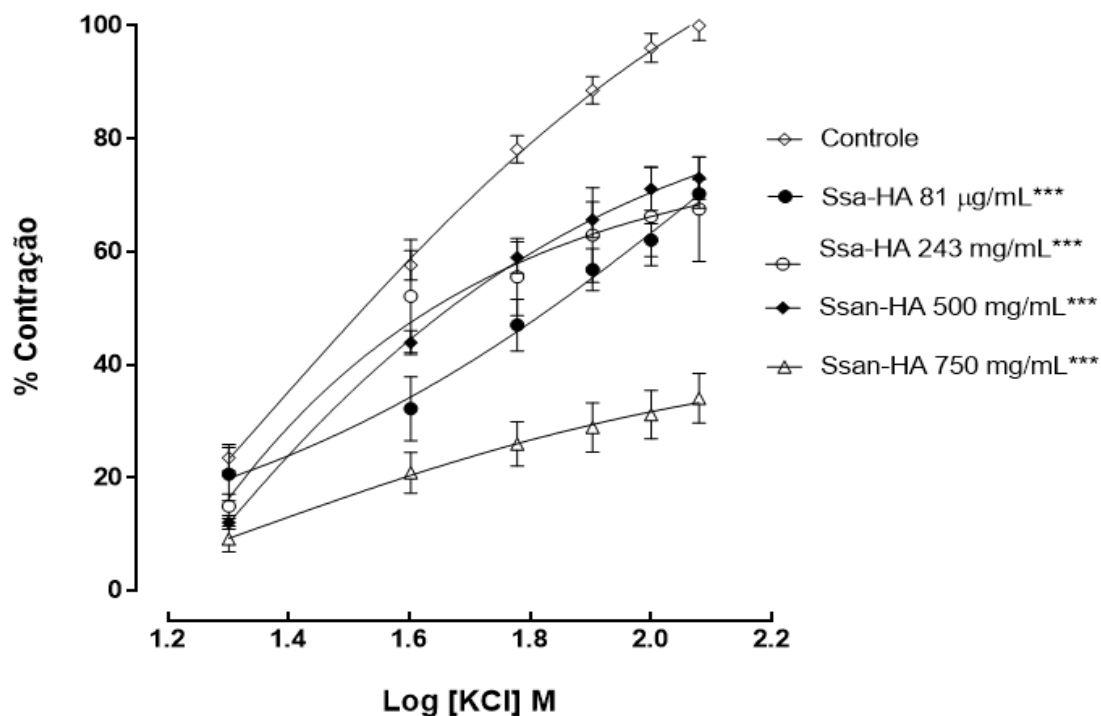


Tabela 03 – Valores de efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) das contrações induzidas pela adição cumulativa de KCl (20 – 120 mM) na presença de concentrações isoladas da Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$).

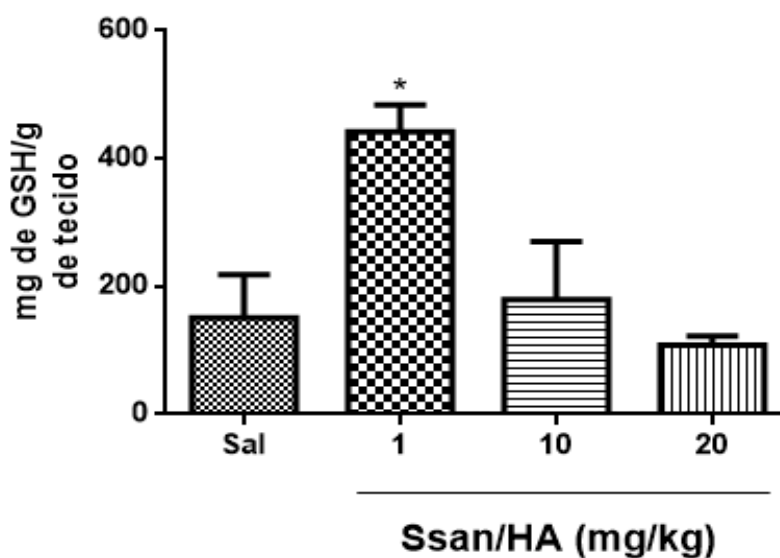
Ssan-HA ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{\text{máx}}$ (%)	pD_2 KCl
Controle	100,00 \pm 2,63	1,35 \pm 0,04
81	70,25 \pm 2,74	1,81 \pm 0,03
243	67,53 \pm 2,44	1,71 \pm 0,06
500	73,04 \pm 3,69	1,69 \pm 0,03
750	34,06 \pm 4,40***	2,30 \pm 0,03

6.7 Efeito da Ssan-HA sobre os níveis de glutathiona redutase em tecido cardíaco de camundongos

Observou-se através da análise de GSH que o grupo que foi administrado a dose de 1 mg/kg aumentou significativamente os níveis de GSH (441,7 ± 42,83 mg de NPSH/gde tecido) quando comparado com o grupo controle (salina: 151,4 ± 66,67 mg de NPSH/gde tecido).

Os grupos tratados com as doses de 10 e 20 mg/kg da Ssan-HA não demonstraram diferenças significativas comparando com o grupo controle (salina), ou entre as doses analisadas: 10 mg/Kg (179,8 ± 90,37mg de NPSH/gde tecido) e 20 mg/kg (108,4 ± 14,25mg de NPSH/gde tecido) (figura 15).

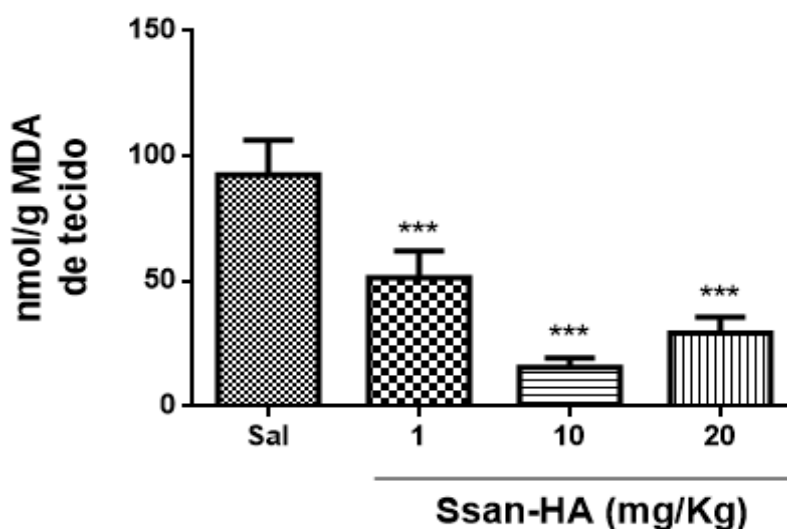
FIGURA 15 – Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a atividade da GSH no tecido cardíaco de camundongos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M., * $p < 0,05$, (ANOVA one-way seguida pelo teste de Newman Keuls) n=6.



6.8 Efeito da Ssan-HA sobre a concentração de malondialdeído em tecido cardíaco de camundongos

A concentração de MDA nos grupos tratados com todas as doses da Ssan-HA diminuiu significativamente quando comparado com o grupo controle (salina: $92,47 \pm 13,93$ nmol/g MDA de tecido; $51,48 \pm 10,69$ nmol/g MDA de tecido; $15,73 \pm 3,64$ nmol/g MDA de tecido; $29,32 \pm 6,39$ nmol/g MDA de tecido;). Não houve diferença significativa entre as doses analisadas (figura 16).

FIGURA 16 – Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a atividade da GSH no tecido cardíaco de camundongos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., *** $p < 0,05$, (ANOVA one-way seguida pelo teste de Newman Keuls) $n=6$.

