



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA



**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Curcuma longa* L.
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS**

NATACHA PINHEIRO MELO BROZZO

RIO BRANCO/AC
03/2018

NATACHA PINHEIRO MELO BROZZO

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Curcuma longa* L.
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: RENILDO MOURA DA CUNHA
Co-orientador: DELANO ANÍBAL DA SILVA

RIO BRANCO/AC
03/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Curcuma longa* L.
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS

NATACHA PINHEIRO MELO BROZZO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: _____

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Prof. Dr. Diego Castro Musial
UNINORTE

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela proteção e saúde, por direcionar meus caminhos em busca do conhecimento e realização pessoal.

À minha família, pelo amor e incentivo no decorrer de toda minha caminhada, em especial ao meu esposo Alex Brozzo pelo seu grande companheirismo, incentivo e compreensão demonstrados em todos os momentos.

Ao meu professor orientador Renildo Moura da Cunha por me acolher com tanta satisfação, pelos ensinamentos transmitidos, paciência e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Ao professor Delano Aníbal da Silva por me mostrar novos horizontes na pesquisa.

Ao professor Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti pelos aconselhamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas Efraim dos Santos e Eduardo Andrade pelos conhecimentos discutidos e pela ajuda nos experimentos.

A todos os colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Ciência, Inovação e tecnologia para Amazônia (CITA) da Universidade Federal do Acre (UFAC) pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.

Um ladrão rouba um tesouro, mas não furta o conhecimento. Uma crise destrói uma herança, mas não uma profissão. Não importa se temos dinheiro, desde que possuímos o maior de todos os capitais: o conhecimento. Mais sábios que os homens são os pássaros, enfrentam as tempestades noturnas, tombam de seus ninhos, sofrem perdas, dilaceram suas histórias; pela manhã, têm todos os motivos para se entristecerem e reclamarem, mas cantam agradecendo a Deus por mais um dia.

Augusto Cury

RESUMO

As doenças cardiovasculares são uma das mais importantes causas de morte no mundo, sendo um forte fator de risco para ocorrência delas a hipertensão arterial, possuindo uma prevalência de mais 20% dos brasileiros. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos vasorrelaxantes do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. Em experimentos “in vivo” foram testadas doses crescentes de EACL (5,10,20 e 40 mg/kg v.i) em ratos normotensos não anestesiados para verificação da variação de pressão arterial e frequência cardíaca. “In vitro” anéis de aorta torácica isolada de ratos normotensos, com ou sem endotélio, medindo 4 mm, eram montados em cubas, fixados a um transdutor, imersos em solução Krebs a 37 °C, aeradas por mistura carbogênica e estabilizados por 1 h, sob tensão de 1 grama, em um sistema de registro de dados. Sobre uma contração por fenilefrina, era feita a incubação do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) antes e após a incubação de atropina ou de L-name ou de indometacina. Do mesmo modo, testaram-se concentrações do EACL sobre contrações por elevação de K⁺ extracelular. EACL induziu hipotensão significativa (p<0,01) caracterizada inicialmente por uma hipotensão (34 ± 3; 55 ± 3; 54 ± 2; 68 ± 4 %, n=6) e bradicardia (72 ± 3; 73 ± 4; 91 ± 5; 82 ± 2 %, n=6) de maneira dose-dependencia em ratos não anestesiados. O efeito vasorelaxante foi significativamente (p<0,01) dependente do endotélio vascular (CE50 = 4,32±0,05 µg/mL). Após inibição da via de produção do NO a CE50 foi para 126,50±2,35 µg/ml, após inibição da produção prostaciclina, para 124,6±0,05 µg/ml e após o bloqueio muscarínico para 437,10±0,2 µg/mL. A abertura de canais de K⁺ (relaxamento de 56,98%) e bloqueio a VOCC's (relaxamento de 31,56%), foram significativamente evidentes. EACL induziu hipotensão significativa em ratos não anestesiados assim como vasorelaxamento significativo, em anéis de aorta, sendo mais expressivo na presença de endotélio. A via muscarínica parece ser a principal envolvida nesse efeito, seguida pela via da produção de NO e das Prostaciclina. A abertura de canais de K⁺ pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio a VOCC's. Esses efeitos são positivos para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Açafrão; vasodilatação; hipertensão.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the most important causes of death in the world, being a strong risk factor for the occurrence of hypertension, with a prevalence of over 20% of Brazilians. The objective of this work was investigating the effects vasorelaxants of the aqueous extract of *Curcuma longa* (AECL) on the cardiovascular system of normotensive rats. In experiments "in vivo" were tested increasing doses of EACL (5, 10, 20 and 40 mg/kg v.i) in normotensive rats not anesthetized for checking the variation of blood pressure and heart rate. "In vitro", thoracic aortic rings isolated from normotensive rats, with or without endothelium, measuring 4 mm, were mounted in vats, fixed to a transducer, immersed in Krebs solution at 37° C, aerated by carbogenic mixture and stabilized for 1 h, under tension of 1 gram, in a data recording system. On a contraction by phenylephrine, AECL was incubated at increasing concentrations before and after incubation of atropine or L-name or indomethacin. Likewise, concentrations of AECL on contractions were tested by elevation of extracellular K⁺. EACL induced significant (p<0.01) hypotension, characterized initially by a hypotension (34 ± 3; 55 ± 3; 54 ± 2; 68 ± 4 %, n=6) and bradycardia (72 ± 3; 73 ± 4; 91 ± 5; 82 ± 2 %, n=6) in a dose-dependence in non-anesthetized rats. The vasorelaxant effect was significantly (<0.01) dependent on the vascular endothelium (EC₅₀ = 4,32±0.05 µg/mL). After inhibition of the NO production pathway the EC₅₀ was 126.50 ± 2.35 µg/ml after inhibition of prostacyclin production, to 124.6 ± 0.05 µg / ml and after muscarinic blockade to 437.10 ± 0.2 µg / mL. The opening of K⁺ channels (relaxation of 56.98%) and blockade of VOCC's (relaxation of 31.56%), were significantly evident. EACL induced significant hypotension in non-anesthetized rats as well as in vasorelaxation, in aortic rings, being more expressive in the presence of endothelium. The muscarinic pathway appears to be the main involved in this effect, followed by the NO production pathway and of prostacyclines. The opening of K⁺ channels by EACL appears to have greater expression than its also significant blockade to VOCC's. These effects are positive for the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: Saffron; vasodilation; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).....	17
Figura 2. Estrutura vascular básica.....	20
Figura 3. Imagem de <i>Curcuma longa</i> L.....	28
Figura 4. Camundongo <i>Swiss albino</i> e rato <i>Wistar</i>	31
Figura 5. Imagem de satélite do local de coleta das folhas de <i>Curcuma longa</i> L	32
Figura 6. Protocolo para aquisição de dados da variação da PAM e FC e registro original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a PAM e FC em rato não-anestesiado.....	36
Figura 7. Representação esquemática da obtenção e montagem de anéis de artéria aorta isolada de rato na realização dos protocolos experimentais “ <i>in vitro</i> ”	38
Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EACL (1, 10, 100, 300 E 1000 µg/mL) em anéis providos de endotélio (a) e anéis desprovidos de endotélio (b), isolados de aorta torácica de rato pré-contraídos com 1 µM de FEN.....	39
Figura 9. Protocolo experimental da avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta.....	40
Figura 10. Protocolo experimental da avaliação do efeito relaxante do EACL sobre o bloqueio de fatores relaxantes derivados do endotélio funcional em anéis de artéria aorta.....	41
Figura 11. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EACL em anéis desprovidos de endotélio (E ⁻) e pré-contraídos com KCl 80 mM ou de KCl 20 mM.....	43
Figura 12. Traçado original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (1,3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis isolados de artéria aorta torácica de rato com (A) e sem (B) endotélio e pré-contraídos com 0,1 µM de FEN.....	44
Figura 13. Efeito hipotensor e bradicárdico induzido pela administração aguda de doses crescentes de EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) em ratos não-anestesiados. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. de 6 experimentos.....	45
Figura 14. Traçado original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis isolados de artéria aorta torácica de rato sem (A) e com (B) endotélio e pré-contraídos com 0,1 µM de FEN.....	46

Figura 15.	Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) sobre contrações induzidas por FEN (0,1 µM) em anéis de aorta isolada de ratos na presença e na ausência de endotélio funcional. ** ($p < 0,01$) versus E^+	46
Figura 16.	Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1µM), antes (controle E^+) e após a inibição da NO sintase. ** ($p < 0,01$) versus E^+	47
Figura 17.	Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1µM), antes (controle E^+) e após a inibição da cicloxigenase (COX-1). ** ($p < 0,01$) versus E^+	48
Figura 18.	Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1µM), antes (controle E^+) e após a incubação com atropina (1µM). ** ($p < 0,01$) versus E^+	49
Figura 19.	Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis sem endotélio de aorta torácica isolada de rato pré contraídos com FEN, KCL 20 e 80. ** ($p < 0,01$) versus FEN. # ($p < 0, 01$) versus KCL 20.....	50
Figura 20	Cascata de síntese de prostaglandinas.....	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Quadro 1. Parâmetros comportamentais observados do tempo 0 até o 15º dia após o tratamento com EACL.....	32
Quadro 2. Representação esquemática do preparo dos animais para realização dos experimentos in vivo.....	33
Quadro 3. Esquema representativo do protocolo experimental in vivo do EACL em ratos não-anestesiados.....	35
Tabela 1. Lista de plantas medicinais permitidas pela ANVISA no Brasil e suas ações terapêuticas.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

HA – hipertensão arterial

NO – óxido nítrico

EACL – extrato aquoso de *Curcuma longa*

FEN – fenilefrina

ACh – Acetilcolina

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metil éster

NPS – nitroprussiato de sódio

INDO – Indometacina

NaCl – Cloreto de sódio

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

CaCl₂ - Cloreto de calcio

pH- Potencial hidrogeniônico

HCl – ácido clorídrico

NaOH – hidróxido de sódio

UFAC – Universidade Federal do Acre

UTAL - Unidade de tecnologia de Alimentos

NUBEX - Núcleo de Biologia Experimental

OECD - Diretrizes para os ensaios de produtos químicos

TFD – teste de dose fixa

CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal

SNC - Sistema nervoso central

O₂– Oxigenio

CO₂– Gás carbônico

KB – Solução de KREBS

COX – Ciclo oxigenasse

VOCC's – Canais de Ca²⁺ Operados por voltagem

EPM - erro padrão da média

EC50 – Concentração de 50 % do efeito

P- erro

ALT - alanina-aminotransferase

AST - aspartato-aminotransferase

FA - fosfatase alcalina

GGT - gama-glutamyltransferase

CK - creatina quinase

PAM - Pressão arterial média

FC – frequência cardíaca

v.o – via oral

i.v – intravenoso

OMS – Organização mundial de saúde

DC – Débito cardíaco

RVP - resistência vascular periférica

SRAA- renina-angiotensina-aldosterona

ECA - enzima conversora de angiotensina

FHDE - fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio

eNOS- óxido-nítrico-sintase

cGMP – monofosfato cíclico de guanosina

PGI₂ – prostaglandina I₂

PGH₂ - prostaglandina H₂

TXA₂ - tromboxano A₂

MLV - músculo liso vascular

COX - enzima cicloxigenase

cAMP - A adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

RS - retículo sarcoplasmático

Ca²⁺ - Cálcio

IP3 - inositol trifosfato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
	2.1 Sistema Cardiovascular.....	13
	2.1.1 Considerações sobre estrutura e função do sistema cardiovascular.....	13
	2.1.2 Considerações sobre a pressão arterial (PA).....	14
	2.1.2.1 Mecanismo de regulação da PA.....	14
	2.1.3 Considerações sobre o endotélio vascular.....	16
	2.1.4 Considerações sobre o músculo liso vascular (MLV).....	19
	2.1.4.1 Mecanismo de contração do músculo liso vascular (MLV).....	20
	2.1.4.2 Mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular (MLV).....	21
	2.1.4.3 Considerações sobre hipertensão arterial.....	22
	2.2 Utilização de plantas medicinais.....	23
	2.2.1 Plantas medicinais com ação no sistema cardiovascular.....	26
	2.2.2 Considerações sobre a espécie <i>Curcuma longa</i> L.....	27
3.	OBJETIVOS.....	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
	4.1 Materiais	31
	4.1.1 Drogas e soluções.....	31
	4.1.2 Animais.....	31
	4.2 Métodos.....	32
	4.2.1 Coleta e identificação botânica.....	32
	4.2.2 Obtenção do extrato.....	33
	4.2.3 Estudo da toxicidade.....	33

4.2.4 Experimentos <i>in vivo</i>	35
4.2.4.1 Preparo do animais.....	35
4.2.4.2 Sistema de registro.....	35
4.2.4.2 Protocolos experimentais.....	35
4.2.5 Experimentos <i>in vitro</i>	37
4.2.5.1 Eutanásia.....	37
4.2.5.2 Preparo dos anéis de aorta torácica isolada de rato.....	37
4.2.5.3 Verificação da presença ou ausência do endotélio funcional.....	38
4.2.5.4 Protocolos experimentais.....	39
4.2.5.4.1 Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta com e sem endotélio com Fenilefrina.....	39
4.2.5.4.2 Avaliação do efeito da inibição da síntese do NO (L-NAME) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta.....	40
4.2.5.4.3 Avaliação do efeito do bloqueio muscarínico (atropina) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta.....	41
4.2.5.4.4 Avaliação do efeito da inibição da COX (indometacina) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta.....	41
4.2.5.4.5 4.2.5.4.5 Avaliação da atividade do EACL sobre contrações induzidas por KCl.....	42
4.3 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	44
4.1 Ensaio da Toxicidade.....	44
4.2 Experimentos <i>in vivo</i>	44
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	45
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57
9. ANEXOS.....	62

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis no mundo. Seu aumento significativo aponta para a necessidade de intervenções eficazes e de baixo custo (GUIMARÃES et al., 2015; RIQUE, 2002).

Segundo o estudo de 2015 da American Heart Association, durante a última década pesquisada, de 2001 a 2011, a taxa de morte por hipertensão, aumentou 13,2% em mais de 190 países pesquisados (PASTORE, 2010). Já no Brasil, as doenças cardiovasculares estão nas estatísticas de saúde como a primeira causa de morte há pelo menos quatro décadas (SOUZA, 2017).

A hipertensão arterial (HA) é observada como importante fator de risco cardiovascular e sua alta prevalência torna considerável o conhecimento de sua ocorrência, assim como a correlação com outros possíveis fatores desencadeantes de eventos cardiovasculares, já que é apontada como um problema de saúde pública global, causando 9,4 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo (MOURA, 2015).

A utilização de medicamentos para combate a HA é a principal forma terapêutica utilizada, mesmo sabendo que um dos maiores problemas no que concerne ao tratamento da HA são os efeitos colaterais que provocam os medicamentos (GUSMÃO et al., 2009). Há também outros recursos terapêuticos que são utilizados de forma alternativa, o uso de plantas medicinais, que se expande em diversas sociedades (BRUM et al., 2017).

O conhecimento sobre plantas medicinais representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002), pois apesar da grande revolução na medicina existem ainda obstáculos na utilização dos recursos mais elaborados e modernos pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de medicamentos (JUNIOR et al., 2005).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, como a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*) (BOLDI, 2004). No Brasil apenas 5% dos medicamentos são de origem vegetal, mesmo com a grande diversidade de plantas medicinais conhecidas nesse país (RODRIGUES, 2011).

Para o tratamento da HA também já estão sendo estudadas plantas que possuem efeitos de alto poder de diminuição da pressão arterial como o alho (*Allium*

sativum) possuindo efeito vasorelaxante por liberação de óxido nítrico (NO) (ALEXANDRE et al., 2008), Laranja (*Citrus sp*), bloqueando os receptores β -adrenérgicos (LONGO et al., 2011), Chuchu (*Sechium edule*), com comprovado efeito anti-hipertensivo (LOMBARDO et al., 2014), dentre outros.

A espécie *Curcuma longa* Linnaeus da família Zingiberaceae, popularmente conhecida como Gengibre Amarelo ou Açafrão, é de origem Malaio-Indígena, mas é muito cultivada nos países tropicais como planta medicinal ou condimentar (FILHO et al., 2009). A parte mais utilizada é seu rizoma seco, que é amplamente utilizado em muitos países na culinária como corante e especiarias, e as folhas são usadas comumente para embrulhar peixe durante o cozimento ou para assar, propiciando aroma e sabor (GONZALVEZ; VISTEL, 2015).

C. longa apresenta como principal componente os curcuminóides (derivados fenólicos), peptídeos solúveis em água, proteínas e resíduos de metionina (MENON; SUDHEER, 2007; WORLD et al., 1999). São três os pigmentos curcuminóides: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, presentes no rizoma nas concentrações de 60, 22 e 18%, respectivamente (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; FILHO et al., 2009).

Esta planta é largamente utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças (FILHO et al., 2009). Há estudos que comprovam suas propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antimicrobianas e antiproliferativas (ZAMARIOLI et al., 2015; AUGUSTYNIAK et al., 2010; ZHO; BEEVERS, 2011). Além disso, as folhas possuem óleo essencial com atividade antioxidante (KINUPP; LORENZI, 2014; PRIYA et al., 2012).

Dentre esses estudos destacam-se os que têm como foco central o efeito das plantas medicinais e suas ações no sistema cardiovascular como o de Adaramoye (2009), em seu estudo que demonstra que o extrato hidroalcolico de *C. longa* apresentou efeito hipotensor e vasorelaxante independente de endotélio vascular em artéria mesentérica isolada de ratos.