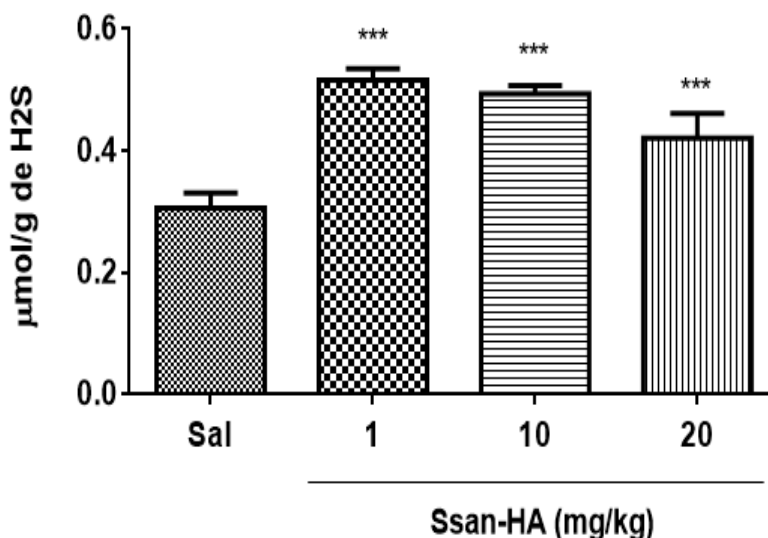


6.9 Efeito da Ssan-HA nos níveis de sulfeto de hidrogênio em tecido cardíaco de camundongos

Os níveis de H_2S no tecido cardíaco de camundongos se elevaram de maneira significativa nos grupos que foram tratados com as doses de 1, 10 e 20 mg/kg quando comparado com o grupo controle ($0,30 \pm 0,03$; $0,52 \pm 0,02$; $0,50 \pm 0,01$ e $0,42 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido respectivamente). Não houve diferença significativa entre os valores médios dos níveis de H_2S nos grupos de

animais que receberam tratamento com doses de 1, 10 e 20 mg/kg da Ssan-HA (figura 17).

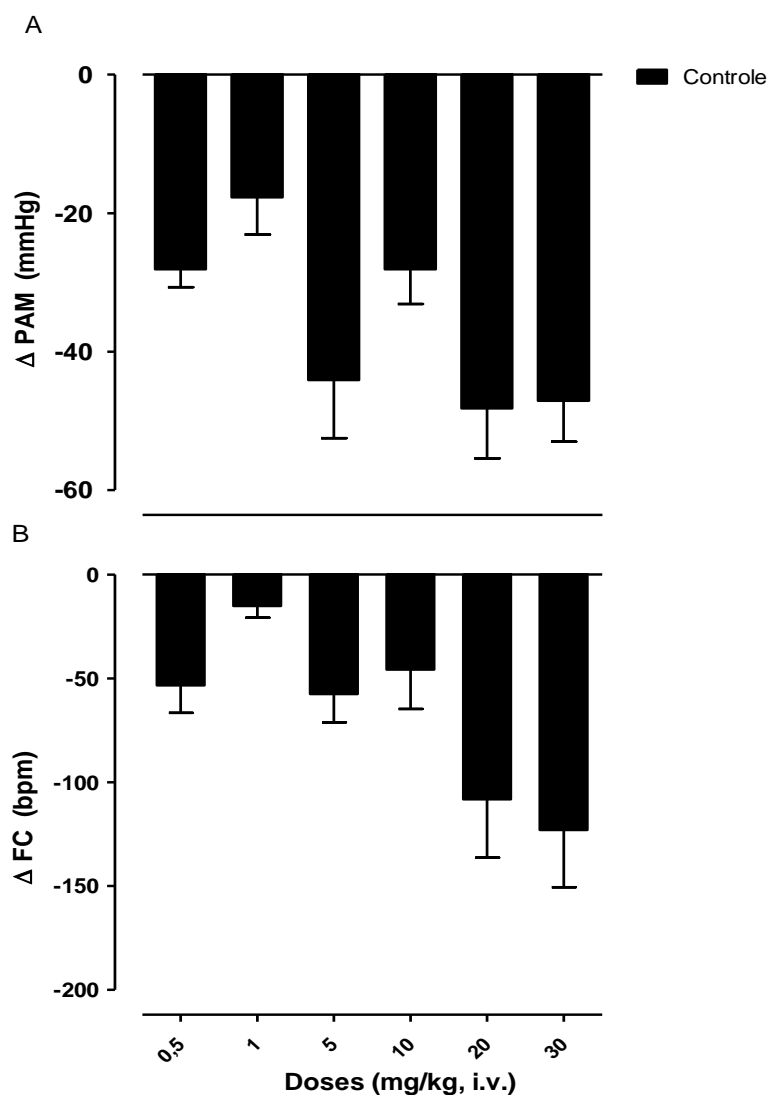
FIGURA 17 – Efeito da Ssa-HA nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg após quatro horas sobre a concentração do H₂S no tecido cardíaco de camundongos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M., ****p*<0,05, (ANOVA one-way seguida pelo teste de Newman Keuls) n=6.



6.10 Efeito Ssan-EtOH sobre a Pressão arterial e Frequência Cardíaca em ratos

O extrato etanólico das partes aéreas de *S. santareminensis* - Ssan-EtOH nas doses (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v.) foi capaz de promover hipotensão (-28,1 ± 2,6; -17,7 ± 5,4; -44,1 ± 8,4; -28,1 ± 5,0; -48,2 ± 7,2; -47,1 ± 5,9 mmHg, respectivamente) associado a bradicardia (-53,3 ± 13,3; -15,1 ± 5,7; -57,5 ± 13,7; -45,7 ± 19,0; -108,2 ± 28,1; -122,9 ± 27,7 bpm, respectivamente) em ratos não-anestesiados. Ambos os efeitos de forma independente da dose (figura 18 A e B).

FIGURA 18: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n= 5).

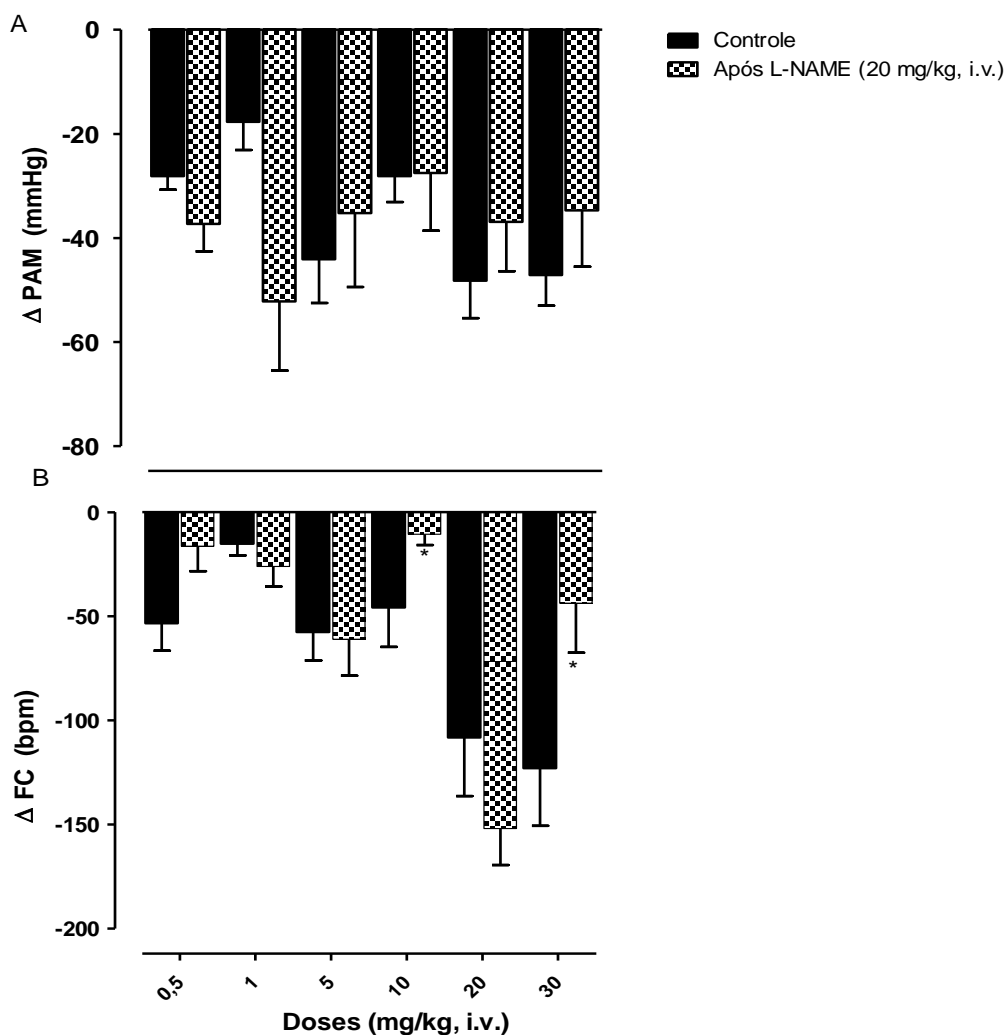


6.11 Efeito do Ssan-EtOH sobre a PAM e FC antes e após a administração de L-NAME em ratos

Na presença de L-NAME, um inibidor da enzima NO-sintase na dose de (20 mg/kg⁻¹ i.v.), a resposta hipotensora induzida pela administração do extrato (0,5, 1, 5, 10, 20 e 30 mg/kg), não foi alterada de forma significativa (-37,3; -52,2; -35,2; -27,5; -36,9 e -34,7 mmHg, respectivamente), no entanto, houve uma alteração significativa em relação a bradicardia nas doses de (0,5 e 30 mg.kg⁻¹ i.v.).

Caracterizando assim uma atenuação da bradicardia de maneira independente da dose (figura 19 A e B).

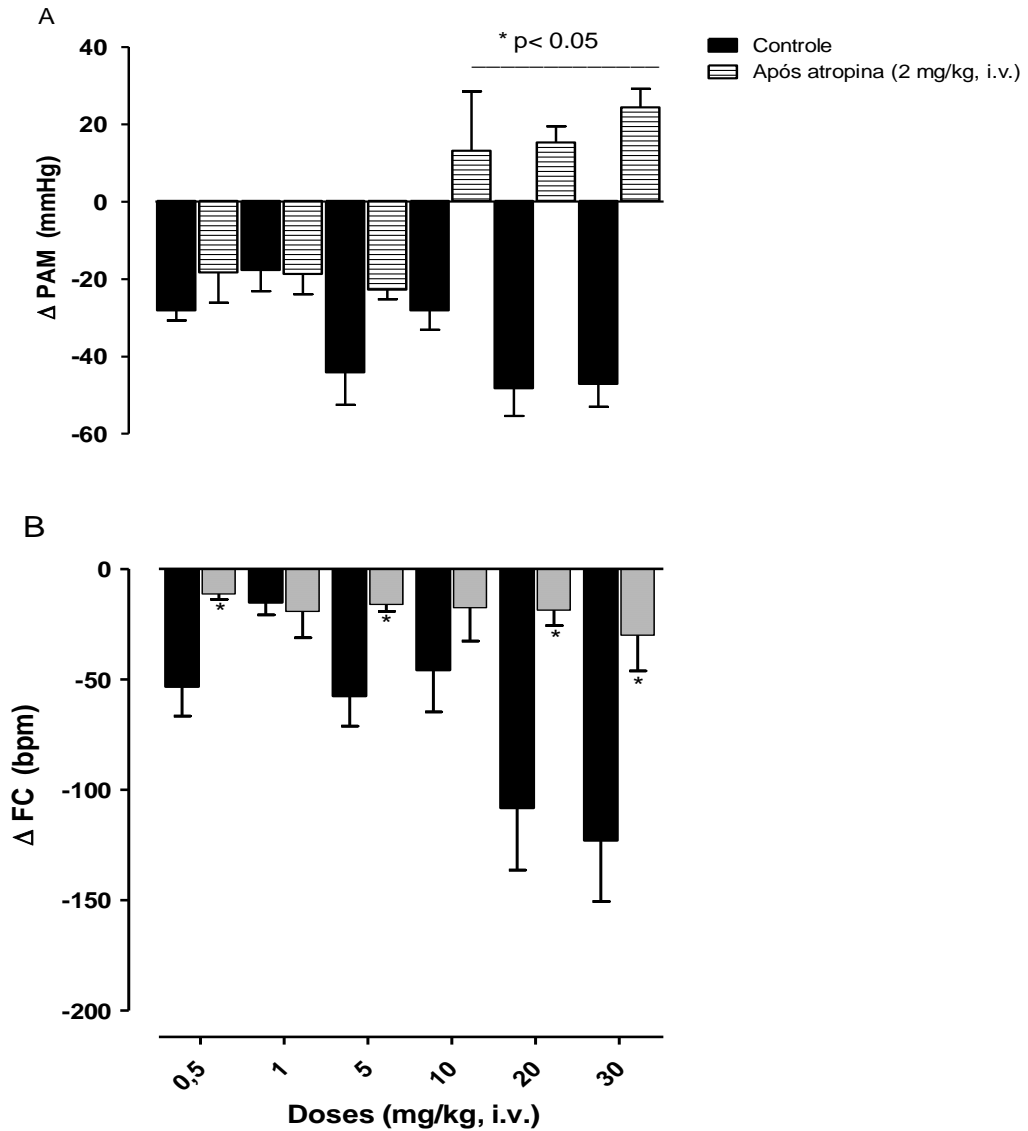
FIGURA 19: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados, antes e após o bloqueio com L-NAME (20 mg/kg, i.v.) (2 mg/kg, i.v.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ (n= 5). ANOVA one-way seguindo de teste de Bonferroni.



6.12 Efeito de Ssan-EtOH em ratos não anestesiados antes e após o bloqueio com atropina

O pré-tratamento dos animais com atropina (2 mg/kg; i.v.) atenuou o efeito hipotensor induzido pelo extrato na dose de 5 mg/kg ($-22,7 \pm 2,5$ mmHg, $*p < 0,05$ versus controle) e reverteu totalmente a resposta hipotensora nas doses de 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v. ($13,2 \pm 9,3$; $15,3 \pm 4,2$; $24,4 \pm 4,8$ mmHg) bem como ocorreu uma atenuação do efeito bradicárdico nas doses (0,5, 5, 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v.) ($-11,3 \pm 2,5$; $-18,6 \pm 7,0$; $-30,0 \pm 16,1$ bpm, $*p < 0,05$ versus controle), sugerindo que os efeitos hipotensor e bradicárdico induzido pelo Ssan-EtOH, provavelmente estão relacionados com uma ação nos receptores muscarínicos cardíacos, provavelmente M₂ (Figura 20 A e B).

FIGURA 20: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do Ssan-EtOH (0,5; 1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v) em ratos não-anestesiados (n= 5), antes e após o bloqueio com atropina (2 mg/kg, i.v.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, versus controle. ANOVA one-way seguindo de teste de Bonferroni.



Discussão

7.0 - DISCUSSÃO

Este estudo caracteriza-se pela investigação do mecanismo de ação do efeito cardiovascular da espécie *Sida santareminensis* em ratos, uma vez que estudo anterior mostrou que o extrato etanólico das partes aéreas desta espécie apresenta efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica de ratos (ARCANJO et al., 2011).

Estudos que investigam os efeitos farmacológicos de extratos de plantas medicinais são geralmente preparados utilizando diferentes métodos de extração. Os métodos de extração determinam quais compostos vasoativos estarão presentes nos extratos de plantas, com isso a avaliação dos efeitos farmacológicos de dois extratos diferentes oriundos de uma mesma planta é importante para uma avaliação precisa dos seus efeitos (SEGZI et al., 2015).