Em função desses dados o sistema cardiovascular tem sido um dos principais focos de pesquisas, que buscam incessantemente medidas curativas e até mesmo preventivas, a fim de oferecer maiores benefícios para a sociedade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema cardiovascular

2.1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTRUTURA E FUNÇÃO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR

O sistema cardiovascular garante homeostase do organismo, isto é, ele regula o meio interno, transportando e distribuindo substâncias essenciais para os tecidos, assim como remove os produtos provenientes do metabolismo, contribui para o controle da temperatura e ajusta o suprimento de oxigênio e nutrientes em diferentes situações fisiológicas (SIEGEL, 1996).

Esse sistema está inserido em animais de maior porte o qual funciona como transportador de substâncias através do sangue, sendo necessário um sistema de propulsão, no caso o coração, que impulsiona o volume sanguíneo para os órgãos do corpo utilizando-se de um sistema de vasos, os quais podem ser veias ou artérias (JOCA, 2012; RANDALL et al., 2000).

O coração é um órgão muscular, impar e mediano que atua como uma bomba contrátil propulsora de sangue, auto ajustável, capaz de proporcionar pressão e sucção, atuando em conjunto com uma imensa rede de vasos sanguíneos para conduzir sangue a todas as partes do corpo humano (RANDALL et al., 2000). Sua cavidade é dividida em quatro câmaras cardíacas sendo: dois átrios direito e esquerdo e dois ventrículos direito e esquerdo por meio dos septos átrios ventriculares, interatrial e interventricular (VERONEZ, 2017).

Neste sistema, além do coração, os vasos sanguíneos exercem funções de extrema importância, eles formam um conjunto de vasos que partindo dos tecidos, vão se formando em ramos de maior calibre até atingirem o coração, sendo, os que conduzem o sangue para fora do coração, as artérias. Estas se ramificam muito, tornam-se progressivamente menores, e terminam em pequenos vasos determinados arteríolas (VERONEZ, 2017). A partir destes vasos, o sangue é capaz de realizar suas funções de nutrição e de absorção atravessando uma rede de canais microscópicos, chamados capilares, os quais permitem ao sangue trocar substâncias com os tecidos. Dos capilares, o sangue é coletado em vênulas; em seguida, através das veias de diâmetro maior, alcança de novo o coração. Esta passagem de sangue através do coração e dos vasos sanguíneos é chamada de circulação sanguínea (FEIJO, 2007).

A aorta é a principal artéria conectada ao ventrículo esquerdo, a partir dela surgem as outras artérias do corpo humano. É o primeiro vaso a receber o sangue, recém ejetado e com a maior quantidade de oxigênio alcançada após a passagem pela circulação pulmonar. Em uma região chamada de leito mesentérico, a aorta começa a se ramificar para dar origem às médias, pequenas artérias e as arteríolas que oferecem maior resistência ao fluxo sanguíneo (FEIJO, 2007).

A homeostase do sistema cardiovascular depende da manutenção do fluxo sanguíneo, da pressão arterial, do débito cardíaco, da resistência vascular periférica total e de todas as outras variáveis envolvidas em condições normais (ASSIS, 2007).

2.1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL (PA)

Pressão, é definida como força por unidade de área, é uma entidade física, portanto depende de fatores como volume de sangue e capacitância da circulação. Tem-se então um componente tônico, responsável pela manutenção e um componente físico que atua momento a momento na regulação da PA (IRIGOYEN et. al., 1998).

A PA é gerada e mantida pela interação entre força propulsora cardíaca, capacidade de dilatação elástica da aorta e a resistência ao fluxo de sangue, exercida predominantemente, pelas arteríolas e artérias de pequeno calibre (ASSIS, 2007).

2.1.2.1 Mecanismo de regulação da PA

A regulação da PA depende de fatores físicos (volume sanguíneo e a capacitância da circulação), resultando da relação direta entre débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVP) e capacitância venosa (TORTORA, 2012). A PA é o produto do DC pela RVP. (JOHNSON, 2003; GUYTON e HALL, 2011; AIRES, 2013).

O DC representa a quantidade de sangue que cada ventrículo lança na circulação (pulmonar ou sistêmica) em determinada unidade de tempo, de forma que essa quantidade de sangue ejetada em cada contração é denominada de débito sistólico. Dessa forma, o débito cardíaco pode ser calculado através do produto entre o débito sistólico e a frequência cardíaca (ASSIS, 2007).

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

Em curto prazo, o sistema nervoso central (SNC) pode regular a PA por meio de mecanismos neurais, tais como: o sistema de barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, os quais atuam diretamente sobre as variáveis cardiovasculares citadas anteriormente (LOHMEIER e ILIESCU, 2015).

A regulação neural é o maior resultado das ações dos núcleos cerebrais sobre os neurônios pré-ganglionares simpático, localizados tanto na medula espinhal como sobre os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos no tronco cerebral. Suas estruturas denominadas núcleos desempenham papéis de significativa importância para o controle da PA e circulação, pois recebem e mandam projeções para todo o cérebro. Toda essa regulação não seria possível se o SNC não fosse continuamente informado sobre os níveis de PA, o que efetivamente é realizado por receptores especializados, situados estrategicamente no organismo e que serão descritos a seguir (ANDERSON e KANZE, 1994).

Os barorreceptores arteriais são o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento. São terminações sensoriais especializadas, que respondem a alterações de tensão na rede vascular. As terminações barorreceptoras estão localizadas na camada adventícia dos grandes vasos, tais como aorta e bifurcação carotídea, que são estimulados por deformações das paredes desses vasos, normalmente provocadas pela onda de pressão pelas características mecano-elásticas da parede (IRIOYEN, 1998).

Durante elevações da PA, há grande deformação da parede e ativação dos barorreceptores que geram os potenciais de ação. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), onde neurônios secundários excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e queda da FC (ALNIMA et al., 2013).

Não apenas nas elevações ou diminuições súbitas de PA, mas a cada sístole arterial, a onda de pulso sobre as artérias estira esses receptores, promovendo sua despolarização e assegurando o controle da PA momento a momento. (JACOB et al., 1989; VASQUEZ et al., 1997). Embora os barorreceptores sejam capazes de adaptar-se aguda e cronicamente a altos níveis de pressão, a disfunção barorreflexa tem sido reportada na hipertensão arterial clínica e experimental e em outras doenças cardiovasculares (GUYTON e HALL, 2002). Há dados na literatura demonstrando que

o prejuízo na sensibilidade barorreflexa pode ser tanto causa como consequência da hipertensão arterial (AIRES, 1999).

No controle em médio prazo da PA figuram sistemas hormonais como sistema das catecolaminas ou mesmo calicreína-bradicinina (AIRES, 1999). A histamina que interfere no aumento de outros peptídeos vasoativos vinculados ao sistema calicreína-bradicinina também pode em certas condições se envolver no controle da PA (BEST e TAYLOR, 1990).

Em longo prazo a regulação da pressão arterial é realizada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a partir da regulação do volume dos líquidos corporais (volemia), regulando conseqüentemente o equilíbrio hidroeletrólítico do corpo (AIRES, 2013).

Quando o organismo está sob condições de hipotensão (por hipovolemia) o SRAA mantém a pressão arterial por meio da angiotensina II, gerada na circulação em uma cascata enzimática iniciada pela renina, que é secretada pelas células justaglomerulares do rim. A renina cliva o angiotensinogênio produzido no fígado, gerando a angiotensina I, que dá origem à angiotensina II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (AIRES, 2013). A angiotensina II vai para os rins via corrente sanguínea, onde, nos capilares dos túbulos dos néfrons, estimulará a constrição da arteríola eferente, aumentando assim a pressão. Simultaneamente, a angiotensina II também se dirige ao córtex das glândulas suprarrenais estimulando a liberação do hormônio aldosterona, que se dirige aos rins, no túbulo contornado distal dos néfrons e estimula mais ainda a absorção de sódio e água, aumentando ainda mais a volemia e a pressão. Dessa forma essa série de eventos podem culminar com a gênese da HÁ (Figura 1) (GUYTON e HALL, 2011).

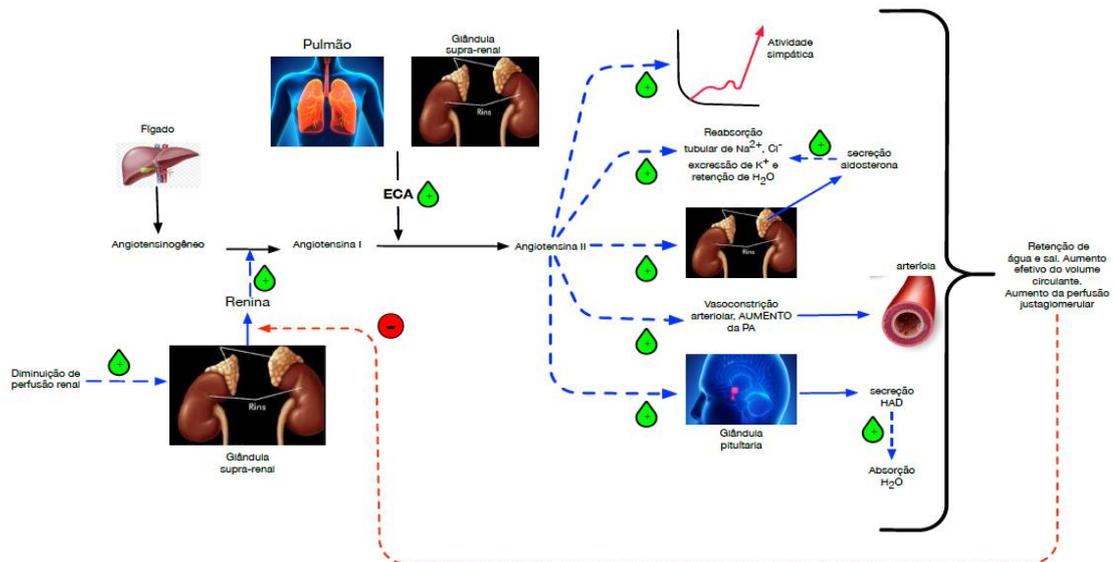
Várias outras substâncias naturais liberadas em condições fisiológicas ou patológicas exercem influência sobre o tônus vascular.

2.1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ENDOTÉLIO VASCULAR

As células endoteliais formam o endotélio vascular, um epitélio de revestimento simples e plano que recobre a face interna dos vasos sanguíneos e coração. O endotélio vascular constitui uma área de interação ativa, estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular (BATLOUNI, 2001). O endotélio deixa a condição de simples revestimento interno dos vasos e torna-se verdadeiro sensor de

alterações físicas e químicas do meio circulante e modulador da reatividade para o ajuste àquelas variações, podendo inclusive afetar os processos proliferativos do músculo liso vascular, na medida em que é produtor de fatores de relaxamento (FRDE) (RIBEIRO et al., 1992).

Figura 1: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)



A figura representa a influência do SRAA, na gênese da hipertensão, como influência da liberação de renina pelas glândulas supra-renais que irão converter angiotensinogênico liberado pelo fígado em angiotensina I. A ECA, enzima conversora de angiotensina, liberado pelos pulmões e fígado, converte angiotensina I em angiotensina II, que atua principalmente como um importante vasoconstritor, provocando vários efeitos a nível central e periférico. 🟢 sinal de estimulação, 🔴 sinal de inibição, HAD – hormônio antidiurético. (GONÇALVES, 2016).

Até o final dos anos 60, o endotélio foi considerado como uma barreira celular relativamente inerte, não-trombogênica. No entanto em 1966, foi então entendido que em condições fisiológicas o endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular, controle de coagulação e regulação de adesão e migração de leucócitos (SANDOO et al., 2010). Estudos mostraram que as várias funções desempenhadas pelo endotélio estão relacionadas à capacidade de liberar e sintetizar substâncias, a partir de estímulos físicos, neurais e hormonais (CARDOSO et al., 2012; RATJEN et al 1999).

Estas substâncias possuem atividades vasoativas como as vasodilatadoras (óxido nítrico (NO), prostaciclina), e fatores hiperpolarizantes (FHDE), assim como, substâncias constritoras também derivadas do endotélio (endotelina-I, tromboxano,

prostaglandina e espécies reativas de oxigênio) (RATJEN et al 1999; BAHIA, et al., 2006; VANHOUTTE, 2009).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio preciso entre a liberação desses fatores, sendo a produção dos fatores relaxantes mais importantes, sobressaindo o efeito dos agentes contráteis. No entanto, em diversas condições patológicas, esse equilíbrio é alterado com uma conseqüente atenuação dos efeitos vasodilatadores, sendo, portanto, o endotélio de suma importância na gênese de doenças vasculares (VANE et. al., 1990).

O endotélio íntegro tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas (BORGES, 2011). Essas ações são exercidas principalmente liberação continuada de óxido nítrico, considerado o mais importante fator endotelial (SNYDER & BREDET, 1992, CHAO, 2010).

O NO é uma molécula gasosa simples, encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo, é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase endotelial (eNOs) (GUADAGNIN et al., 2015). Ele atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (BORGES, 2011).

O segundo mecanismo de vasorelaxamento dependente do endotélio é iniciado pela síntese de prostaciclina (PGI_2) através da enzima cicloxigenase (COX). PGI_2 então relaxa células musculares lisas ativando receptores de membrana plasmática acoplados à adenilato ciclase e aumentando a concentração de cAMP (A adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) intracelular (BELTOWSKI, 2014).

Quando os fosfolípidios de membrana liberam o ácido araquidônico que os compõe, pela ação da COX o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina H_2 (PGH_2) que através de enzimas específicas é convertida em PGI_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 ou tromboxano A_2 (TXA_2). A PGI_2 é também conhecida como prostaciclina, sendo esta o produto mais abundante produzido a partir do ácido araquidônico e responsável pelo efeito vasodilatador (VANHOUTTE, 2009).

A contribuição da prostaciclina à vasodilatação dependente do endotélio é usualmente menor que a do NO. Mesmo diante de pequenas quantidades de

prostanóides vasoconstritores, como PGH_2 e tromboxano A_2 , que também são formadas, em condições fisiológicas, seus efeitos são inibidos pelo efeito vasodilatador da prostaciclina, do NO e do EDHF (BATLOUNI, 2001).

Outra forma de mecanismo de relaxamento é o fator hiperpolarizante derivados do endotélio (FHDE), uma substância ainda não identificada (FELIZZOLA, 1996). Sua existência é inferida pela hiperpolarização das células musculares lisas que ocorre após o estímulo de alguns vasodilatadores (JIN et al., 2011). NO e PGI_2 funcionam como fatores relaxantes derivados do endotélio principalmente em artérias de maior calibre. Deles a contribuição diminui com a diminuição da resistência vascular, os quais são mais importantes para a regulação da resistência periférica total e pressão sanguínea (BELTOWSKI, 2014).

2.1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÚSCULO LISO VASCULAR (MVL)

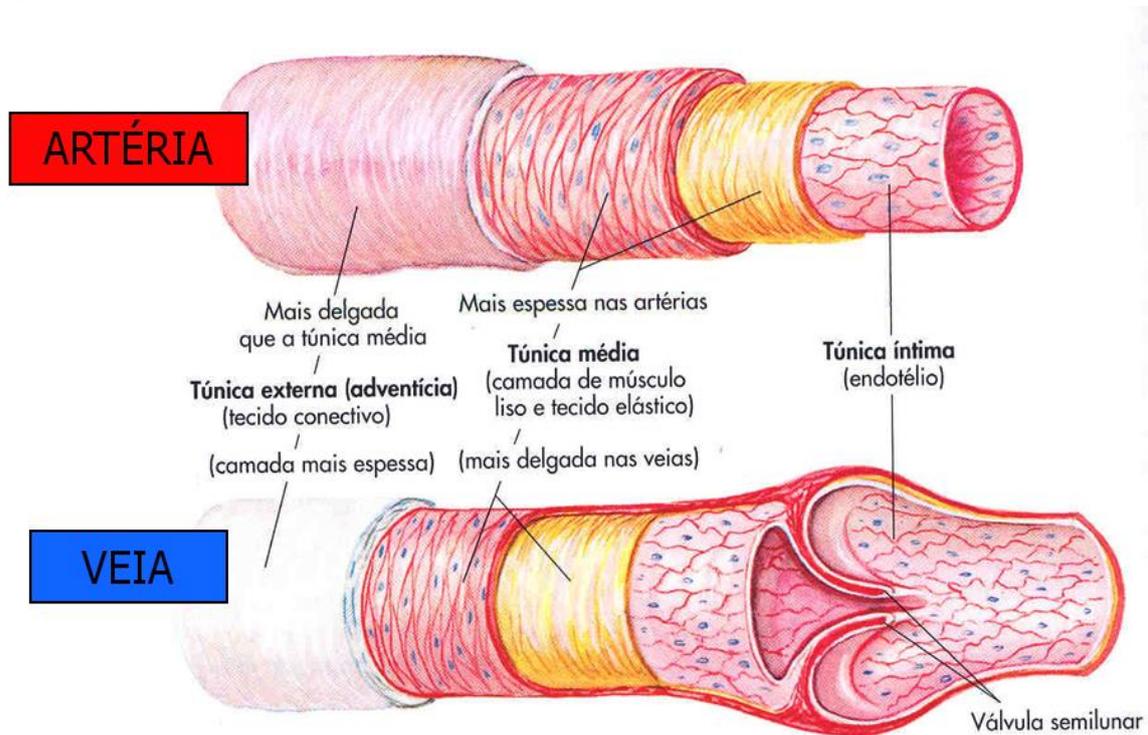
Os vasos sanguíneos são formados por três camadas de tecidos distintas: camada adventícia, camada média e camada íntima. A camada adventícia é a mais externa e mais forte das três, sendo composta de tecido conjuntivo denso, mas rico em componentes celulares como fibroblastos e macrófagos. A túnica média é a mais espessa formada principalmente de tecido muscular, além de elastina e colágeno. A camada íntima é constituída por uma única camada de células, o endotélio e suas fibras elásticas elas recobrem a luz do vaso, tendo contato direto com o fluxo sanguíneo, encontra-se dispostas longitudinalmente e imersas em substâncias intracelular amorfa (RODRIGUES, 2010; BERNE et al., 2004) (figura 2).