Neste trabalho demonstrou-se, que a Ssan-HA exerce, sobre o tônus do músculo liso vascular de ratos efeito vasorrelaxante que se apresenta de forma dependente e independente do endotélio funcional e de forma dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com fenilefrina (figura 9). No mecanismo dependente do endotélio, as células endoteliais sintetizam dilatadores vasculares, tais como óxido nítrico, prostaciclina e o fator hiperpolarizante (CHEN et al., 2009). Na ausência de endotélio o efeito vasorrelaxante da Ssan-HA foi atenuado, mas não abolido, os resultados sugerem que a Ssan-HA pode ter efeito tanto sobre o endotélio vascular, como ação direta sobre as células do músculo liso vascular.

Diante desses resultados e considerando que os mecanismos de ação pelos quais os produtos naturais e extratos de plantas induzem vasorelaxamento apresentam uma importante relação com a via do NO (WANG et al., 2013), resolvemos então investigar a participação um dos principais fatores vasodilatadores, o NO, utilizando a ferramenta L-NAME (100 µM), um inibidor competitivo da enzima NO-sintase (eNOS) (MONCADA e HIGGS, 1993), nestas condições experimentais o relaxamento da musculatura lisa vascular induzida por Ssan-HA foi significativamente atenuado (figura 10), sugerindo a participação da eNOS no efeito vasorrelaxante induzido pela fração. O complexo cálcio/calmodulina ativa a eNOS que estimula a produção

de NO. O NO é um radical livre inorgânico, gasoso, altamente reativo e produzido a partir da oxidação do aminoácido L-arginina que se converte em L-citrulina mediada pela eNOs, uma de suas isoformas é a NO sintase endotelial, que pode ser encontrada principalmente nas células endoteliais em cavéolas e é essencial para a manutenção do tônus vascular basal (BREDT et al, 1990; ARAÚJO et al., 2013). Uma vez formado, o NO difunde-se livremente através das membranas e liga-se à GCs, e estimula a produção de GMPc, este aumento de cGMP nas células da musculatura lisa leva a seu relaxamento. (MONCADA; HIGGS, 2006; ARAÚJO et al., 2013).

Um dos mecanismos de relaxamento promovidos pelo aumento de GMPc é a ativação de canais de potássio causando hiperpolarização. Assim os canais para K^+ desempenham um papel vital na regulação da contratilidade do músculo e no tônus vascular, a ativação desses canais nas células musculares lisas vasculares causam vasodilatação e aumentam o fluxo sanguíneo (NELSON E QUAELEY, 1995). Quatro canais para K^+ foram encontrados em células de músculo liso vascular, são esses: os canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), canais retificadores de K^+ interno (KIR), canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (BKca) e canais para K^+ dependentes de voltagem, (KV) (KO et al., 2008). O efluxo de íons K^+ induzido pela ativação dos canais para K^+ citados acima conduz à hiperpolarização da membrana das células do músculo vascular, inibe o influxo de íons Ca^{2+} através de Ca_v e consequente vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995).

De modo a investigar o papel dos canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido por Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica de rato, utilizou-se um bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , TEA 3 mM (WANG et al., 2008). Onde observou-se uma atenuação significativa da resposta vasorrelaxante frente ao bloqueio com TEA 3 mM (figura 11), sugerindo a participação de canais para potássio no endotélio vascular no efeito vasorrelaxante de induzido por Ssan-HA.

A contração do músculo liso depende do aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico, um estímulo geralmente usado para aumentar os níveis de Ca^{2+} citosólico são os agonistas contráteis (LEE et al., 2001), como a FEN que promove o aumento do tônus vascular pela estimulação do receptor α_1 -

adrenérgico, que leva à formação de IP₃ (EHRlich, 1988), induzindo a liberação interna de Ca²⁺ do RS. Simultaneamente, a FEN ativa os CCOR_s e induz um influxo extracelular de Ca²⁺ fazendo com que ocorra uma contração tônica (NOGUERA et al., 1997), assim a vasoconstrição induzida por FEN é resultante de um acoplamento misto, farmacomecânico e eletromecânico (LEUNG et al., 2008).

Em experimentos para avaliação da influência de Ssan-HA sobre anéis pré contraídas com FEN, observou-se que a fração foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por FEN em preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência do endotélio vascular (figura 12, tabela 02). Portanto, estes resultados sugerem que Ssan-HA atua, de algum modo, sobre a diminuição da resposta contrátil induzida pela FEN; agindo inibindo a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, ou ainda pode atuar inibindo o influxo de Ca²⁺ através da membrana plasmática.

Outro estímulo que resulta no aumento do Ca²⁺ citosólico é a despolarização da membrana induzida pelo aumento da concentração de potássio extracelular que abre os Ca_v e promove a liberação de Ca²⁺ do RS (GURNEY, 1994; JONES et al., 2003). Um agente contrátil eletromecânico utilizado para gerar despolarização é o KCl que causa uma resposta contrátil bifásica consistindo de uma contração passageira (fásica) seguida por uma sustentada (tônica) mantida durante a exposição ao agente contrátil (TANAHASHI et al., 2009).

Para verificarmos se a Ssan-HA promoveria relaxamento frente a um agente contrátil que atua por despolarização, utilizamos o KCl 80 mM, nesta concentração de potássio externo ocorre uma despolarização da membrana plasmática que leva ao aumento do influxo de Ca²⁺ extracelular através de Ca_v gerando uma contração.(VOGALIS et al., 1991). Nestas condições experimentais, concentrações cumulativas de Ssan-HA promoveram vasorrelaxamento, não ocorrendo diferença estatística quando comparado com o vasorrelaxamento após uma pré-contração com FEN (figura 13), mostrando assim que existe uma via de sinalização celular associada ao mecanismo eletromecânico, no efeito vasorrelaxante dessa fração.

Uma vez evidenciada a ação da fração Ssan-HA sobre a contração tônica induzida por KCl 80 mM, passou-se a avaliar a ação de concentrações crescentes da mesma sobre a adição cumulativa de cloreto de potássio e assim caracterizar a ação da fração sobre o bloqueio dos canais para Ca_v na membrana plasmática. Nestas condições observou-se que, na presença de Ssan-HA as curvas concentração-resposta cumulativa do KCl foram deslocadas para a direita com redução do efeito máximo, reafirmando uma ação inibitória de Ssan-HA sobre o influxo de Ca^{2+} via Ca_v na membrana plasmática (figura 14; tabela 03).

A atividade vasorrelaxante descrita pode estar relacionada com a presença de um flavonóide glicosilado já isolado a partir da fração estudada, os flavonóides já são conhecidos pelos seus efeitos cardiovasculares, com atuação na modulação do tônus vascular promovendo efeitos vasodilatadores (ZHU et al., 2007), sendo que a presença de endotélio não é uma condição para o efeito, mas pode aumentar a atividade da maioria dos flavonóides (CHAN et al., 2000), na presença de endotélio o vasorrelaxamento é mediado pelo NO (POTENZA et al., 2007), os flavonóides também são antioxidantes (GU et al., 2016), esses efeitos atuam diretamente na melhoria do fluxo sanguíneo no tecido o que justifica a atividade cardioprotetora dos flavonóides.

A busca por plantas que exercem efeito cardioprotetor é considerada relevante, pois o tratamento medicamentoso cardioprotetor ainda é uma necessidade clínica. Nessa busca por alternativas terapêuticas com ação cardioprotetora algumas espécies merecem destaque como a da *Sida rhomboidea* e *Sida acuta* (DINDA, 2015).