O músculo liso vascular (MLV) é composto por células histologicamente mononucleadas com formato fusiforme. Conforme o vaso e a estrutura por ele irrigada, o arranjo de suas células varia entre helicoidal ou circular. Este último e mais comum arranjo é o que provoca a redução do lúmen do vaso durante o processo de contração (ou seja, através desta disposição celular o MLV contraí de maneira simultânea) (BERNE et al., 2004).

Na luz vascular encontram-se as células endoteliais que se projetam para o interior do MLV permitindo assim, a transferência de íons entre si e explicando a interação entre ambas as estruturas (BERNE et al., 2004; FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2006), assim, quando há uma despolarização esta se propagará por todas as células ao redor.

Essas células fazem parte da constituição dos vasos de grande calibre, como a aorta (figura 2), dentre estas o MVL se encontra na camada média, o qual é responsável pela contração ou relaxamento vascular (KLABUNDE, 2005).

Figura 2: Estrutura Vascular Básica



Fonte: KLABUNDE, 2005.

A estrutura do vaso sanguíneo não é estática. Ela se remodela continuamente para se adaptar ao seu ambiente biomecânico. Assim, o calibre vascular é controlado pela quantidade, composição e organização da matriz extracelular, como também pelas unidades contrateis das células musculares lisas (GUADAGNIN et al., 2015).

Além disso, a organização e o acoplamento mecânico entre as células musculares lisas com a matriz extracelular determina as propriedades mecânicas da parede do vaso. Estas células normalmente não operam em sua total ativação. Pelo contrário, estas células têm um tônus, conseqüentemente, o tônus inalterado em sua plasticidade contrátil e de citoesqueleto resulta em diâmetros alterados (CARVALHO, 2001). MLV é responsável pelo controle da resistência periférica total, pelo tônus arterial e venoso e pela distribuição do fluxo sanguíneo.

2.1.4.1 Mecanismo de contração do músculo liso vascular (MVL)

O tônus vascular é dado pela relação entre a ação vasoconstritora e vasodilatadora. Os mecanismos pelos quais essa relação torna-se estável e equilibrada são essenciais para a manutenção de um tônus fisiológico no MLV. O desequilíbrio entre as duas ações pode dar origem a doenças vasculares, como a hipertensão (ELLINSWORTH et al., 2012).

Para desencadear a contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do Ca^{+2} através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático (RS), aumentando a oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil, sendo este a principal fonte de Ca^{+2} intracelular envolvida no processo de contração. (LINCON et al., 2001).

Os íons Ca^{2+} desempenham importante papel no controle do tônus vascular. Como a musculatura lisa não possui a troponina, proteína reguladora presente no músculo esquelético, que é ativada pelos íons Ca^{2+} para promover a contração muscular, a contração da musculatura lisa ocorre devido à combinação entre o cálcio e a calmodulina (GUADAGNIN et al., 2015).

Essa combinação ativa uma enzima fosforilativa, a miosina quinase, que tem a função de fosforilar as cadeias leves da miosina, adquirindo a capacidade de se fixar ao filamento de actina e realizar a contração muscular (JIN et al., 2011). Essa interação entre actina e miosina só cessa no momento que há redução do Ca^{2+} intracelular. Dessa forma, a diminuição da concentração de Ca^{2+} impediria a combinação cálcio/calmodulina, gerando um relaxamento da musculatura lisa vascular e a consequente vasodilatação (ZAGO e ZANESCO, 2006).

2.1.4.2 Mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular (MVL)

Além dos fatores relaxantes derivados do endotélio, o NO, prostaciclina e FHDE como explicado anteriormente, o MLV apresenta mecanismos para diminuir o Ca^{2+} intracelular e manter em níveis estáveis, por exemplo através de canais iônicos (ELLINSWORTH et al., 2012).

As células musculares das artérias e arteríolas apresentam um potencial de membrana entre os -60mv e os -40mv quando sujeitas a níveis normais de pressão intravascular. O potencial de membrana das células musculares vasculares tem um papel fundamental na regulação do tônus vascular, através de alterações da entrada de íons

Ca^{2+} para o citosol através de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (GUADAGNIN et al., 2015).

A atividade dos canais de potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares, sendo um determinante importante do tônus vascular (JIN et al., 2011). A abertura de um canal de potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular. Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e conseqüente diminuição da entrada de íons Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento vascular (vasodilatação) (ELLINSWORTH et al., 2012).

O potencial de membrana pode também regular a concentração de Ca^{2+} citosólico através do trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ assim como através da libertação de Ca^{2+} intracelular resultante da produção de inositol trifosfato (IP3) dependente da voltagem (o IP3 fixa-se a canais específicos ligando-dependentes, no reticulo sarcoplasmático promovendo a libertação de íons Ca^{2+} para o citosol aumentando a sua concentração) (ASSIS, 2007).

Pode-se deste modo concluir que a hiperpolarização da membrana através da abertura de canais iônicos, como os de potássio constitui um mecanismo poderoso na diminuição da pressão arterial, mediante vasodilatação provocada.

2.1.4.3 Considerações sobre hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), mais conhecida como pressão alta, é uma doença caracterizada pela elevação sustentada dos níveis de pressão arterial (PA) (DUARTE et al., 2018). Os níveis de pressão de 130/85 mmHg são considerados normais para a população adulta, acima disso, já se caracteriza a hipertensão. Geralmente, esta doença não tem uma causa conhecida sendo chamada de hipertensão essencial ou primária, mas em uma pequena parte a hipertensão pode ser causada por outras doenças, ou efeito de medicações, denominada hipertensão secundária (LIMA et al., 2017).

Apesar de, na maioria das vezes, não conseguirmos saber com precisão a causa da hipertensão arterial, sabemos que muitos fatores podem ser responsáveis: hereditariedade, idade, raça, obesidade, tabagismo, sedentarismo, stress, uso de bebidas alcoólicas (LIMA et al., 2017).

Esta doença é a mais frequente das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e o principal fator de risco para complicações cardiovasculares como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio, além da doença renal crônica terminal. Estima-se que as doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de morte entre as DCNT do mundo e seu aumento significativo aponta para a necessidade de intervenções eficazes (GUIMARÃES et al., 2015).

A hipertensão é observada como importante fator de risco cardiovascular e sua alta prevalência torna considerável o conhecimento de sua ocorrência, assim como a correlação com outros possíveis fatores desencadeantes de eventos cardiovasculares, já que é apontada como um problema de saúde pública global, causando 9,4 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo (MOURA, 2015).

2.2 Utilização de plantas medicinais

Plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem substâncias com ação terapêutica (MESSIAS et al., 2015; MARTINS et al., 2003). As plantas, desde a antiguidade, vêm sendo utilizadas pelo homem como fontes terapêuticas, isso acontece em consequência ao fácil acesso, baixo custo e principalmente, pelo empirismo (SIXEL e PECINALLI, 2013).

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e muito antes do surgimento da escrita a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais (CANEIRO, 2014; TOSCANO, 2011). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população mundial, em sua maior parte nos países subdesenvolvidos, utilizam as plantas medicinais para suprir suas necessidades médicas primárias (SOBRINHO et al., 2017; RATES, 2001).

Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (BEVILACQUA, 2010), e em muitas comunidades seu conhecimento simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico (MACIEL et al., 2002), muito embora cada vez mais novos fármacos são inseridos na farmacopéia.

A origem desse saber popular se encontra na observação constante e sistemática dos fenômenos e das características da natureza e na conseqüente experimentação empírica desses recursos, o que justifica a importância e a posição que as plantas

medicinais assumem nos resultados das investigações etnobotânicas. (DAVID e PASSA, 2015).

Por isso, David e Passa (2015) e Caetano et al. (2014) entendem que registrar o conhecimento do uso de plantas medicinais é importante e necessário, pois uma perda progressiva deste pode acontecer se não transmitido às gerações futuras, e sua erosão pode representar a perda da identidade cultural de um povo como apontam.

O Brasil é conhecido mundialmente não só por ser uma potência economicamente emergente, mas também por apresentar uma flora bastante diversificada e pouco explorada pela sociedade científica. A realidade é que ele é detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (CARNEIRO et al., 2014; FONSECA, 2012).

Apesar disso, ainda há poucos estudos voltados para produção de novos fármacos a partir da utilização de plantas medicinais, visto que nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012), entendendo assim que esses recursos estão sendo consumidos com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (JUNIOR, 2005).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de novo fármacos (que são as substâncias ativas isoladas), como para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os fitoterápicos (SCKENKEL et al, 2003; SIMOES e SCHENKEL 2002);

A biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira, desde 1886, já eram descritos em inventários, testemunhando a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal, podendo citar muitas espécies (KLEIN et al., 2010; JACOBSON et al., 2005).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o uso de algumas plantas medicinais nos serviços de saúde pública (tabela 1). Ressalta-se que este uso deve ter sua eficácia e segurança terapêuticas comprovadas previamente

por pesquisas, para que assim se possam obter os reais efeitos das plantas estudadas (MATOS e MATOS, 2000).

Tabela 1: Lista de plantas medicinais permitidas pela ANVISA no Brasil e suas ações terapêuticas (Adaptado de ANVISA, 2000)

Nome popular da planta	Forma de uso	Indicação terapêutica
Alho	Óleo ou extrato seco	Hepatoprotetor
Babosa	Creme Gel	Queimaduras
Erva doce	Infusão	Antiespasmódico
Gengibre	Infusão	Prófilaxia de náuseas
Hortelã	Infusão	Expectorante
Maracujá	Infusão	Sedativo

Baseadas na medicina tradicional, diversas drogas foram descobertas através de estudos etnofarmacológicos, que levam em consideração o conhecimento popular sobre o uso terapêutico de produtos naturais (SONIA, 2012). Medicamentos hoje produzidos em laboratório foram descobertos em plantas, tais como o ácido acetilsalicílico (*Filipendul aulmaria*), a digoxina (*Digitalis lanata*), morfina (*Papaver somniferum*), e a quinina (*Cinchona pubescens*), cloroquina (*C. pubescens*). A quinina e a cloroquina são importantes compostos antimalária, doença causada pelo protozoário *Plasmodium falciparum* (FIRENZUOLI e GORI, 2007).

É preciso ressaltar que hoje está sendo consumido fitoterápicos desenvolvidos na Europa e América do Norte, enquanto possuímos uma biodiversidade conhecida com pouca precisão qual tal sua complexidade, apesar das plantas medicinais brasileiras serem consideradas como altamente promissoras (SIMOES e SCHENKEL, 2002).

Em consequência disto, felizmente, atualmente está começando a ser visto que estudos científicos vêm sendo feitos no sentido de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais, com o intenso interesse que os cientistas, bem como a indústria farmacêutica denotam ao desenvolver pesquisas com objetivo de descobrir novos princípios ativos e também aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e oriundas de plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

A necessidade exige a unificação do progresso com aquilo que a natureza oferece, respeitando a cultura do povo em torno do uso de produtos ou ervas medicinais para curar os males. Conhecer o uso e as implicações das práticas alternativas de cura como o emprego das plantas medicinais nas populações é um avanço racional na melhor utilização destes recursos.

2.2.1 PLANTAS MEDICINAIS COM AÇÃO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

Sabe-se que o uso das espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas se perpetuaram na história da civilização humana e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como eficaz fonte terapêutica (KLEIN et al., 2010).

São muitas as plantas com atividade no sistema cardiovascular, estas contem metabólitos secundários que promovem relaxamento vascular e outros efeitos orgânicos. Desta forma as plantas medicinais com efeito no sistema cardiovascular, não é exclusivo deste sistema, como por exemplo, a *Curcuma longa*, que além de efeito vasorelaxante, tem efeito anti-microbiano, hepatoprotetor, hipoglicemiante, neuroprotetor e anti-hemolítico (ADARAMOYE et al., 2009).

O interesse pelo desenvolvimento deste estudo surgiu a partir da observação de relatos de idosos e do conhecimento expresso em estudos que descrevem a utilização de meios alternativos no tratamento da pressão arterial elevada (OLIVEIRA; ARAÚJO; MOREIRA, 2002). Especificamente em relação às alterações de pressão arterial, temos que o tratamento não farmacológico ou ações de mudança no estilo de vida devem ser as primeiras medidas adotadas por portadores de hipertensão arterial, exceto nos casos de hipertensão grave e na presença de comprometimento de órgãos-alvo (FONSECA, 2012).

Lopes et al., (2010) mostra em seu estudo a algumas plantas medicinais utilizadas por pacientes voluntários hipertensos, que inclui a *Eugenia uniflora L* (pitanga) com ação no sistema cardiovascular, diminuindo a pressão arterial, a *Bixa orellana L* (Urucum), *Cymbopogon citratus* Stapf (erva cidreira), *Matricaria chamomilla* (camomila), todas com ação semelhante no sistema cardiovascular.

Inserida neste contexto, a utilização das plantas está em forma de chás, infusões e macerações, tanto na prevenção da elevação da pressão arterial, quanto na tentativa de redução dos valores alterados de pressão arterial (FERRO, 2006).

Outras plantas podemos citar neste efeito, por exemplo a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) que apresenta atividade antioxidante e vasorelaxante in vitro, em leito arterial mesentérico de ratos e reduzindo a aterosclerose experimental em coelhos (FELLIPE, 2005), assim como no trabalho de Campos et al. (2017) mostrando a

atividade de esclareol, óleo essencial de *Salvia sclarea*, causando uma redução significativa na pressão sanguínea de ratos hipertensos.

Diante disso, é de extrema clareza que o reino vegetal tem contribuído de forma significativa para fornecer substâncias úteis no tratamento de doenças que afetam aos seres humanos, e entre essas doenças podemos citar as que estão relacionadas com o sistema cardiovascular.

2.2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Curcuma longa* L.

A *Curcuma longa* L., uma planta originária do sudeste da Ásia, mais precisamente das encostas de morros das florestas tropicais da Índia, e está distribuída em regiões tropicais e subtropicais por todo o mundo. Pertence à família Zingiberaceae, subordem Zingiberoidae, conhecida no mercado internacional como “turmeric”, é conhecida no Brasil principalmente como açafrão da terra, outros nomes regionais são, açafrão, batatinha amarela, gengibre dourado, mangarataia e cúrcuma, mas, por vezes, pode ser confundido com o açafrão verdadeiro (*Crocus sativus* L.) (MATA et al., 2004).

A planta apresenta folhas grandes de coloração verde, oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, que exalam um odor agradável quando contusas. Em condições de clima e solo favoráveis, a parte aérea da planta atinge, em média, 120 a 150 cm de altura. Possui pecíolos tão compridos quanto os límbos que, reunidos em sua base, formam o pseudocaule. O rizoma principal ou central é piriforme, arredondado ou ovóide, com ramificações secundárias laterais, compridas e tuberizadas (BERNI et al., 2014) (figura 3).

As folhas de cúrcuma podem ser usadas para embrulhar peixe durante o cozimento ou para assar, propiciando aroma e sabor. Também são ingredientes do *Redang*, prato tradicional com carne de búfalo do oeste de Sumatra. Além disso, possuem óleo essencial com atividade antioxidante (KINUPP; LORENZI, 2014; PACKIAVATHY et al., 2014), sendo sua capacidade de quelação de íons metálicos maior do em rizomas (BAUM et al., 2008).

Elas também são resíduos das operações pós-colheita, ou seja, não são aproveitadas no processamento do rizoma, gerando expressiva quantidade de resíduos orgânicos que são dispostos diretamente no meio ambiente (KINUPP, 2014). Estes resíduos desprezados podem ter finalidade muito mais benéfica e serem usados como fontes valiosas de nutrientes, além de desperdício de grande potencial de antioxidantes naturais (PACKIAVATHY et al., 2014).

Figura 3: Imagem de *Curcuma longa* L.



O estudo químico de diferentes amostras de açafrão produziu óleo essencial (4,2 a 14%), óleo gordo (4,4 para 12,7%) e umidade (10 a 12,0%). Foi demonstrado a presença de três constituintes principais pelo que a curcumina (diferuloylmetano) formou mais fração importante, sendo os outros dois derivados de curcumina (p-hidroxicinamoil (ferulolil) metano e p, p '-dihidroxidicinamoilmetanel (BAUM et al., 2008).

A curcumina, componente ativo da mesma, é conhecido por ter uma gama de bioativos, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-câncer e cardioprotetoras (CHAN et al., 2009). Sabe-se que várias folhas das plantas pertencentes a família *Zingiberaceae* como a *Alpinia zerumbet*, *Zingiber mioga*, *Kaempferia galanga* e a de *Curcuma longa* geralmente não estão incluídas na dieta habitual ocidental mas são utilizadas como condimento e na medicina tradicional asiática (KINUPP e LORENZI, 2014).

Estudos sobre a toxicidade e as propriedades anti-inflamatórias da curcumina foram incluídas in vitro, animal, e estudos humanos. Um teste humano de fase 1 com 25 indivíduos usando até 8000 mg de curcumina por dia durante 3 meses não encontrou toxicidade da curcumina (CHAINANI-WU, 2003).

Testes in vitro mostraram atividades antiparasitária, antiespasmódica, antiinflamatória e também o potencial anticancerígeno da curcumina, além das atividades como antibacteriana, onde o óleo da cúrcuma inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus typhosus*; atividade anti-HIV, em que a curcumina é um inibidor da proteína integrase na replicação do HIV-1 (FILHO, 2009).