Para investigar a atividade cardioprotetora da Ssan-HA foram realizados testes para avaliação dos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo e avaliou-se os níveis de H_2S após o tratamento com Ssan-HA. O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento de doenças vasculares e na promoção da disfunção endotelial através da redução da biodisponibilidade do NO (WELDY et al., 2012). As células produzem continuamente radicais livres e espécies reativas de oxigênio, como parte dos processos metabólicos. Estes radicais livres são neutralizados por um sistema elaborado de defesa

antioxidante que consiste de enzimas, tais como a catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase (IHARA et al., 2000).

Muitas das reações da glutatona envolvem o grupo sulfidril, altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutatona um bom redutor. A enzima responsável pela redução da L-Glutatona oxidada (GSSG) à glutatona redutase (GSH), que é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos (HUMBER, ALMEIDA, 2008). Após tratamento dos animais intraperitoneal da Ssan-HA observou-se que com a dose de 1 mg/kg aumentou significativamente os níveis de GSH quando comparado com o grupo controle (salina) e os grupos tratados as doses de 10 e 20 mg/kg não demonstraram diferenças significativas comparando com o grupo controle, ou entre as doses analisadas (figura 15), sugerindo que a Ssan-HA induz alterações significativas nos níveis de GSH, diminuindo a depleção de grupos sulfidrilas.

A peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) é considerado como o principal mecanismo de destruição da membrana celular e danos celulares (HENROTIN et al., 2005). A decomposição dos lípidos peroxidados leva à produção de uma grande variedade de produtos finais, incluindo MDA (GAMBHIR et al., 1997). A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro para avaliar um dano direto ao tecido provocado pelos radicais livres, indicando que houve peroxidação dos lipídios (DEL RIO et al., 2005). Após a administração intraperitoneal de Ssan-HA a concentração de MDA no grupo que foi tratado com a dose 20 mg/kg diminuiu significativamente quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa entre os valores médios das concentrações de MDA nos grupo de animais que receberam tratamento com doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, ou entre as doses analisadas (figura 16). Os resultados obtidos em conjunto sugerem que o Ssan-HA pode atuar como antioxidante, uma vez que, ocorreu aumento dos níveis de GSH e diminuição da concentração de MDA.

Outro componente fisiológico que gera resistência ao estresse oxidativo é o H₂S (YU et al., 2014), que desempenha um papel protetor no

desenvolvimento e na patogênese das doenças cardiovasculares (POLHEMUS et al., 2014). O H₂S regula o tônus vascular e trabalho cardíaco e exerce cardioproteção (HUGHES et al., 2009; SUN et al. 2012). Os níveis de H₂S no tecido cardíaco após o tratamento com Ssan-HA se elevaram de maneira significativa nos grupos que foram tratados com as doses de 1, 10 e 20 mg/kg quando comparado com o grupo controle (salina). Não houve diferença significativa entre os valores médios dos níveis de H₂S nos grupos de animais que receberam tratamento com doses de 1, 10 e 20 mg/kg da Ssan-HA (figura 17). Sugerindo que a fração pode estar atuando na via do H₂S aumentando os níveis este gás.

Após observar que a fração Ssan-HA obtida a partir do extrato etanólico bruto Ssan-EtOH produz efeitos importantes cardiovasculares aliado à ação vasorrelaxante do extrato, e tomando como referencia estudos de outras espécies com a Ssan-HA observou-se que com a dose de 1 mg/kg aumentou significativamente os níveis de GSH quando comparado com o grupo controle (salina) e os grupos tratados com as doses 10 e 20 mg/kg não demonstraram diferenças significativas comparando com o grupo controle, ou entre as doses analisadas (figura 15), sugerindo que a Ssan-HA induz alterações significativas nos níveis de GSH, diminuindo a depleção de grupos sulfidrilas.

A peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) é considerado como o principal mecanismo de destruição da membrana celular e danos celulares (HENROTIN et al., 2005). A decomposição dos lípidos peroxidados leva à produção de uma grande variedade de produtos finais, incluindo MDA (GAMBHIR et al., 1997). A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro para avaliar um dano direto ao tecido provocado pelos radicais livres, indicando que houve peroxidação dos lipídios (DEL RIO et al., 2005). Após a administração intraperitoneal de Ssan-HA a concentração de MDA no grupo que foi tratado com a dose 20 mg/kg diminuiu significativamente quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa entre os valores médios das concentrações de MDA nos grupo de animais que receberam tratamento com doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, ou entre as doses analisadas (figura 16). Os resultados obtidos em conjunto sugerem que o Ssan-

HA pode atuar como antioxidante, uma vez que, ocorreu aumento dos níveis de GSH e diminuição da concentração de MDA.

Outro componente fisiológico que gera resistência ao estresse oxidativo é o H₂S (YU et al., 2014), que desempenha um papel protetor no desenvolvimento e na patogênese das doenças cardiovasculares (POLHEMUS et al., 2014). O H₂S regula o tônus vascular e trabalho cardíaco e exerce cardioproteção (HUGHES et al., 2009; SUN et al. 2012). Os níveis de H₂S no tecido cardíaco após o tratamento com Ssan-HA se elevaram de maneira significativa nos grupos que foram tratados com as doses de 1, 10 e 20 mg/kg quando comparado com o grupo controle (salina). Não houve diferença significativa entre os valores médios dos níveis de H₂S nos grupos de animais que receberam tratamento com doses de 1, 10 e 20 mg/kg da Ssan-HA (figura 17). Sugerindo que a fração pode estar atuando na via do H₂S aumentando os níveis este gás.

Após observar que a fração Ssan-HA obtida a partir do extrato etanólico bruto Ssan-EtOH produz efeitos importantes cardiovasculares aliado à ação vasorrelaxante do extrato, e tomando como referencia estudos de outras espécies do mesmo gênero botânico, como a *Sida cordifolia*, que apresenta perfil de resposta hipotensora e bradicárdica (SILVEIRA et al., 2003), passamos a avaliar os efeitos do Ssan-EtOH sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos. Os resultados obtidos demonstram que o Ssan-EtOH induziu um potente efeito hipotensor associado a uma resposta bradicárdica (figura 18).

Um importante fator relaxante envolvido na diminuição da pressão arterial é o NO, que participa da regulação do fluxo sanguíneo nos diversos leitos vasculares e, particularmente, no fluxo sanguíneo coronariano (DIAS et al, 2011).

Em nosso estudo, observou-se que o tratamento agudo dos animais com L-NAME, um inibidor competitivo da eNOS (BARTUNEK et al, 2000), não alterou a hipotensão induzida por Ssan-EtOH, assim, provavelmente o efeito hipotensor e bradicárdico do extrato Ssan-EtOH não envolve a ativação da eNOS (figura 19).

Outra via importante que o extrato poderia estar atuando é a dos receptores muscarínicos, a estimulação desses receptores por um agonista como acetilcolina promove a redução da taxa e força do batimento cardíaco resultante da ação parassimpática. E a ativação desses mesmos receptores (predominantemente do subtipo M_2) no nodo sinoatrial, por ação vagal, induz bradicardia intensa (efeito inotrópico negativo) devido a um retardo na condução elétrica do coração, que pode ser acompanhado por hipotensão, devido a uma diminuição no débito cardíaco (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980; CAULFIELD, 1993; MONCADA; HIGGS, 2006).

Com o intuito de avaliar a participação dos receptores muscarínicos nessas respostas, foram realizados experimentos com animais pré-tratados com atropina (2 mg/kg), um antagonista não-seletivo dos receptores M_3 (MITCHELSON, 1984). Nestes animais a hipotensão e a bradicardia foram praticamente abolidas frente à todas as doses estudadas (figura 20 A e B), sugerindo dessa forma que o efeito hipotensor do Ssan-EtOH pode ser devido a uma ativação dos receptores muscarínicos ou indiretamente pela ativação vagal, levando a liberação de acetilcolina no nodo sinoatrial e consequente ativação muscarínica (MEDEIROS et al., 2006; MOREIRA et al., 2010; BERNARDES et al., 2013), SILVEIRA et al, (2003), em estudo realizado com a espécie *Sida cordifolia* também foi observado o mesmo perfil de resposta, o que nos leva a sugerir que esse efeito farmacológico seja algo inerente ao gênero.