Em relação ao sistema cardiovascular, *Curcuma longa* também apresenta efeito hipotensivo e bradicárdico significativo, se apresentando como potente vasodilatador nas artérias mesentéricas dos ratos (ADAMAYORE, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar os efeitos cardiovasculares do EACL em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar “*in vivo*” os possíveis efeitos do EACL sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos.
- Avaliar “*in vitro*” possível efeito vasorelaxante de EACL e seu mecanismo de ação em anéis de aorta torácica isolada de rato.
- Fazer estudo da toxicidade de EACL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 DROGAS E SOLUÇÕES

Para realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: tiopental sódico, sal sódico de heparina, fenilefrina (FEN), sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina (ACh), N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), Nitroprussiato de sódio (NPS), indometacina (Indo). As soluções estoques de indometacina foram dissolvidas juntamente com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5 N em água destilada. As demais soluções estoques foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas a 0°C e, imediatamente antes dos experimentos, diluídas em salina ou em água destilada, para os ensaios “*in vivo*” ou “*in vitro*”, respectivamente (CUNHA, 2004).

Para os experimentos “*in vitro*” o meio de perfusão usado foi a solução de Krebs, contendo em mM: NaCl 118,4; KCl 4,75; KH₂PO₄ 1,18; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 1,18; CaCl₂ 1,9 e glicose 5. A solução nutritiva teve pH ajustado entre 7,3 e 7,4 através de HCl 1M ou NaOH 1M e quando nas cubas, contendo as montagens, era aerada com carbogênio, à temperatura de 37°C.

4.1.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos para os experimentos de toxicidade e ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*) machos para os experimentos cardiovasculares *in vivo e in vitro* (figura 4). Todos foram originários do biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza, mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia/ Bionorte/ UFAC, produzidos e criados de acordo com as normas e padrões exigidos para uso de animais em pesquisa.

Figura 4: Camundongo *Swiss albino* e rato *Wistar*



Fonte: LAPFFAR

Os camundongos possuíam pesos entre 20 e 30 g e os ratos de 140 a 190g para realização dos experimentos, sendo estes mantidos sob condições de temperatura constante (22 ± 2 °C) com ciclo claro escuro padrão (12 horas claro/12 horas escuro), água e alimento *ad libitum*.

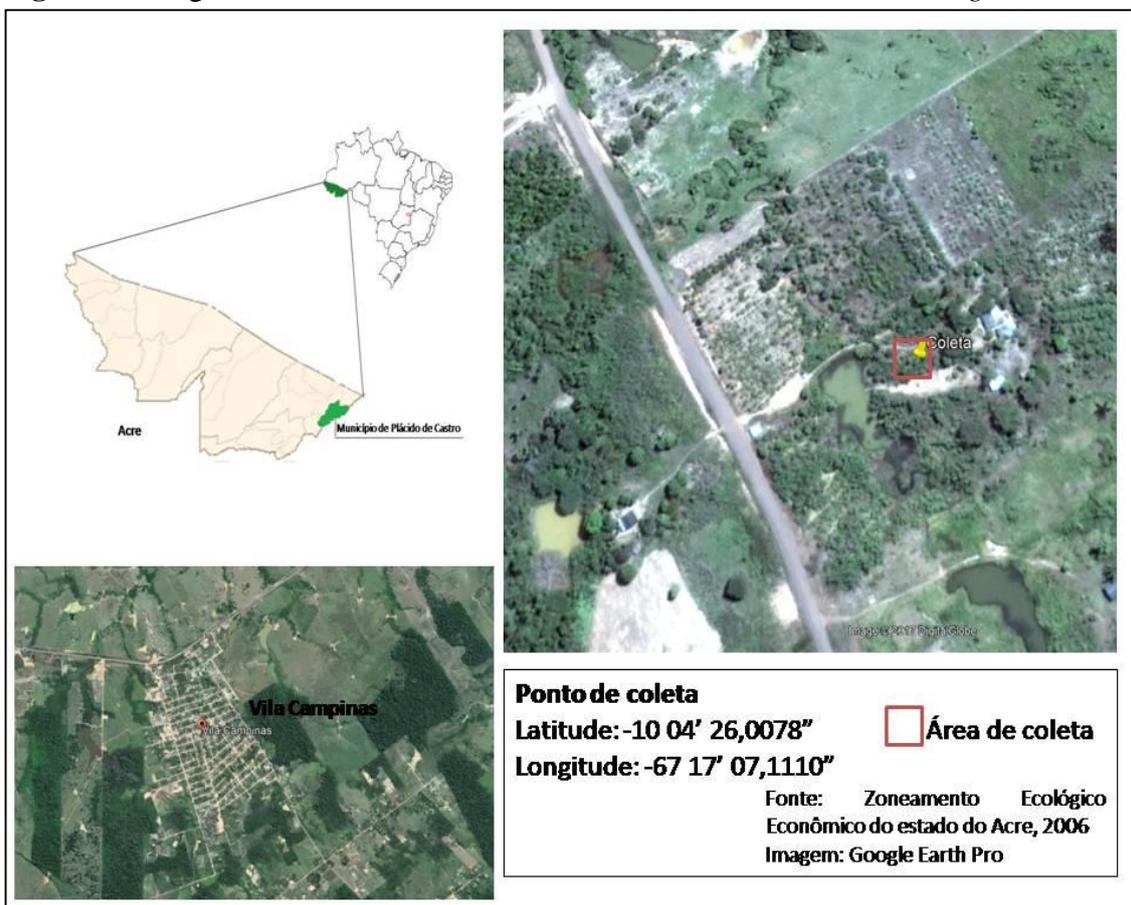
Os experimentos foram realizados conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e analisados e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Acre sob número 23107.018498/2016-40.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta e identificação botânica

As folhas da espécie *Curcuma longa* Linnaeus foram coletadas de plantas de até 100 cm de altura, no período chuvoso em uma propriedade particular ($10^{\circ} 04' 26,0078''$ S e $67^{\circ} 17' 07,1110''$ W), no município de Plácido de Castro, no estado do Acre (Figura 5). A espécie *Curcuma longa* L. já tinha registro no laboratório de Botânica da Universidade Federal do Acre, com número 20002.

Figura 5: Imagem de satélite do local de coleta das folhas de *Curcuma longa* L.



4.2.2 Obtenção do extrato

As folhas com aparência saudável foram selecionadas, lavadas com água corrente e colocadas em estufa à temperatura de 40 ° C por 48 horas, onde ocorreu a secagem uniforme. As folhas secas foram levadas à Unidade de tecnologia de Alimentos (UTAL) da UFAC para trituração em moinho tipo faca.

Para a obtenção do extrato, foram seguidas metodologias diversas descritas nas seguintes referências: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1959; FOSTER, 1949; DOMINGUES, 1973. Utilizou-se para a extração 4 litros de água destilada e 370 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo redondo com capacidade de 5 litros, sendo aquecido durante 10 minutos a temperatura de 100 ° C, seguido de filtração. O filtrado foi liofilizado e diluído em solução salina para os experimentos *in vivo* e em água para os experimentos *in vitro* de acordo com a dose a ser administrada.

4.2.3 Estudo da Toxicidade

Foi utilizado parâmetro do Teste da Dose Fixa (TDF), de acordo com a Acute Toxic Class Method (OECD, 2001). Neste teste, camundongos foram deixados em jejum 12 horas antes do experimento e foram divididos em 3 grupos (n=6) ditos como grupo 1 (controle), 2 (dose de 2000 mg/kg) e 3 (dose de 5000 mg/kg). No grupo 1 foi administrada somente solução salina e no grupo 2 a dose de 2000 mg/kg que na ausência de letalidade ou toxicidade foi administrada a dose de 5000 mg/kg no terceiro grupo. Todos os grupos receberam as doses por gavagem.

A toxicidade era caracterizada mediante observação dos parâmetros comportamentais descritos no teste hipocrático de MALONE; ROBICHAUD (1962): atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, piloereção, ptose, frequência respiratória, cianose, estereotipia, contorção, agressividade, ataxia, postura, sudorese, micção, diarreia e convulsão. Os parâmetros foram observados a cada 60 minutos durante 3 horas depois da administração do extrato. Após as 3 horas foram observados em 24, 48, 72 horas e no 15º dia (quadro 1).

Ao final das observações todos os animais foram eutanasiados de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação

animal – CONCEA. No ato do sacrifício foram utilizados barbitúricos e anestésicos tradicionais, de efeito rápido, suave e com mínimo desconforto para os animais, fármacos estes que são potentes depressores do SNC, cujos efeitos são amplamente conhecidos e previsíveis.

Quadro 1 : Parâmetros comportamentais observados do tempo 0 até o 15º dia após o tratamento com EACL

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos							
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso							
	0 h	1 h	2 h	3 h	24 h	48 h	72 h	15 dias
1-SNC								
a) Estimulante								
Hiperatividade								
Irritabilidade								
Agressividade								
Tremores								
Convulsões								
Piloereção								
Movimento intenso das vibrissas								
b) Depressora								
Ptose palpebral								
Sedação								
Ataxia								
Reflexo do endireitamento								
Analgesia								
Resposta do toque								
Perda do reflexo corneal								
c) Outros								
Ambulação								
Levantar								
Vocalizar								
Escalar								
Sacudir a cabeça								
Contorções abdominais								
Abdução das patas posteri								
2 – SN AUTÔNOMO								
Diarréia								
Defecação								
Respiração forçada								
Lacrimejamento								
Micção								
Salivação								
Cianose								
Força para agarrar								
3- MORTE								

4.2.4 Experimentos “*in vivo*”

4.2.4.1 PREPARO DOS ANIMAIS

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital (50mg/kg, i.p.) Em seguida, dois cateteres heparinizados (125 UI/ml em salina isotônica), foram implantados na artéria femoral (para registro da PA e da FC), e na veia femoral (para administração de drogas), como descrito previamente (LAHLOU et al., 1990). Todos os experimentos de registro cardiovascular foram realizados 48 horas após o procedimento cirúrgico (quadro 2).

4.2.4.2 SISTEMA DE REGISTRO

No momento do experimento, foi acoplado o catéter arterial a um transdutor de pressão fisiológica, conectado a um polígrafo digital ligado a um amplificador de sinal. A frequência cardíaca (FC) assim como a PAM serão obtidas através do Software Labchart 7.0 (AdInstruments) com o sinal obtido do transdutor (figura 6).

Quadro 2: Representação esquemática do preparo dos animais para realização dos experimentos *in vivo*.

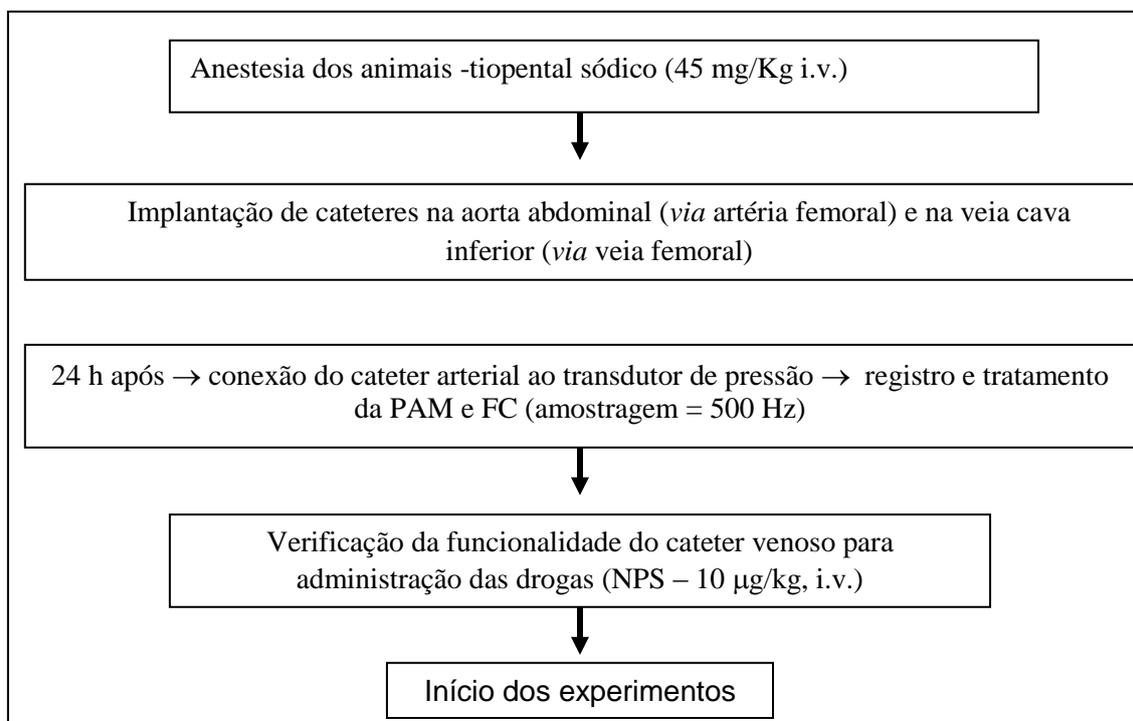
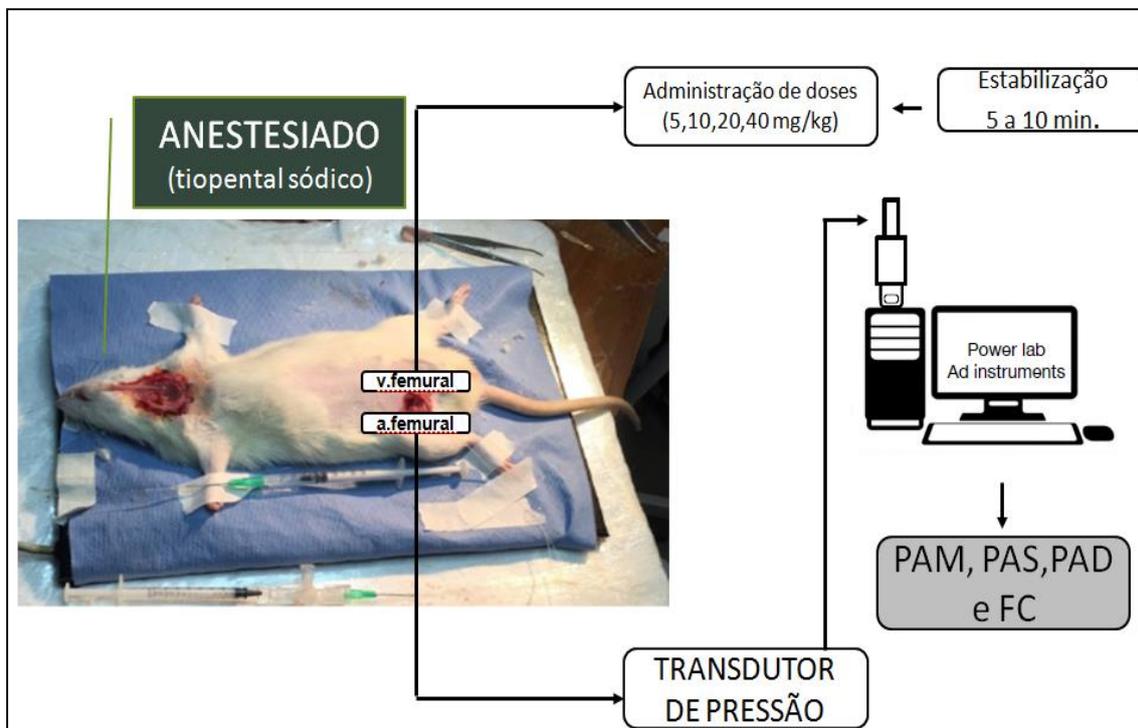


Figura 6: Protocolo para aquisição de dados da variação da PAM e FC e registro original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a PAM e FC em rato não-anestesiado



4.2.4.3 PROTOLOS EXPERIMENTAIS

Foram separados um grupos de 6 animais e realizada avaliação das variações da PA e FC induzidas pelo EACL. Para este protocolo foram utilizados os animais cateterizados do dia anterior sem efeito de anestésico.

4.2.4.3.1 Avaliação das variações da PA e da FC induzidas pela administração do EACL em ratos não anestesiados

Antes da aplicação de qualquer droga, os animais foram mantidos em aclimatação durante 30 minutos para minimização do estresse, estabilização dos parâmetros cardiovasculares e para refletir maior fidelidade das variações dos parâmetros em teste frente a administração das drogas. Após esse período era injetado 10 µg/kg de NPS para verificação do funcionamento dos cateteres e estabilizados durante 15 minutos para início dos experimentos.

Os animais receberam a primeira dose fixa do EACL por via endovenosa. Depois de cada dose, a seguinte era aplicada somente de 3 a 5 minutos após retomados

os níveis basais de PA e FC. As variações na PAM e FC foram registradas, obtendo-se uma curva dose-resposta (quadro 3).

4.2.4.3.2 Quadro 3: Esquema representativo do protocolo experimental in vivo do EACL em ratos não-anestesiados.

30 min.	↓	15 min.	↓	↓	↓	↓
ESTABILIZAÇÃO	NPS	5	20	10	40	
	(10 µg/kg)		(EACL mg/kg)			

4.2.5 Experimentos “*in vitro*”

4.2.5.1 EUTANASIA

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, caracterizado pelo rompimento da medula espinhal por pressão aplicada posteriormente à base do crânio, produzindo imediata perda da consciência, perda total da sensibilidade e morte instantânea.