Conclusões

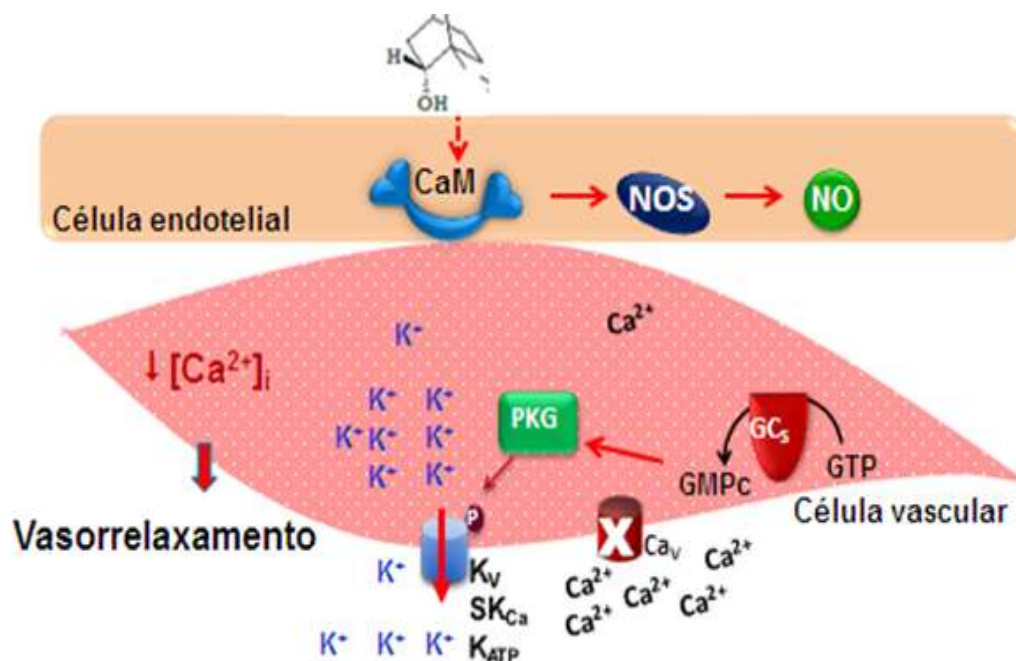
8.0 CONCLUSÕES

Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que:

- ✓ O efeito vasorrelaxante promovido pela Ssan-HA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ocorre de maneira dependente e independente do endotélio vascular.
- ✓ O efeito vasorrelaxante dependente do endotélio vascular parece envolver a participação da enzima NO sintase, além de possível participação de canais para potássio. Porém outros mecanismos podem estar envolvidos na resposta.
- ✓ O efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular parece ser decorrente de ativação de canais para potássio e inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem (Ca_v). Porém outros mecanismos podem estar envolvidos nesta resposta.
- ✓ A Ssan-HA parece ter efeito cardioprotetor pois promoveu aumento os níveis de GSH e diminuiu a concentração de MDA e ainda aumentou os níveis de H_2S .
- ✓ Ssan-EtOH induz hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não-anestesiados quando administrado por via venosa.
- ✓ A hipotensão e bradicardia causada pelo Ssan-EtOH parece estar envolvendo a participação dos receptores muscarínicos.

FIGURA 21: Mecanismo de ação dependente do endotélio vascular propostos para a Ssan-HA.

ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATO



CaM –calmodulina;

NOS – óxido nítrico sintase;

NO – óxido nítrico;

GCs – guanilato ciclase solúvel;

GTP – guanosina trifosfato;

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina;

PKG – proteína cinase G;

P – fósforo;

K^+ - potássio;

Ca^{++} - cálcio;

Ca_v - canais para cálcio sensíveis a voltagem;

K_v - canais para potássio sensíveis a voltagem;

SK_{Ca} - canais para potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio;

K_{ATP} - canais para potássio sensíveis ao ATP.

Perspectivas

9.0 PERSPECTIVAS

- Avaliar a participação da via NO/GMPc/PKG na resposta vasorrelaxante da fração Ssan-HA;
- Investigar a participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorrelaxante da Ssan-HA;
- Identificar quais subtipos de canais de potássio estão envolvidos na resposta vasorrelaxante da Ssan-HA;
- Avaliar o efeito da Ssan-HA sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos.
- Investigar os efeitos do flavonóide glicosilado obtido a partir do Ssan-EtOH sobre o sistema cardiovascular.

Referências

REFERENCIAS

ADARAMOYE, O.A. et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *urcuma longa* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 457:462, 2009.

AJITHABAI, M.D.; SUNITHA RANO, G.; JAYAKUMAR, G. Review on the species of *Sida* used for the preparation on Nayupayam Kashayam. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 2, p. 173-195, 2012.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanismscontrolling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} dependente regulation of vascular tone. **Journal of Anesthesia**. v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007.

AKINMOLADUN, A.C. et al. Cardiotoxicity and cardioprotective effects of african medicinal plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. p. 395-421, 2014.

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug induced contractions of rabbit aorta. **Amerian Journal of Physiology**. v. 219, p. 1698-1705, 1970.

AMIRMOHAMMADI, M. et al. *In vivo* evaluation of antiparasitic effects of *Artemisia abrotanum* and *Salvia officinalis* extracts on *Syphacia obvelata*, *Aspiculoris tetrapetra* and *Hymenolepis nana* parasites. **Asian Pacific Journal of Tropical Diease**. v. 4, p. S250-254, 2014.

AMODEO, C.; HEIMANN, J.C. Endotelio e hipertensão arterial sistêmica: mecanismos de lesão/novo alvo terapêutico? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. v. 13, n. 1, p. 121-129, 2003.

ARAÚJO, A.V. et al. The new NO donor Terpy induces similar relaxation in mesenteric resistance arteriesof renal hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**. v. 35, p. 47-53, 2013.

ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 174, p. 299-307, 2015.

ARCANJO, D.D.R. et al. Vasorelaxant response induced by *Sida santaremnensis* H. Monteiro ethanol extract on rat superior mesenteric artery. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 299-307, 2015.

ASGARY, S. et al. Biochemical and histopathological study of the anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicina**. v. 11, n. 2, p. 63-69, 2014.

ASGARY, S. et al. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. **Phytotherapy Research**. v.28, n. 2, p. 193-199, 2014.

BANKER, G.S.; RHODES, C.T. **Modern Pharmaceutics**. 4^a ed., New York: Marcel Dekker, 2002.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de Angiospermas no Brasil 2**. Imprensa Universitária, 1991.

BARTUNEK, J. et al. Chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. **Circulation**. v. 101, p. 423-429, 2000.

BERNARDES, M.J.C. et al. Hypotensive effect of *Aspidosperma subincanum* Mart. In rats and its mechanism of vasorelaxation in isolated arteries. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 227-332, 2013.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**. v. 415, p. 198-205, 2002.

BOLOTINA, V.M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**. v. 368, p. 850-853, 1994.

BOVINI, M.G. Malvaceae *s.str.* na Reserva Rio Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodiguésia**. v. 61, n. 2, p. 289-301, 2010.

CALHOUN D.A. et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. **Circulation**. v. 117, n. 25, p. 510-526, 2008.

CARRE, G. et al. The hypotensive agent dodoneine inhibits L-type Ca^{2+} current with negative inotropic effect on rat heart. **European Journal of Pharmacology**. v. 728, p. 119-127, 2014.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors: Characterization, coupling and function. **Trends Pharmacology**. v. 25, p. 103-107, 1989.