4.2.5.2 PREPARO DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA ISOLADA DE RATOS

Após o sacrifício foi realizada a secção dos vasos sanguíneos e dissecação. Este último ocorreu mediante a incisão ventral e abertura da caixa torácica por excisão do esterno e de parte das costelas para visualização e retirada dos órgãos intratorácicos para o acesso à aorta torácica que foi transferida para uma placa de Petri com solução nutritiva de KB, para porvindoura remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo aderido.

Limpas, as aortas eram seccionada em anéis (4 a 5 mm de comprimento) (n=6), em seguida eram presos astes inoxidáveis onde de um lado era fixado no banho para órgão isolado, contendo o meio de perfusão a 37 °C (pH = 7,4), aerado continuamente com solução carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e de outro lado eram presas a um fio de algodão e conectados a um transdutor de força isométrica (figura 7) . As preparações de

aorta eram contraídas com uma tensão passiva de 1 g. Esta tensão era registrada através do transdutor de força isométrica.

Os sinais elétricos captados pelo transdutor foram decodificados e digitalizados pelos hardwares Pan Lab (AdInstruments). Os registros dos protocolos de contração da musculatura lisa foram obtidos através do software Protowin organ baths (Adinstruments) para posterior análise.

Figura 7: Representação esquemática da obtenção e montagem de anéis de artéria aorta isolada de rato na realização dos protocolos experimentais “*in vitro*”.



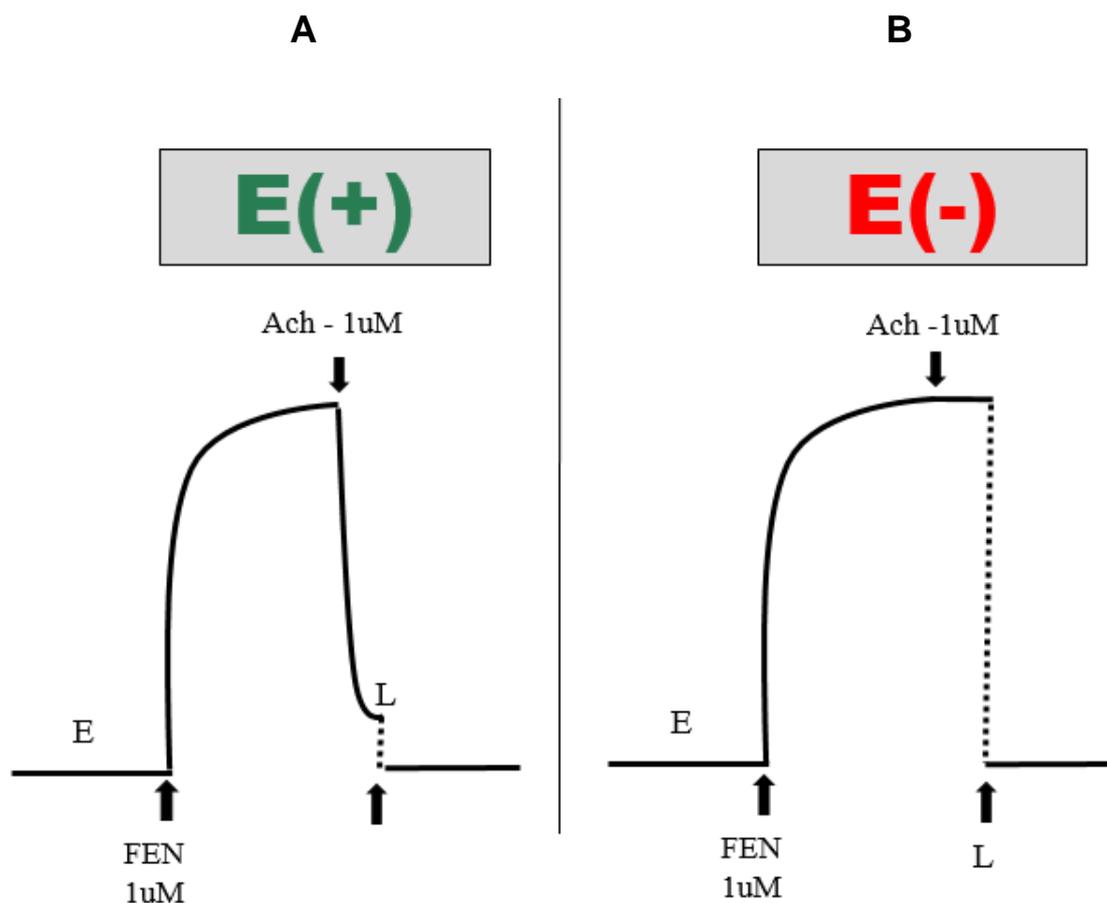
Fonte: LAPFFAR

4.2.5.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO ENDOTÉLIO FUNCIONAL

A verificação da presença ou ausência de endotélio nos anéis foi feita através da adição de 1 μM de ACh sobre o platô da fase tônica sustentada da contração induzida por 1 μM de FEN (FURCHGOTTE e ZAWADSKI, 1980), ficando estabelecido como anéis dotados de endotélio funcional aqueles cujos percentuais de relaxamento induzidos pela ACh fossem iguais ou superiores a 70 % (figura 8a) e desprovidos de endotélio, os anéis com relaxamentos induzidos pela ACh, sobre a contração tônica da FEN, menores que 5 % de relaxamento (Figura 8b).

Para obtenção de anéis sem endotélio, era feita a remoção da camada endotelial dos anéis por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de platina envolvida por delgada camada de algodão.

Figura 8: Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EACL (1, 10, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis providos de endotélio (A) e anéis desprovidos de endotélio (B), isolados de aorta torácica de rato pré-contráidos com 1 μM de FEN. E = estabilização (60 min.) e L = lavagem da preparação com Krebs.



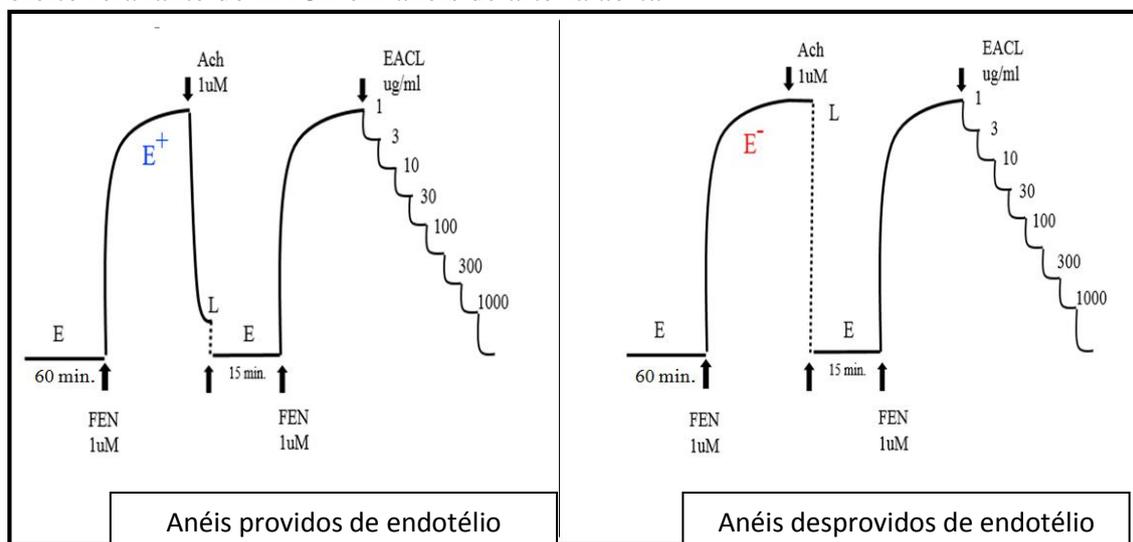
4.2.5.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.2.5.4.1 Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta com e sem endotélio com Fenilefrina

Imediatamente após o período de estabilização (1 hora) das preparações, sendo lavadas a cada 15 minutos, a verificação da presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio funcional nos anéis era feita por meio da adição de ACh sobre o platô da fase tônica

sustentada da contração induzida por de FEN, ficando estabelecido como anéis (E^+) aqueles cujos percentuais de relaxamento induzidos pela ACh fossem iguais ou superiores a 70 % e (E^-), os menores que 5 % de relaxamento. Os tecidos preparados nas cubas eram novamente contraídos FEN e, decorridos cinco a sete minutos de sustentação da fase tônica da contração, concentrações crescentes do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) eram adicionadas nas preparações contendo anéis (E^+) ou nas contendo anéis (E^-). A porcentagem de relaxamento foi determinada através da comparação dos valores da contração da FEN antes e após adição cumulativa do extrato e também pelos valores calculados das CE_{50} . (Figura 9).

Figura 9: Protocolo experimental da avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta



4.2.5.4.2 Avaliação do efeito da inibição da síntese do NO (L-NAME) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta

Na avaliação da participação do óxido nítrico no efeito do EACL, o L-NAME (100 μM), um inibidor competitivo da sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993), era adicionado às cubas contendo anéis de aorta com endotélio intacto ($n= 6 / 2$ animais), e ficava incubado por 30 min. Na sequência foi induzida uma contração pela FEN (1 μM) e na fase tônica foi feita a adição cumulativa do extrato (Figura 8). As respostas induzidas pelo o EACL antes e após a incubação com L-NAME eram estimadas.

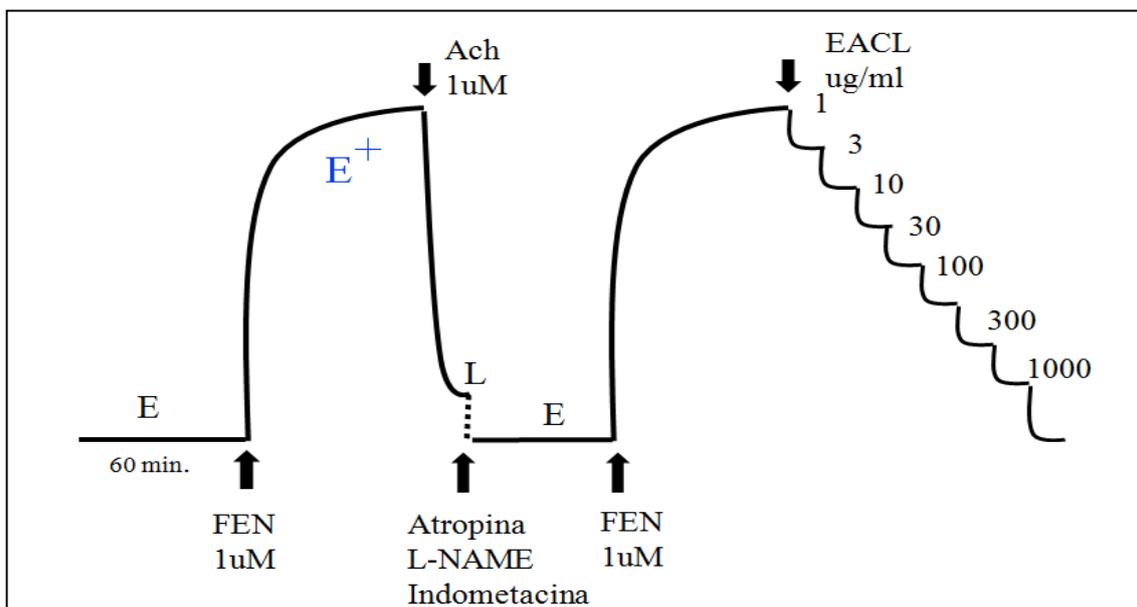
4.2.5.4.3 Avaliação do efeito do bloqueio muscarínico (atropina) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta

Para avaliar a participação dos receptores muscarínicos no efeito do EACL, a atropina ($1\mu\text{M}$), um antagonista muscarínico não seletivo (MITCHELSON, 1984) era adicionada às cubas contendo o grupo ($n= 6 / 2$ animais) de anéis com endotélio intacto, e ficavam incubados por 15 min. na presença da atropina. Após foi adicionada FEN ($1\mu\text{M}$) para induzir uma contração. Na fase tônica foi adicionado o extrato de forma cumulativa (1, 3, 10, 30, 100, 300 e $1000\ \mu\text{g/ml}$) (Figura 10). As respostas induzidas pelo EACL antes e após a incubação com atropina foram estimadas.

4.2.5.4.4 Avaliação do efeito da inibição da COX (indometacina) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL em aorta

Para verificar a influência de alguns metabólitos do ácido araquidônico no efeito do EACL, um inibidor não seletivo COX (CLARK e FUCHS, 1997), a indometacina ($10\ \mu\text{M}$), foi adicionada as cubas com anéis de aorta com endotélio intacto ($n= 6 / 2$ animais) e foi incubada por 30 min. Após uma contração foi induzida pela FEN ($1\mu\text{M}$) e na fase tônica feita a adição cumulativa do EACL (Figura 10). As respostas induzidas pelo EACL antes e após a incubação com indometacina eram estimadas.

Figura 10: Protocolo experimental da avaliação do efeito relaxante do EACL sobre o bloqueio de fatores relaxantes derivados do endotélio funcional em anéis de artéria aorta.



4.2.5.4.5 Avaliação da atividade do EACL sobre contrações induzidas por KCl

Para avaliar a participação de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCC's) e de canais de K^+ , após os procedimentos prévios relativos ao equilíbrio das preparações e verificação do endotélio vascular, em experimentos distintos, foram obtidas contrações induzidas pelo KCl 80 mM ou pelo KCl 20 mM, sobre as quais foram feitas as adições cumulativas do EACL (1, 10, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). As respostas do EACL sobre as contrações promovidas por cada um dos agente foram estimadas. Os valores individuais de CE_{50} foram calculados e comparados estatisticamente.

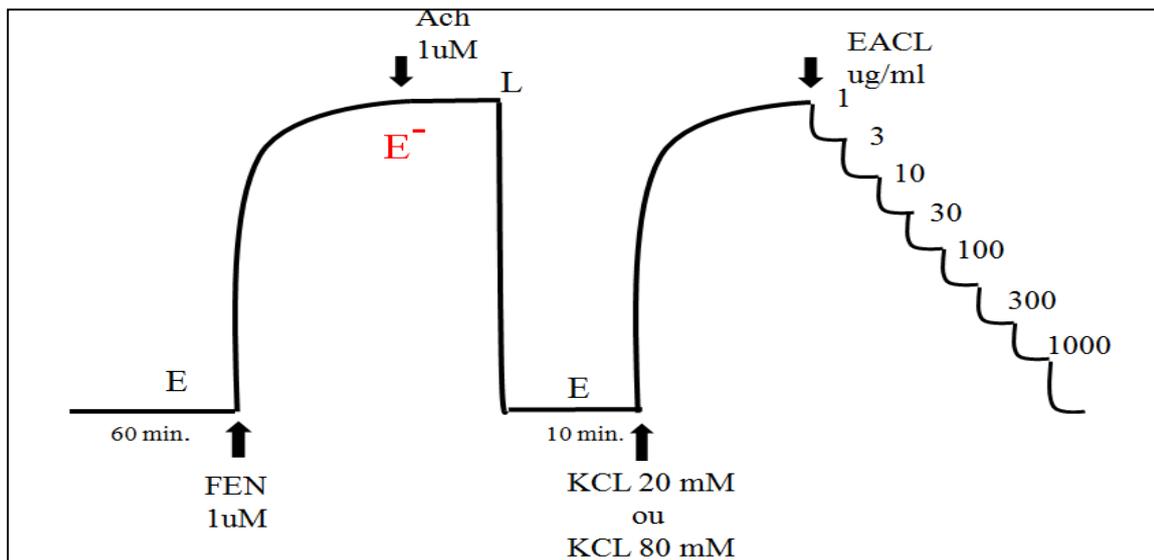
4.2.5.4.5.1 Avaliação do bloqueio parcial do efluxo dos íons K^+ sobre a resposta relaxante induzida pelo EACL em anéis de aorta isolada de rato desprovida de endotélio

Na caracterização da ação do EACL sobre o bloqueio parcial da saída de K^+ em anéis desprovidos de endotélio, o KB era substituído pela solução despolarizante com 20 mM de KCl e mantidas por 30 minutos. Em seguida, uma curva concentração-resposta foi obtida pela adição cumulativa de EACL ao meio (Figura 9). Os resultados eram analisados comparando-se as EC_{50} obtidas nas curvas com preparação de solução despolarizante com 20 mM de KCl e na ausência destas (controle), das diferentes concentrações do EACL.

4.2.5.4.5.2 Avaliação da abertura dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem sobre a resposta relaxante induzida pelo EACL em anéis de aorta isolada de rato desprovida de endotélio

Na verificação da ação do EACL sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis desprovidos de endotélio, o KB era substituído pela solução despolarizante com 80 mM de KCl e mantidas por 30 minutos. Em seguida, uma curva concentração-resposta foi obtida pela adição cumulativa de EACL ao meio (Figura 11). Os resultados eram analisados comparando-se as EC_{50} obtidas nas curvas com preparação de solução despolarizante com 80 mM de KCl e na ausência destas (controle), das diferentes concentrações do EACL.

Figura 11: Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de EACL em anéis desprovidos de endotélio (E^-) e pré-contráídos com KCl 80 mM ou de KCl 20 mM. E = estabilização (60 min.) L = lavagem da preparação com KB.



4.3 Análise Estatística

Para os resultados *in vivo* os resultados também foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM, $n = 6$ por grupo). A significância ($P < 0,05$) dos resultados foi determinada pelo uso de testes T de Student (pareado ou não pareado) e análise de variância a duas vias (tratamento x doses).

Para os experimentos *in vitro* todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM, $n = 6$ por grupo). O valor da EC50 (média geométrica \pm 95% intervalo de confiança), definido como a concentração do extrato requerida para produzir 50% da redução da resposta máxima da contração induzida por K^+ (ou FEN), foi utilizado para avaliar a sensibilidade vascular.