CARBAJAL, D. et al. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal Ethnopharmacology**. v. 25, p. 103-107, 1989.

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

CARTAYA, O. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. **Cultivos tropicales**. v. 22, n. 2, p. 5-14, 2001.

CHEN, G.P. et al. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life Sciences**. v. 84, n. 3-4, p. 81-88, 2009.

CHAN, E.C.; PANNANGPETCH, P.; WOODMAN, O.I. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 35, n. 2, p. 326-333, 2000.

COCKCROFT, J.R. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. **American Journal of Hypertension**. v. 18, n. 12, p. 177-183, 2005.

COSTA, D.A. et al. Chemical constituents from *Bakeridesia pickeli* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-o- β -d-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**. v. 30, n. 4, p. 901-903, 2007.

COSTA, V.V. et al. Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors on hypotension after anesthetic induction. Is the preoperative discontinuation of this drug necessary? **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 59, ed. , p. 704-715, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**. v. 108, p. 52-60, 1997.

DAVANI, S. et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. **Circulation**. v. 108, p. II253-II258, 2003.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as a toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DIAS, et al. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

DINDA, B. et al. The genus *Sida* L. a traditional medicine: Its ethnopharmacological phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in the herbal drugs industry. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 176, p. 135-176, 2015.

DUDA, S.C. et al. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. **Industrial Crops and Products**. v. 77, n. 2, p. 499-507, 2015.

EHRlich, B.E; WATRAS, J. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **Nature**. v. 288, p. 373-376, 1980.

ELLMAN, G.L. Archives of Biochemistry and Biophysics. v. 82, ed. 1, p. 70-77, 1959.

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.

FRANCO, C.I.F. et al. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 98, n. 3, p. 275-279, 2005.

GALAL, V.; RAMAN, I.A. *Sida cordifolia*, a traditional herb in modern perspective — a review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. v. 1, p. 5-17, 2015.

GAMBHIR, J.K.; LALI, P.; JAIN, A.K. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**. v. 30, n. 4, p. 351-355, 1997.

GERTSCH, J.; VIVEROS-PAREDES, J.M., TAYLOR, P. Plant immunostimulants-Scientific paradigm or myth? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 136, n. 3, p. 385-391, 2011.

GONZALEZ-TORRES, M.C.; BETANCOURT-RULE, M.; ORTIZ-MUÑIZ, R. Daño oxidativo y antioxidantes. **Bioquímica**. v. 25, n. 1, p. 3-9, 2000.

GU et al. Contribution of hydrogen sulfite and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 375, p. 199-206, 2013.

GU, C. et al. Influence of the stage of ripeness on the phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities in different parts of *Citrus reticulata* Blanco cv. Chachiensis. **Food Science and Technology**. v. 69, p. 67-75, 2016.

GURNEY, A.M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 46, p. 242-251, 1994.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants.Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. v. 46, . 242-251, 1994.

HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drus Discovery Today**. v. 5, p. 312-300, 2000.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**. v. 91, p. 7-11, 2003.

HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 13, p. 643-654, 2005.

HASSAN, F.I. et al. Analgesic,anti-inflammatory and antipyretic activities of the metanol leaf extract of *Dalbergia saxatilis* Hook. F in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 166, p. 74-78, 2015.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants on the world**, ed. B.T. Bastsford Ltda., London, 1993.

HORN, J. The próton-pump inhibitors: Similarities and diferences. **Clinical Therapeutics**. v. 22, n. 3, 2000.

HORN, H.D.; BURNS, F.H. In: **Methods of enzymatic analysis**. Bergmeyer H.U., editor. New York: Academic Press; 875-875, 1978.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**. v. 76, p. 967-1003, 1996.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quimica Nova**. v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HULBERT, A.J. et al. Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): A comparative study using shotgun lipidomics. **Experimental Gerontology**. v. 42, ed. 11, p. 1053-1062, 2007.

HUGHES, M.N; CENTELLES, M.N.; MOORE, K.P. Marking and working with hydrogen sulfite: the chemistry and generation of hydrogen sulfite *in vitro* and its measurement *in vivo*: a review. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 47, n. 10, p. 1346-53, 2009.

HINSELY, R.S. Economic uses of Malvaceae-Overview. 2001 and 2008.

IHARA, Y. et al. Antioxidant alpha-tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. **FEBS Letters**. v. 473, n. 1, p. 24-26, 2000.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 53, p. 503-514, 2002.

IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICCHELINI, L.C. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. v. 12, p. 20-45, 2005.

IRIGOYEN, M.C.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E.M. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 12, n. 4, p. 229-233, 2005.

ISMAIL, M.Y.M. Antiasthmatic herbal drugs a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**. v. 2, n. 3, p. 28-29, 2010.

JESSUP, M. et al. ACCF/AHA Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. **Circulation**. v. 119, p. 1977-2016, 2009.

JONES, R.D.; PUGH, P.J.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonist action? **British Journal of Pharmacology**. v. 138, p. 733-744, 2003.

KEARNEY, P.M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**. V. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KHAN, N.; McLISTER, F.A. Re-examining the efficacy of β -blockers for the treatment of hypertension: a meta-analysis. **CMAJ**. V. 174, P. 1737-1742, 2006.

KO, E.A. et al. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**. v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KROON M. Influence of dispersion in myosin filament orientation and anisotropic filament contractions in smooth muscle. **Journal of Theoretical Biology**. v. 272, p. 72-82, 2011.

KUBAVAT, J.B., ASDAQ, S.M.B. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, n. 1, p. 162-165, 2009.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can Journal Physiol Pharmacol**. v. 80, ed. 12, p. 1125-31, 2002.

LEE, C.H. et al. The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. **Journal of Physiology**. v. 534, p. 641-650, 2001.

LEUNG, F.P. et al. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, p. 846-857, 2008.

LI, R.K. et al. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 31, n. 3, p. 513-522, 1999.

LIMA, A.L.A. et al. Anti-inflammatory activity and acute toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Herissantia tiubae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. In Press, Uncorrected Proof, Available on line in december 2015.

LINDHOLM, L.H.; CARLBERG, B.; SAMUELSON, O. Should β blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. **Lancet**. V. 366, p. 1545-1553, 2005.

LOPEZ-SENDON, J. et al. Expert consensus documento n beta-adrenergic receptot blockers. **European Heart Journal**. V. 25, p. 1341-1362, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAYTE, J.; HUGHES. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**. v. 89, p. 104-1109, 2003.

MCMURRAY, J.J. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **European Journal Heart Failure**. v. 14, p. 803-869, 2012.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S. et al. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. **Nutricion Hospitalaria**. v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MEDEIROS, I.A.; SANTS, M.R.V.; NACIMENTO N.R.V.; NASCIMENTO, N.M.S.; DUARTE, J.C. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extractin rats. **Fitoterapia**. v. 77, p. 19-27, 2006.

MEHTA, R.I.; MEHTA, R.I.; CHUN, Y. Hydrophilic polymer embolism: na underrecognized iatrogenic cause of ischemia, inflammation, and coagulopathy. **Human Pathology**. v. 46, n. 3, p. 488-489, 2015.

MENAKA, C. et al. Cardioprotective effect of *Sida rhomboidea*. Roxb extract against isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, p. 351-356, 2011.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversa; applications in research and therapy. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 51, ed. 2, p 155-194, 1991.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, A. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**. v. 86, p. 271-278, 1978.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006

MILLS, S. **The Complete Guide to Modern Herbalism Thorsons**. London, p. 215, 1994.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacology**. v. 5, p. 12-16, 1984.

MONACA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide; Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONACA, S.; HIGGS, E.A. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, p. 193-201, 2006.

MONTEIRO, F.S. et al. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **Journal Ethnopharmacol.** v. 141, n. 3, p. 895-900, 2012.

MOREIRA, F.V., et al. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, p. 904-909, 2010.

NASCIMENTO, J.P. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato etanólico bruto e frações da *Sida santaremnensis* H. Monteiro (malvaceae) sobre cepas de *Rhodotorula spp.* **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 10, n. 2, p. 118-125, 2015.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**. v. 268, n. 4, p. 799-822, 1995.

NEWMASTER, S.G. et al. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. **Medicine**. p. 11-222, 2013.

NICKENING, G.; HARRISON, D.G. The AT-1-Type Angiotensin receptor in oxidative stress and hypertension Part I: Oxidative stress and atherogenesis. **Circulation**. v. 105, p. 391-396, 2002.

NOGUERA, M.A. et al. Capacitative Ca^{2+} entry associated with $\alpha 1$ -adrenoceptors in rat aorta. **Archives of Pharmacology**. v. 356, n. 1, p. 83-89, 1997.

OLIVEIRA, E.J.; MEDEIROS, I.A.; MUKEIERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normausine B from *Strychnos atlântica* root. **Phytomedicine**. v.3, p. 45-49, 1996.

OUEDRAOGO, M. et al. Effect of long term use of *Sida rhombifolia* L. extract on haemato-biochemical parameters of experimental rats. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 4, p. 18-24, 2013.

PAIVA, T.B.; FARIAS, N.C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira Hipertensão**. v. 12, n. 2, p. 84-88, 2005.

PANDEY, M. et al. Phytomedicine: Na ancient approach turning into future potential source of therapeutics. **Journal of Phamacognosy and Phytotherapy**. v. 3, n. 2, p. 27-37, 2011.

PANDEY, R.C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Medicinal Research Reviews**. v. 18, p. 333-346, 1998.

PANTOJA, C.V. et al. Diuretic, natriuretic and hipotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anesthetized dogs. **Journal Ethnopharmacoly**. v. 1, p. 325-333, 1991.

PATEL, A.S.; BURNAND, K.G. Cardiovascular haemodynamics and shock. **Basic Science**. v. 27, p. 459-464, 2009.

PARROTTA, J.A. **Healing plants of Peninsular India**. (1st ed) CABI Publishing, USA, p. 917, 2001.

PEDRAZZA-CHAVERRI, J. et al. Garlic prevents hypotension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Life Science** v. 62, p. 71-77, 1998.

PEIXOTO, A.M. **Enciclopédia Agrícola Brasileira: S-Z**, v. 6, ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros, USP. EdUSP, 2007.

POLHEMUS, D.J. LEFER, D.J. Emergence of hydrogen sulfide as na endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. **Circulation Research**. v. 114, n. 730-737, 2014.

POTENZA, M.A. et al. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 292, n. 5, p. E1378-E1387, 2007.

PRADHAN, D.K. et al. Ethnomedicinal and therapeutic potential of *Sida acuta* Brum. F. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 4, p. 88-92, 2013.

RAHMAM, K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**. v. 131, p. 977-979, 2001.

RASCADO, R.R.; BENDHACKT, L.M. Activation of α_2 -adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. **Vascular Pharmacology**. V.42, p. 63-68, 2005.

REED, D.J.; FARISS, M.W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacological Reviews**. V. 36, p. 25, 1984.

REMBOLD, C.M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**. v. 36, p. 25, 1984.

RIBEIRO W.; MUSCARÁ, M.N. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores de ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Revista Brasileira de Hipertensão**. V. 8, p. 1144-24, 2001.

ROBINSON, E.; GRIEVE, D.J. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 122, n. 3, p. 246-263, 2009.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms an free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 37, p. 231-235, 1988.

SALAMANCA, D.A.; KHALIL, R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets formodulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochemical Pharmacology**. V. 70, n. 11, p. 1537-1547, 2005.

SCANLON, V.C.; SANDERS, T. **Essentials of Anatomy and Physiology**. 6th Edition, Davis Company.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. ed. 5. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**. v. 82, ed. 2, p. 291-295, 1997.

SINGI, G. et al. Rfeitos agudos de estratos hidroalcoólicos do alho (*allium sativum* L.) e do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 15, Ed. 2,p. 94-97, 2005.

SHIRZAD, M. et al. Does Royal jelly affect tumor cells? **Journal of Herbmed Pharmacology**. v. 2, n. 2, p. 45-48, 2013.

SILVA, R.L. et al. Effect of the aqueous extract of *Sida cordifolia* on liver regeneration after partial hepatectomy. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 1, p. 37-39, 2006.

SILVA, A.C.O. et al. Na approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, n. 5, p. 1035-1038, 2010.

SILVA, R.C.V.A.F. et al. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, p. 997-1004, 2012.

SILVEIRA, A.L. et al. Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 13, n. 2, p. 37-39, 2003.

SIMKO, F. et al. Spontaneous, Larginine-induced and spironolactone induced regression of protein remodeling of the left ventricle in L-NAME-induced hypertension. **Physiology Research**. v. 56 (Suppl 2), p. S00-S00, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – Da planta ao medicamento**. ed. 5, Santa Catarina: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SIREERATAWONG, S. et al. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from the root of *Sida rhombifolia* Linn in rats. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**. v. 30, p. 729-737, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 95, p. 1-51, 2010.

SMLYO, A.P.; SMLYI, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**. V. 372, p. 231-236, 1994.

STAESSEN, J.A. et al. Essential hypertension. **Lancet**. v. 361, n. 9369, p. 1629-1641, 2003.

STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Versão 4, 2003. Disponível em: <http://mobot.org/MOBOT/RESEARCH/Apweb/> Acesso em: 15 de junho de 2007.

SRINITHYA, B.; MUTHURAMAN, M.S. Na overview on the biological perspectives of *Sida cordifolia* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 158, p. 15-17, 2014.

TANAHASHI, Y. et al. Multiple muscarinic pathways mediate the suppression of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse intestinal smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**. v. 158, n. 8, p. 1874-1883, 2009.

TANAKA Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**. V. 128, p. 1602-1608, 1999.

TUKAMOTO Jr, N.C. **Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de HB S e mutantes no gene HFE**. [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista, 2008.

VAZIR, A.; COWIE, M.R. Decongestion: Diuretics and other therapies for hospitalized heart failure. **Indian Heart Journal**. 2015.

VILLANUEVA, C.; GIULIVI, C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 49, n.3, p. 307-316, 2010.

WANG, S. et al. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**. v. 579, n. 1-3, p. 283-288, 2008.

WANG, T.T. et al. Vasorelaxant action of na ethylacetate fraction of *Euphorbia humifusa* involves NO-cGMP pathway and potassium channels. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 148, n. 2, p. 655-663, 2013.

WATTERSON, K.R.; RATZ, P.H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**. v. 17, n. 3, p. 289-298, 2005.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. v 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WELDY, C.S. et al. Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene Gclm modulate vascular reactivity in mice. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53, n. 6, p. 1264-1278, 2012.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine**. v. 235, p. 317-327, 1994.

YU, Y.P.; CHI, X.L.; LIU, L.J.A. A hypothesis: hydrogen sulfide might be neuriprotective against subarachnoid hemorrhage induced brain injury. **The Scientific World Journal**. v. 2014, p. 1-9, 2014.

ZERN T.L.; FERNANDEZ, M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **Journal Nutrition** v. 135, n. 10, p. 2291-2294, 2005.

ZHU, X.M. et al. Endothelium-dependent and –independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. **Vascular Pharmacology**. v. 46, n. 2, p. 160-165, 2007.

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 16 de maio de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira e Francisco de Assis Oliveira

Departamento: UFPI/CCS/NPPM

Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Estudo químico-farmacológico de plantas medicinais do cerrado e da caatinga do nordeste brasileiro e de produtos sintéticos e seus derivados bioativos.”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO** sob o nº. **008/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Atenciosamente,