A significância ($P < 0,05$) dos resultados foi determinada pelo uso de testes T de Student (pareado ou não pareado) e análise de variância a uma via (concentrações ou grupos). Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 TOXICIDADE AGUDA

A avaliação da toxicidade aguda demonstrou que EACL não produziu alterações de importância clínica. Nos estudos comportamentais nenhum animal morreu e não apresentaram alterações comportamentais importantes para esta avaliação decorrentes da administração desse extrato.

O grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg não apresentou alterações comportamentais decorrentes do tratamento. Nos dias subsequentes, até o décimo quinto dia, o grupo permaneceu sem alterações comportamentais. Em virtude de não ter ocorrido morte em decorrência da administração do EACL na dose de 2000 mg/kg, foi avaliada a dose de 5000 mg/kg. Nesta dose houve sedação na primeira hora em apenas um animal do grupo, nas horas e dias subsequentes permaneceram sem alterações comportamentais.

5.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.2.1 Efeito do EACL sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados

Os valores basais de PAM e FC nos animais controle antes da administração do EACL foram de 106 ± 7 mmHg e 425 ± 10 bpm, respectivamente. A administração de EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) induziu uma resposta, dose-dependente, caracterizada inicialmente por uma hipotensão (34 ± 3 ; 55 ± 3 ; 54 ± 2 ; 68 ± 4 %, $n=6$) e bradicardia (72 ± 3 ; 73 ± 4 ; 91 ± 5 ; 82 ± 2 %, $n=6$) (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Registro original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) sobre a PAM e FC em rato não-anestesiado.

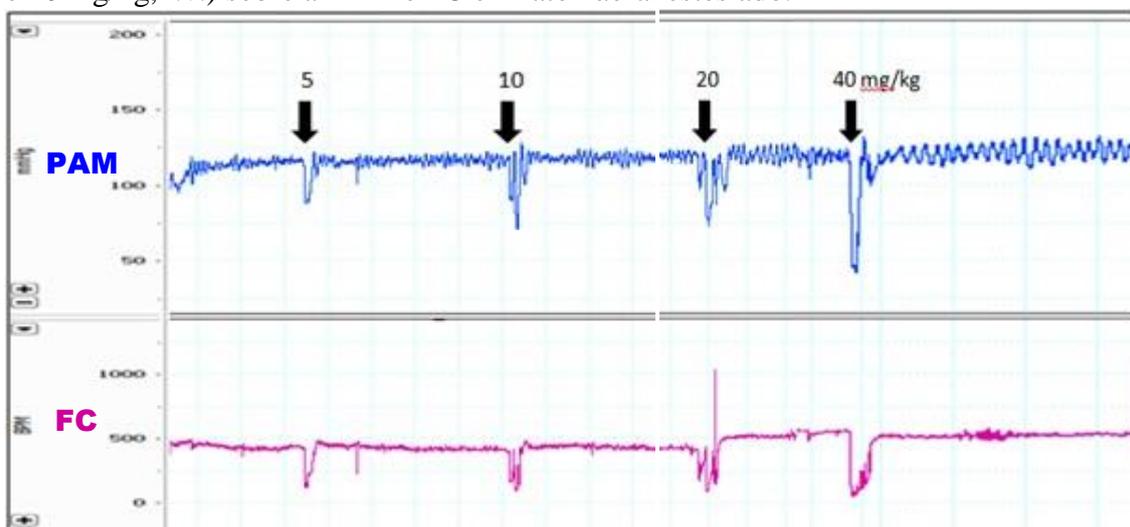
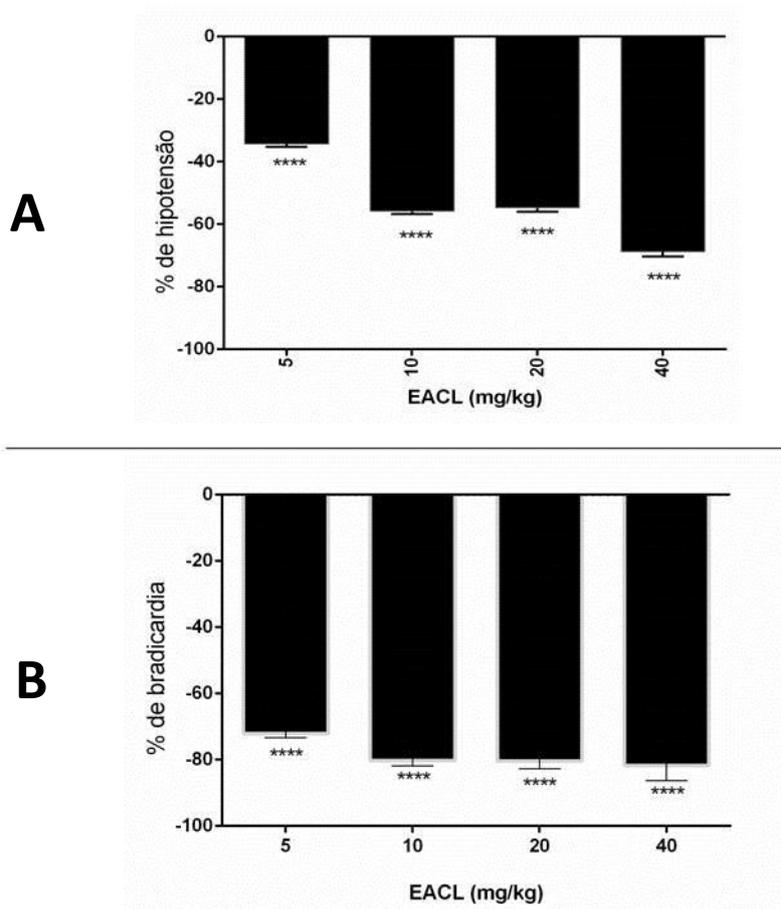


Figura 13: Efeito hipotensor e bradicárdico induzido pela administração aguda de doses crescentes de EACL (5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) em ratos não-anestesiados. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos. $p < 0,0001$ vs controle. (A) percentual de queda de pressão. (B) percentual de queda de batimentos cardíacos.



5.3 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.3.1 Influência do endotélio vascular na atividade do EACL sobre anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contráídos com FEN

Em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto e pré-contráídos com FEN (0,1 μ M), as concentrações crescentes de EACL induziu significativo ($p < 0,01$) efeito relaxante ($CE_{50} = 4,32 \pm 0,05$ μ g/mL). Os efeitos vasorrelaxantes ocorreram de maneira dependente da concentração. A resposta de EACL foi significativamente modificada pela remoção do endotélio vascular dos anéis ($CE_{50} 134,20 \pm 1,80$ μ g/mL) (Figuras 14 e 15).

Figura 14: Traçado original mostrando o efeito de doses crescentes do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis isolados de artéria aorta torácica de rato sem (A) e com (B) endotélio e pré-contraídos com 0,1 μM de FEN.

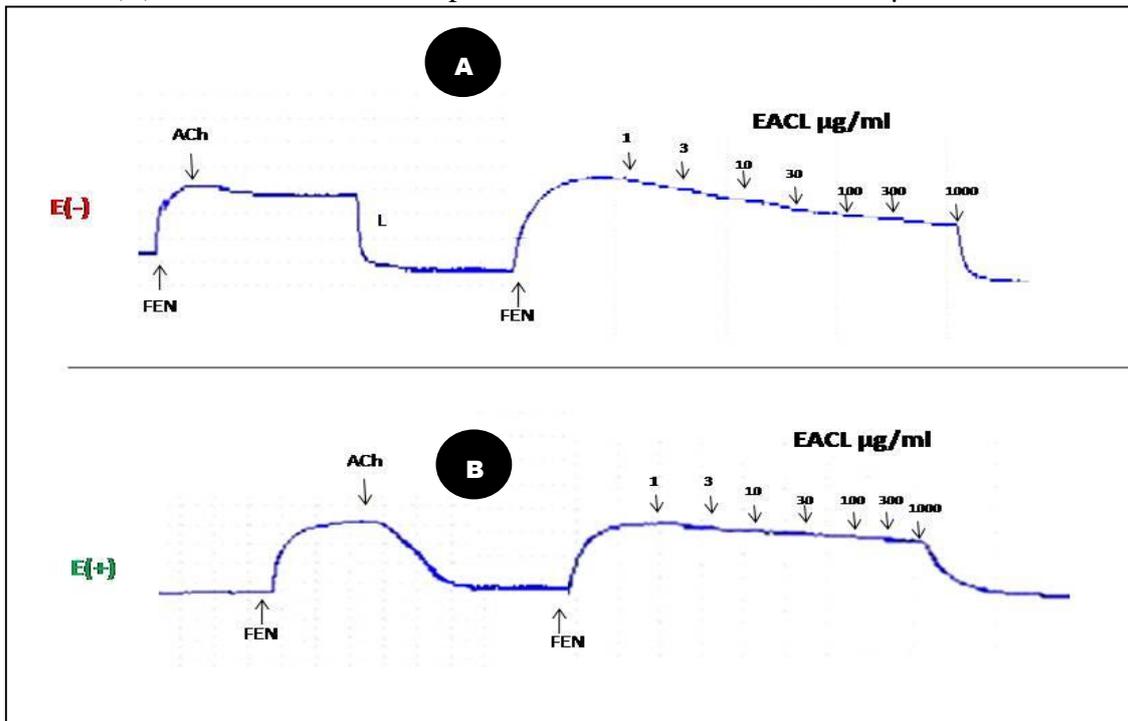
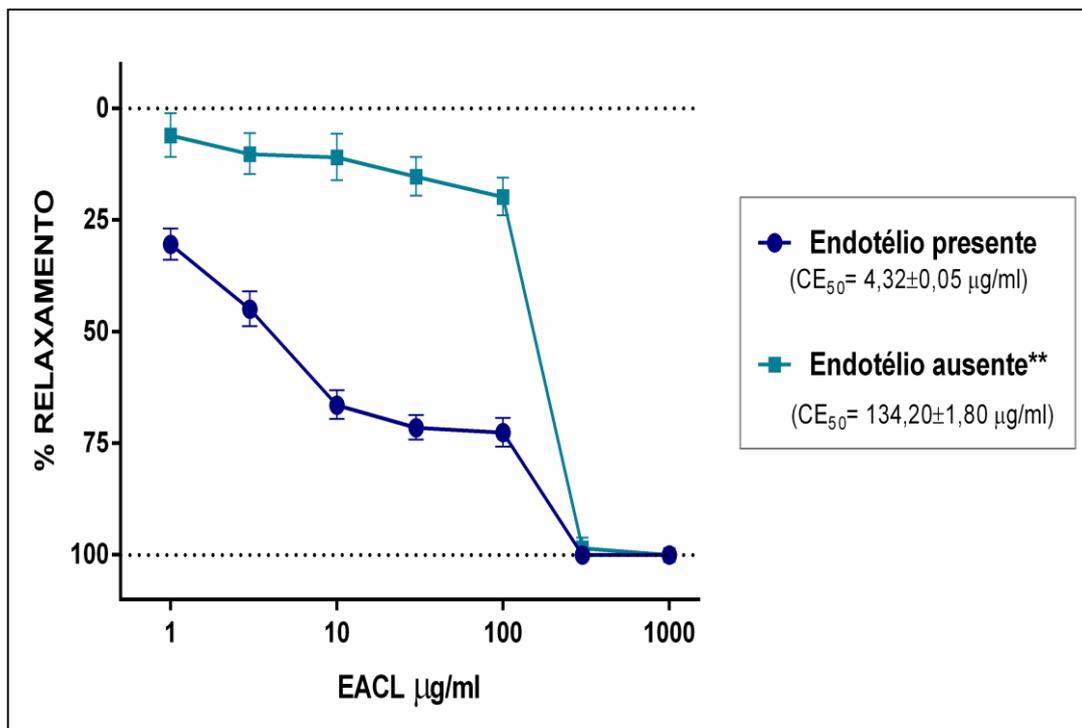


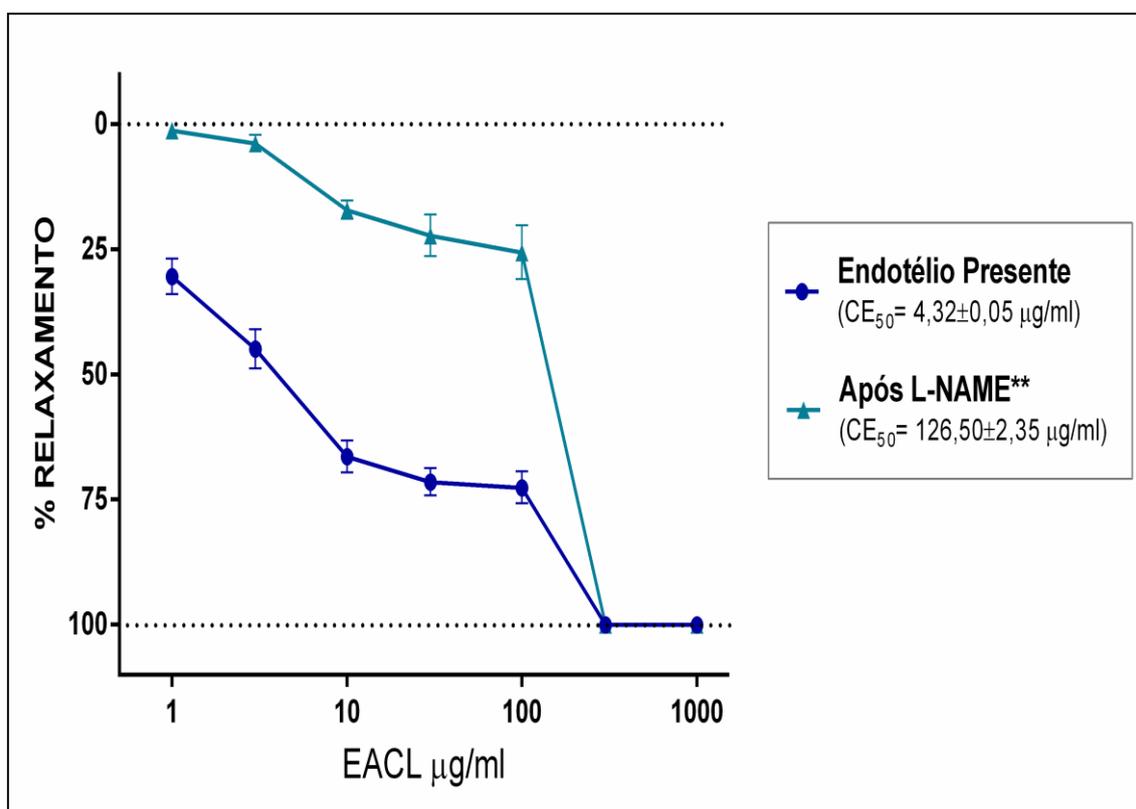
Figura 15: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre contrações induzidas por FEN (0,1 μM) em anéis de aorta isolada de ratos na presença e na ausência de endotélio funcional. ******($p < 0,01$) versus E⁺.



5.3.2 Participação do NO no efeito relaxante em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Após inibição da enzima NO sintase pelo L-NAME, o efeito vasorelaxante de EACL em anéis aórticos intactos foi significativamente ($p > 0,01$) inibido após incubação ($CE_{50} = 126,5 \pm 2,35 \mu\text{g/ml}$). Esse relaxamento foi semelhante ao obtido em anéis sem endotélio vascular (não mostrado) (figura 16).

Figura 16: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ($0,1 \mu\text{M}$), antes (controle E^+) e após a inibição da NO sintase. ******($p < 0,01$) versus E^+ .

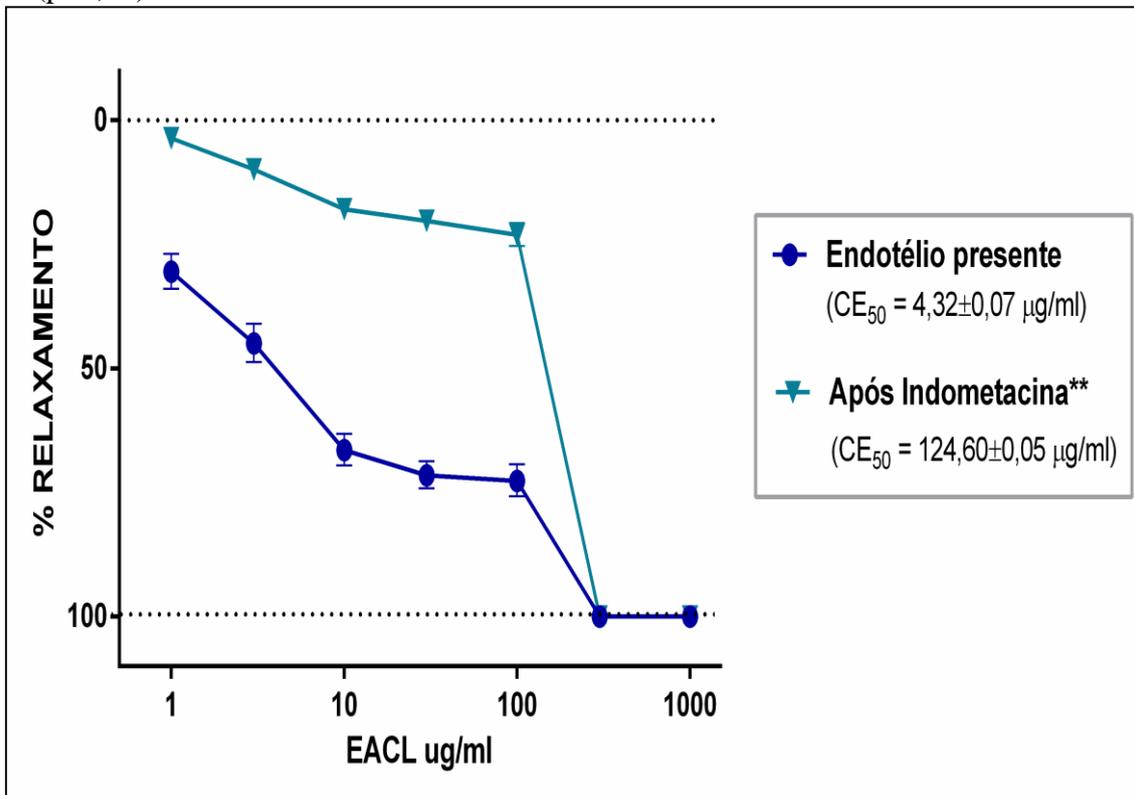


5.3.3 Envolvimento da via de produção de Prostacilinas no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Na presença de indometacina ($10 \mu\text{M}$), um inibidor não-seletivo da COX, a resposta relaxante induzida por EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ($0,1 \mu\text{M}$) foi

significativamente ($p > 0,0001$) inibido após incubação ($EC_{50} 124,60 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$), esse relaxamento foi semelhante ao obtido em anéis sem endotélio vascular (Figura 17).

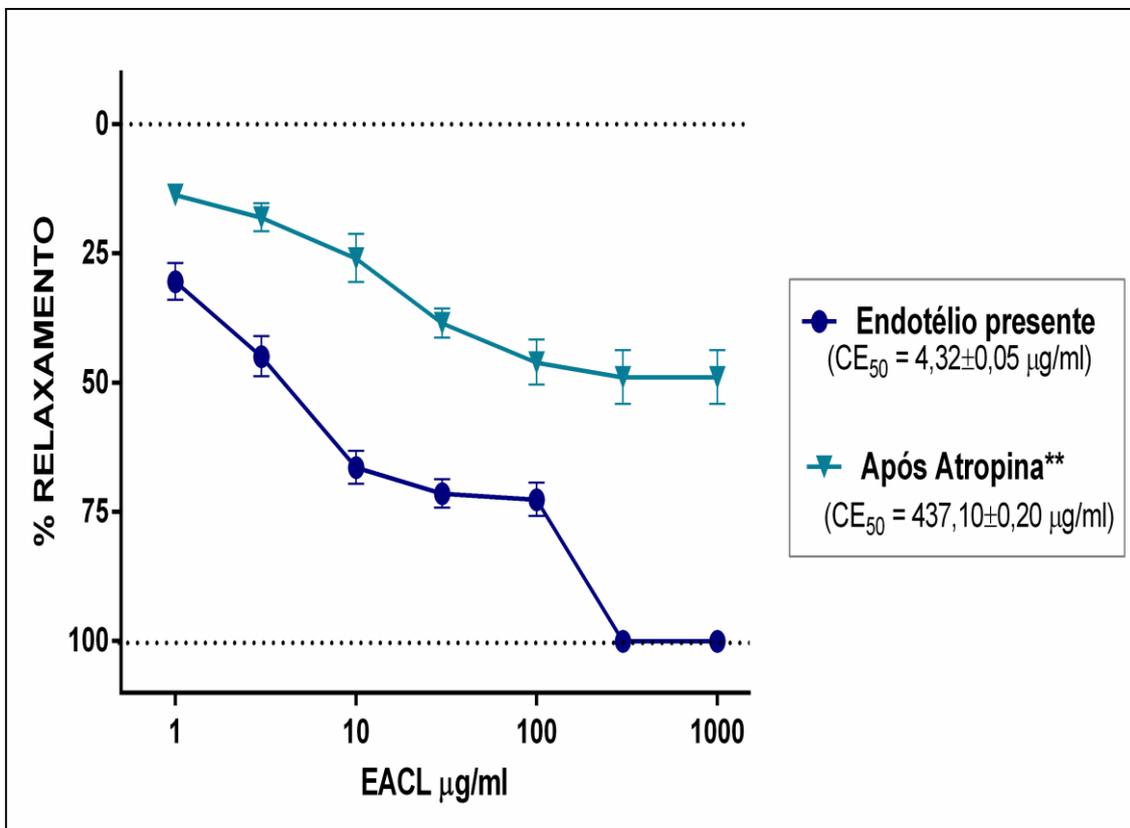
Figura 17: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1 μM), antes (controle E^+) e após a inibição da cicloxigenase (COX-1). **($p < 0,01$) versus E^+ .



5.3.4 Envolvimento da via muscarínica no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Na presença da atropina (1 μM), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos, a resposta relaxante induzida pelo EACL em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraído por FEN foi significativamente atenuada ($CE_{50} = 437,10 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$) (Figura 18). Os valores de CE_{50} foram significativamente ($p > 0,01$) diferentes sobre os anéis com endotélio intacto antes da incubação ($CE_{50} = 4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$).

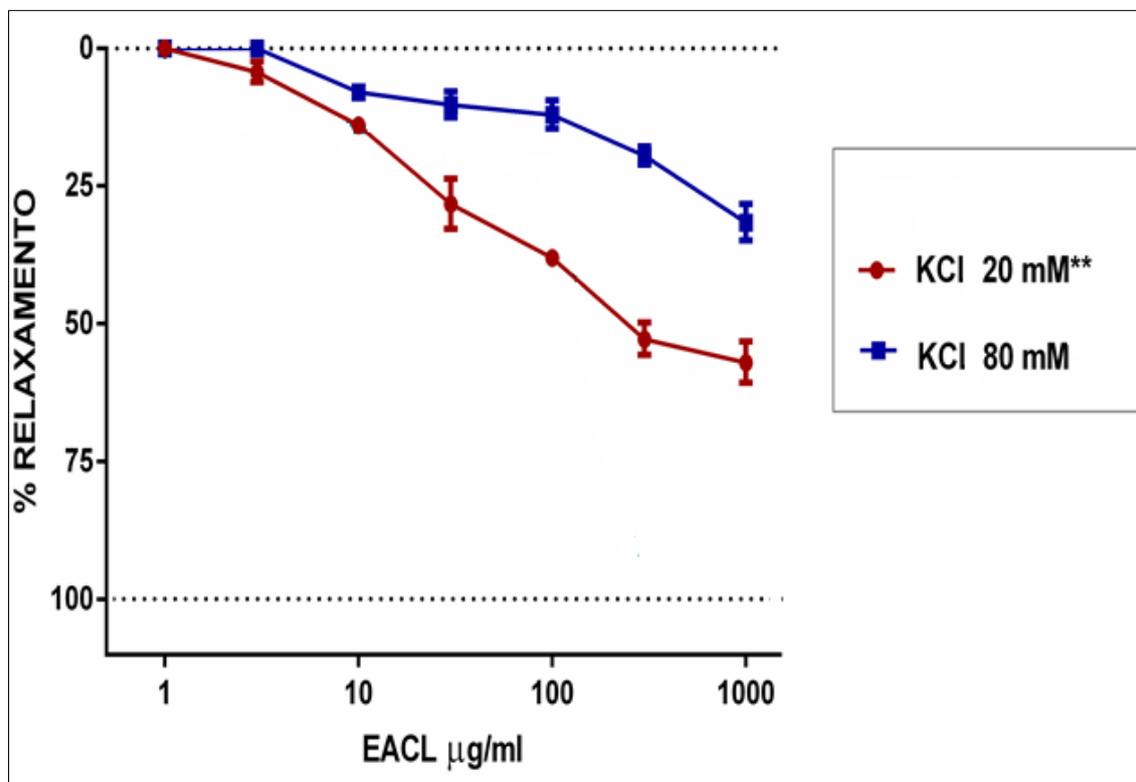
Figura 18: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1 μM), antes (controle E^+) e após a incubação com atropina (1 μM). **($p < 0,01$) versus E^+ .



5.3.5 Efeito do EACL sobre a contração dada pelo represamento ao efluxo do K^+ intracelular

A incubação da preparação por com KCl 20 não alterou significativamente o tônus basal dos anéis (resultados não mostrados). Na presença de KCl 20 a resposta relaxante induzida por EACL em anéis de aorta torácica isolada de ratos desprovida de endotélio foi menor (57% de relaxamento) do que aqueles anéis desprovidos de endotélio antes da incubação ($p > 0,01$). Na presença de KCl 80 a resposta relaxante induzida por EACL em anéis de aorta torácica isolada de ratos desprovida de endotélio foi menor (31,56%) do que aqueles anéis desprovidos de endotélio antes da incubação (100,00% de relaxamento) ($p > 0,01$) e menor ainda em relação aos anéis incubados com KCl 20 (figura19).

Figura 19: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis sem endotélio de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN, KCl 20 e 80. ******($p < 0,01$) versus FEN. **#**($p < 0,01$) versus KCl 20.



6. DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a administração aguda de EACL, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento agudo, nenhum sinal de importância clínica para avaliação da toxicidade foi observado. Neste estudo não foi possível determinar a dose letal 50% (DL50) de EACL devido ausência de morte dos animais durante os 14 dias após administração do extrato. Em comparação com o grupo controle, nenhum grupo apresentou diferença significativa relacionada ao ganho de peso durante todos os dias de tratamento.

Em animais não-anestesiados, a administração aguda de EACL foi caracterizada por hipotensão e bradicardia intensa. Uma das hipóteses para explicar este efeito seria por diminuição da resistência vascular periférica através da ativação direta de receptores muscarínicos do tipo M₂, presentes no coração, uma vez que esses ativados reduzem a frequência e força da contração cardíaca (VENTURA et al., 2010). A estimulação de receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais vasculares, produz hipotensão como consequência de uma intensa vasodilatação (BRUNNING et al., 1994) pelo um aumento na [Ca²⁺]_i, promovendo a formação e liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), principalmente NO (MONCADA et al., 1991). Vários estudos usando antagonistas muscarínicos seletivos demonstram que o subtipo de receptor muscarínico envolvido nestas respostas é o M₃ (ENGLÉN e WHITING, 1985; CHOO et al., 1986; CAULFIELD, 1993; SAWADA et al., 1994; SAWAYER et al., 1999).

Outra hipótese para o mecanismo deste efeito seria o bloqueio dos receptores adrenérgicos cardíacos, mais especificamente do tipo β_1 , bloqueio este que causa redução da frequência cardíaca e da contratilidade, com a consequente redução do débito cardíaco (BORTOLOTTI, 2010).

Para compreender melhor e confirmar a natureza do efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*, utilizamos o modelo experimental *in vitro* de artéria aorta isolada e perfundida de rato (TANAKA et al., 1999).

O endotélio vascular é formado por uma camada de células revestindo e controlando o tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição (CARVALHO, et al., 2001). Em condições fisiológicas existe um controle na liberação desses mediadores, prevalecendo o efeito dos agentes relaxantes (MEDEIROS, 2008 – tese). Esses agentes incluem NO,

fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina e PGE₂; compostos que induzem vasoconstrição – endotelina-1 (ET1), PGH₂, tromboxano A₂ (TX A₂) e ânions superóxido (O⁻²) (BATLOUNI, 2001).

Neste modelo, o EACL induziu relaxamento concentração-dependente em anéis de artéria aorta torácica de rato pré-contraídas com FEN, com valor de CE₅₀ = 4,32 ± 0,05 µg/mL. Resultados semelhante ao encontrado neste estudo é descrito no estudo de Adaramoye, et al., (2009), mostrando um potente efeito relaxante em artéria mesentérica isolada de ratos do extrato metanólico do rizoma de *Curcuma longa*, com consequente efeito relaxante dependente da concentração e independente do endotélio vascular.

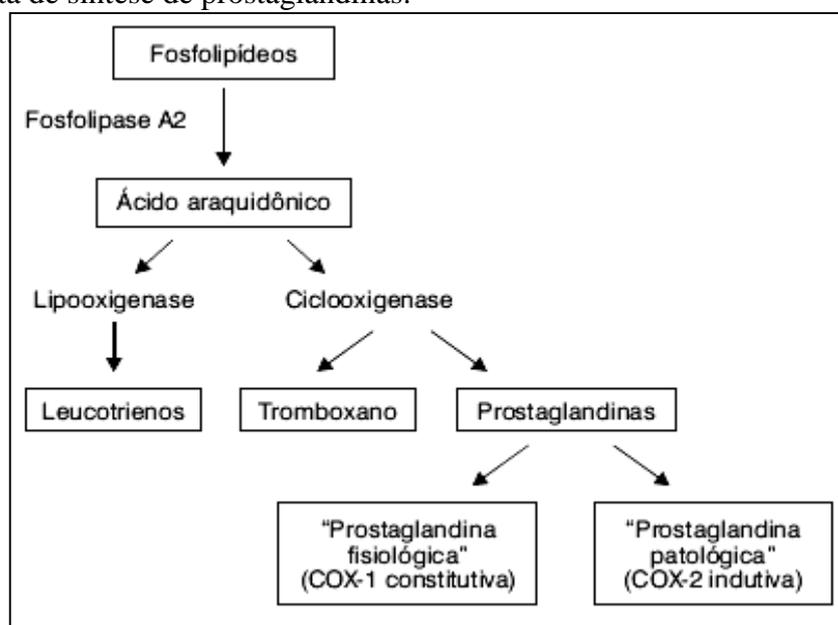
Diante dos achados, partiu-se para investigação mais específica da influência dos fatores endoteliais, no que concerne aos mecanismos de ação envolvidos dentre os diversos agentes relaxantes derivados desse tecido. O NO tem se pronunciado como o principal fator relaxante derivado do endotélio vascular (CARVALHO et al., 2001), sendo este, produzido no endotélio com função vasodilatadora fisiológica (FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Ele atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular promovendo o relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

O efeito de EACL frente à inibição da enzima NO-sintase com o L-NAME, que impede a produção de NO, foi atenuado e (CE₅₀= 126,5 ± 2,35 µg/ml) (Figura 16), assim como nos anéis após a retirada do endotélio na curva concentração-resposta (CE₅₀ 134,20 ± 1,80 µg/mL), sugerindo que EACL age de forma muito dependente do endotélio vascular e pela via do NO, já que o efeito foi diminuído.

Mesmo com o grande envolvimento do NO é possível sugerir pelo relaxamento não ser abolido completamente, que há outras vias de ação do EACL, desta forma, para analisar o envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do EACL, foi realizado um antagonismo utilizando a atropina (1µM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (JAISWAL et al., 1991). Nesta preparação a resposta relaxante induzida pelo EACL em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraído por FEN (0,1 µM) foi significativamente reduzida a ponto de não haver relaxamento nem nas últimas concentrações (EC₅₀ 124,60 ± 0,05 µg/ml), sugerindo assim que a ação dos receptores muscarínicos está extremamente envolvida na expressão deste efeito.

É muito bem descrito na literatura que os eicosanóides, principalmente as prostaciclina (PGI₂), são potentes vasodilatadores tanto dependentes quanto independentes de endotélio (SHULZ e TRIGGLE, 1994) e participam ativamente no controle local do tônus vascular. A participação dos produtos da ciclooxigenase, enzima responsável pela síntese das prostaglandinas, também foi avaliada utilizando a indometacina. A resposta relaxante induzida por EACL foi significativamente inibido após incubação (CE₅₀= 331,70 ± 0,02 µg/ml), sugerindo então que o efeito de EACL também está relacionado pela via das prostaciclina (figura 20).

Figura 20: Cascata de síntese de prostaglandinas.



Fonte: ILÁRIO, 2006.

A prostaciclina ou prostaglandina I₂ é sintetizada pelas células endoteliais a partir do ácido araquidônico, sendo uma vez liberada, essa substância produz vasodilatação local, constituindo assim, o inibidor natural mais potente da adesão e agregação plaquetária (CARDOSO, et al., 2012). Sugere-se então, que os produtos formados a partir da via da ciclooxigenase participam de algum modo no efeito de EACL em músculo liso vascular.

Neste protocolo, observamos que a indometacina inibiu significativamente a resposta vasorelaxante induzida por EACL, sugerindo que esta via está implicada na expressão deste efeito. Estes resultados em conjunto, indicam que a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, principalmente receptores muscarínicos, além de NO e prostaglandinas, tem um papel importante na resposta vasorelaxante de EACL.

Também em anéis desprovidos de endotélio o EACL embora menos expressivo, continuou apresentando atividade relaxante significativa, então para verificar possível envolvimento de canais iônicos no efeito de EACL foram realizados experimentos onde os anéis foram contraídos com KCl 20 mM e KCl 80 mM.

A atividade dos canais de potássio consiste em um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares, sendo um determinante importante do tônus vascular (FARACI et al., 1998) A abertura de um canal de potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular causando hiperpolarização da membrana celular (SOBEY, 2001). Esta condição em que a célula se encontra, bloqueia canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e conseqüente diminuição da entrada de íons Ca^{2+} para o meio intracelular, causando o relaxamento vascular (FARACI et al., 1998). De forma contrária, o fechamento de um canal de potássio causa um estado de despolarização, abertura de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, aumento de Ca^{2+} intracelular e vasoconstrição.

Esse mecanismo de relaxamento e contração do músculo liso difere quanto ao mecanismo de ação da fenilefrina, que estimula diretamente os receptores α -adrenérgicos da proteína G (SILVEIRA, 2014), agindo via fosfolipase C, aumentando os níveis de IP_3 e ocasionando liberação do Ca^{2+} intracelular provocando a contração muscular (CANDIDO, 2015).

A resposta relaxante induzida por EACL em anéis pré-contraídos com FEN sendo maior que o relaxamento causado por EACL frente à contração com KCl 20 mM sendo menor (57,00%) que a contração provocada pela FEN (100%), e ainda o relaxamento provocado frente a contração com KCl 80 mM sendo menor ainda em relação a esses mesmos anéis contraídos com FEN, sugere que parte do efeito relaxante de EACL está relacionada à influência que o extrato parece ter na abertura de canais iônicos e principalmente sobre canais de K^+ , uma vez que a hiperpolarização da membrana das células do músculo liso pode ser produzida por agentes que abrem os canais de K^+ , levando ao efluxo de K^+ da célula (GURNEY, 1994; CUNHA, 2004).

A contração induzida por K^+ em aorta parece ser inteiramente dependente do influxo de Ca^{2+} através de VOCC's, sendo sua contração inibida pela remoção do Ca^{2+} do meio externo e pelos bloqueadores destes canais (KARAKI & WEISS, 1988; CUNHA, 2004). Ao mesmo tempo em que abertura de canais de Ca^{2+} pode ser requerida por um processo de despolarização de membrana, os agentes que produzem

hiperpolarização de membrana podem causar o fechamento dos canais de Ca^{2+} , reduzindo o influxo de Ca^{2+} , promovendo o relaxamento do músculo liso (BADMINTON, et al., 1996). Neste sentido, sugere-se que EACL não apresentou uma ação como bloqueador de VOCC's, por não inibir de maneira concentração-dependente as respostas contráteis induzidas por elevado K^+ .

O efeito do EACL parece ser significativamente devido as suas atividades ligadas a fatores relaxantes derivadas do endotélio vascular com discreta influência sobre o bloqueio de VOCC's e abertura de canais de K^+ ainda mais expressivo.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vivo* e *in vitro*, demonstrou que:

- a) EACL diminui significativamente a pressão arterial com concomitante diminuição da frequência cardíaca em ratos não anestesiados.
- b) Na avaliação dos efeitos vasculares *in vitro* foi verificado que EACL induz relaxamento significativo em anéis de artéria aorta torácica de rato normotenso, tanto na presença como na ausência do endotélio vascular, sendo mais expressivo em anéis com endotélio.
- c) O vasorelaxamento induzido por EACL parece envolver fatores relaxantes derivados do endotélio, como a via de produção das prostaciclina, receptores muscarínicos e principalmente a via de produção de NO.
- d) O efeito de EACL parece ter significativo envolvimento de canais iônicos, parecendo agir com maior magnitude na abertura de canais de K^+ do que bloqueio de canais de Ca^{2+} operados por voltagem, mesmo este efeito sendo significativo em ambos.
- e) EACL não apresentou indícios de toxicidade nas concentrações administradas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARAMOYE, O.A. et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 457-462, 2009.

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 455-463, 2008.

AUGUSTYNIAK, G.B. et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. **Free Radical Research**, v. 44 p. 1216-1262, 2010.

BADMINTON, M.N.; CAMPBELL, A.K.; REMBOLD, C.M. Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺ in HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 49, p. 31210-31214, 1996.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 2004.

BORTOLOTTO, L.A; CONSOLIM, F.M.C. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 215-220, 2009.

BRUM, V.S. et al. Uso de plantas medicinais por hipertensos assistidos em uma unidade básica de saúde de uruguaiana. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 3, 2017.

CABRAL, Pedro Henrique Bezerra. **Efeitos cardiovasculares do composto [RU (BPY) 2 (Tioureia)(NO)](FOR 0812) em ratos normotensos e hipertensos**. 2016. 38 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia) Universidade Federal do Ceará. 2016.

CANDIDO, Zambroti Cândido. **Caracterização farmacológica do agonista beta-3 adrenérgico, mirabegron em corpo cavernoso de rato e próstata de coelho e humano**. 2015. 50 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas. 2015.

CARDOSO, F.A. et al. Endotélio vascular: Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas**, v. 3, n. 3, 2012.

CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p. 417-423, 2002.

CLARK, S.G.; FUCHS, L.C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

CUNHA, Renildo Moura. **Efeitos do óleo essencial de *Ocotea duckei vattimo* (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos**. 2004. 54 f. Tese (Doutorado em produtos naturais) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2004.

DE GUSMÃO, J.L. et al. Adesão ao tratamento em hipertensão arterial sistólica isolada. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 1, p. 38-43, 2009.

DE GUSMÃO, J; GIANE, G.F; SILVA, GV; ORTEGA, K.C; JUNIOR, D.M. Adesão ao tratamento em hipertensão arterial sistólica isolada. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 1, p. 38-43, 2009.

DE SOUZA, C.D; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

DE SOUZA, E.B. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. **Cadernos UniFOA**, v. 5, n. 13, p. 49-53, 2017.

DOMINGUES, X.A. Métodos de Investigação Fitoquímica. **Editorial Limusa**, 1ed. 1973.

FARACI, F.M, HEISTAD, D.D. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. **Physiological Reviews**, v.78, p.53–97, 1998.

Farmacopeia Brasileira. 2.ed. São Paulo: **Indústria Gráfica Siqueira**, 1959.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FOSTER, A.S. Practical plant anatomy. **Princeton: D van Nostrand Company Inc.** 1949.

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

GONÇALVES, Eduardo Andrade. **Efeitos do extrato hidroalcolico de *Calycophyllum spruceanum* (benth.) hook. f. ex k. schum sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos.** 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia)- Universidade Federal do Acre.

GONZÁLEZ, R.A.; VISTEL, V.M. Caracterización fitoquímica de la Curcuma longa L. **Revista Cubana de Química**, v. 27, n. 1, p. 9-18, 2015.

GOVINDARAJAN, V.S.; STAHL, W.H. Turmeric - chemistry, technology, and quality. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 199-301, 1980.

GUIMARÃES, R.M. et al. Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 37, n. 2, 2015.

GURNEY, A.M.: Mechanisms of drugs-induced vasodilatation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 46: 242-251, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, John E. Tratado de fisiologia médica. **Elsevier Brasil**, 2006.

HILARIO, Maria Odete Esteves; TERRERI, Maria Teresa; LEN, Cláudio Arnaldo. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **J. Pediatr. (Rio J.) Porto Alegre**, v. 82, n. 5, supl. p. S206-S212, nov. 2006.

JAISWAL, N. et al. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 258, n. 3, p. 842-850, 1991.

JARDIM, P.C.B.V. et al. Hipertensão arterial e alguns fatores de risco em uma capital brasileira. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v.88, n.4, p.452-7, 2007.
JUNIOR, V.F.V; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

KARAKI, H.; WEISS, G.B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sciences**, v. 42: p. 111-122, 1988.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. Plantas Alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014.

LAHLOU, S. et al. Rostrocaudal localization of cardiovascular responses induced by intrathecal administration of apomorphine in conscious, freely moving rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 331-337, 1990.

LOMBARDO, E.G. et al. Extracts and fractions from edible roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with antihypertensive activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LONGO, M.A; MARTELLI, A.; ZIMMERMANN, A. Hipertensão Arterial Sistêmica: aspectos clínicos e análise farmacológica no tratamento dos pacientes de um setor de Psicogeriatria do Instituto Bairral de Psiquiatria, no Município de Itapira, SP. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 2, p. 271-284, 2011.

LOPES, G.A.D et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão**, v.6, n.2, p.143, 2010.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD. R.C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v.25, p.23-53, 1962.

MENON, V.P.; SUDHEER, A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. p. 105-125, 2007.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacologic studies With antagonists.T.I.P.S., 5. **Symposium Supplement**p.12-16, 1984.

MONCADA, S; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MOURA, I.H.D. et al. Prevalência de hipertensão arterial e seus fatores de risco em adolescentes. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.28 n.1, p. 81-6, 2015.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity—Fixed Dose Procedure. **Organisation for Economic Cooperation and Development**, 2001.

PASTORE, A.P. et al. Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2010.

PRIYA, R.; PRATHAPAN, A.; RAGHU, K. G.; NIRMALA-MENON, A. Chemical composition and in vitro antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Kuala Lumpur**, v. S695, n. 1, p. S695-S699, 2012.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Eckert Fisiologia Animal. forth. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S.A., 2000.

RIQUE, A.B.R.; SOARES, E. D. A., MEIRELLES, C. D. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 244-54, 2002.

RODRIGUES, Karilane Maria Silvino. **Ação so Linalol sobre o sistema Cardiovascular de ratos normotensos**. 2010. 19 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológica) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2011.

SIEGEL, R. D.; CUPPLES, A., SAHEFER, E.J.; WILSON, P.W.F. Lipoproteínas, apolipoproteínas e tamanho de lipoproteínas de baixa densidade entre os diabéticos no estudo da prole de Framingham. **Metabolismo**, v. 45, n. 10, p. 1267-1272, 1996.

SILVA FILHO, C.R.M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009.

SOBEY, C.G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C. Sistema colinérgico; revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo Colinergic system&58; revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. *Rhizoma curcumae longae*. **Who monographs on selected medicinal plants**, v. 1, p. 115-124, 1999.

ZAMARIOLI, C.M. et al. Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 53-60, 2015.

ZHOU, C.S.; BEEVERS, S.H. The targets of curcumin *Curr. Drug Targets*, n.12 p. 332-347, 2011.

9. ANEXOS

ANEXO I: *Curcuma longa* abole contrações induzidas por fenilefrina em artéria aorta isolada de ratos

ARTIGO SUBMETIDO

***Curcuma longa* abole contrações induzidas por fenilefrina em artéria aorta isolada de ratos**

Resumo

Fundamentos: *Curcuma longa* possui efeitos biológicos. Suas atividades cardiovasculares ainda não foram estudadas.

Objetivos: Investigar os efeitos vasorrelaxantes do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL).

Métodos: Anéis de aorta torácica isolada de ratos normotensos, com ou sem endotélio, medindo 4 mm, eram montados em cubas, fixados a um transdutor, imersos em solução Krebs a 37 °C, aeradas por mistura carbogênica e estabilizados por 1 h, sob tensão de 1 grama, em um sistema de registro de dados. Sobre uma contração por Fenilefrina, era feita a incubação do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) antes e após a incubação de atropina ou de L-name ou de indometacina. Do mesmo modo, testaram-se concentrações do EACL sobre contrações por elevação de K⁺ extracelular.

Resultados: EACL induziu vasorelaxamento significativo ($p < 0,01$). O efeito foi significativamente dependente do endotélio vascular ($CE_{50} = 4,32 \pm 0,05$ µg/mL). Após inibição da via de produção do NO a CE_{50} foi para $126,50 \pm 2,35$ µg/ml, após inibição da produção prostaciclina, para $124,6 \pm 0,05$ µg/ml e após o bloqueio muscarínico para $437,10 \pm 0,2$ µg/mL. A abertura de canais de K⁺ (relaxamento de 56,98%) e bloqueio a VOCC's (relaxamento de 31,56%), foram significativamente evidentes.

Conclusão: EACL induziu vasorelaxamento significativo, sendo mais expressivo na presença de endotélio. A via muscarínica parece ser a principal envolvida nesse efeito, seguida pela *via* da produção de NO e das Prostaciclina. A abertura de canais de K⁺ pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio a VOCC's.

Introdução

Segundo a Organização mundial de saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de saúde (OPAS) as cardiopatias constituem uma das maiores causas de morte no mundo¹ e em países de baixa e média renda mais de três quartos das mortes são por doenças cardiovasculares^{1,2}.

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, atingindo mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo^{3,4,5}. A utilização de medicamentos alopáticos tem sido a principal forma terapêutica de combate a hipertensão arterial e conseqüentemente à todos os outros agravos dela decorrentes, mesmo sabendo que um dos maiores problemas dessa opção de tratamento são os efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos⁵.

Recentemente, mais atenção tem sido dada ao uso de plantas medicinais na atenuação dos danos de diversas doenças, inclusive à hipertensão arterial^{6,7}. *Curcuma longa* Linnaeus da família Zingiberaceae de origem Malaio-Indígena⁸, popularmente conhecida como Gengibre Amarelo ou Açafrão, seu rizoma é largamente utilizado como corante na culinária de muitos países, suas folhas são usadas para embrulhar peixe e conferir aroma e sabor tanto no cozimento como no assado⁹. Possui propriedades cardioprotetora¹⁰, antiinflamatória^{11,12}, antimicrobiana¹³, antiproliferativa¹³, antioxidante¹⁴, antifúngica¹⁵ e vasorelaxante¹⁶. Apesar de sua ampla utilização, poucas informações estão disponíveis sobre seus efeitos e mecanismo de sua atividade no sistema cardiovascular. O presente estudo tem por objetivo a investigação de atividades do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL) sobre contrações induzidas por FEN em artéria aorta torácica isolada de ratos normotensos.

Métodos

Preparação do extrato de *Curcuma longa* L.

A planta foi coletada em uma propriedade particular localizada em Vila Campinas, Ramal das chácaras, no município de Plácido de Castro, no estado do Acre. Um espécime de voucher foi depositado no herbário da Universidade Federal do Acre (UFAC), com número 20002. As folhas com aparência saudável foram selecionadas, lavadas com água corrente e colocadas em estufa à temperatura de 40 ° C por 48 horas, onde ocorreu a desidratação e em seguida trituradas em moinho tipo faca na Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) da Universidade Federal do Acre. Para a obtenção do extrato aquoso de *Curcuma Longa* (EACL), 4 litros de água destilada com 370 gramas do triturado foram colocados em balão de fundo redondo com capacidade de 5 litros, sendo aquecido durante 10 minutos a temperatura de 100 °C, seguido de filtração. O filtrado foi liofilizado, armazenado em frasco de vidro âmbar e conservado sob refrigeração a 4 °C.

Drogas

Foram utilizadas Cloridrato de fenilefrina (FEN), Sulfato de atropina, Cloreto de acetilcolina (ACh), N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) e Indometacina, todos da SIGMA-ALDRICH. As soluções estoques de indometacina foram dissolvidas juntamente com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5 N em água destilada. As demais drogas, inclusive o EACL e soluções foram diluídas em água destilada. O meio de perfusão que foi usado foi a solução nutritiva de Krebs Henseleit, contendo em mM: NaCl (118,4); KCl (4,75); KH₂PO₄ (1,18); NaHCO₃ (25); MgSO₄ (1,18); CaCl₂ (1,9) e glicose (5). A solução nutritiva teve pH ajustado entre 7,3 e 7,4 através de HCl 1M ou NaOH 1M. As concentrações do EACL usadas cumulativamente em todos os experimentos foram invariavelmente 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml, para um “n” sempre igual a 6. Em todos os protocolos experimentais as concentrações utilizadas de FEN e ACh foram de 0,1µM.

Ensaio da Toxicidade

Para verificar possíveis efeitos tóxicos do EACL foi utilizado parâmetro do Teste da Dose Fixa (TDF), de acordo com a Acute Toxic Class Method 2001 (OECD)¹⁷. Nesse teste, camundongos foram deixados em jejum 12 horas antes do experimento e foram divididos em 3 grupos (n=6) ditos como grupo 1 (controle), 2 (dose de 2000 mg/kg) e 3 (dose de 5000 mg/kg). No grupo 1 foi administrada somente solução salina e no grupo 2 a dose de 2000 mg/kg. Na ausência de letalidade ou toxicidade era então administrada a dose de 5000 mg/kg no grupo 3. A toxicidade avaliada mediante observação dos parâmetros comportamentais descritos no teste hipocrático de Malone e Robichaud (1962)¹⁸: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, piloereção, ptose, frequência respiratória, cianose, estereotipia, contorção, agressividade, ataxia, postura, sudorese, micção, diarreia e convulsão.

Os parâmetros foram observados a cada 60 minutos durante 3 horas depois da administração do extrato. Posteriormente, foram também observados em 24, 48, 72 horas e no 15º dia. Ao final das observações todos os animais foram eutanasiados de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA. No ato do sacrifício foram utilizados barbitúricos e anestésicos tradicionais, de efeito rápido, suave e com mínimo desconforto para os animais, fármacos estes que são potentes

depressores do Sistema Nervoso Central, cujos efeitos são amplamente conhecidos e previsíveis.

Preparação e montagem do anel vascular

Ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, pesando de 200 a 300g eram eutanasiados por deslocamento cervical e então realizada a incisão ventral com abertura da caixa torácica por excisão do esterno e de parte das costelas, para visualização e retirada dos órgãos intratorácicos. A aorta torácica era retirada e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs para limpeza por remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo aderido ao segmento da artéria. O segmento da artéria era fracionado em anéis de 4 mm e montado entre 2 hastes metálicas triangulares, um dos lados da haste era introduzido na luz do anel, sendo o vértice oposto ao anel, por um fio de algodão, fixado a um transdutor de força isométrica (AdInstruments) onde recebia uma tensão inicial de 1g.

A montagem contendo os anéis de aorta era imersa em solução nutritiva de Krebs em cubas individuais mantidas a 37 °C e aerados continuamente por carbogênio (mistura de 95% de O₂ + 5% de CO₂), com substituição da solução a cada 15 minutos para minimização de metabólitos. Os dados das variações da tensão, em função da reatividade do tecido à administração das drogas eram obtidos após conversão dos sinais elétricos captados pelo transdutor em sinais digitais e transmitidos, por um amplificador-registrador (AdInstruments), para um computador.

As preparações de aorta de todos os experimentos eram preliminarmente estabilizadas durante 1 hora na solução de Krebs e constantemente submetidas a uma tensão passiva de 1 g. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAC (Universidade Federal do Acre) com o número 23107.018498/2016-40. Os registros das variações do grau de contração da musculatura lisa eram mandados para um microcomputador, nele processados e armazenados no software Protowin organ baths (Pan Lab) para posterior tratamento analítico e estatístico.

Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta com e sem endotélio contraídos com Fenilefrina

Imediatamente após o período de estabilização (1hora) das preparações, a verificação da presença (E⁺) ou ausência (E⁻) de endotélio funcional nos anéis era feita por meio da adição de ACh sobre o platô da fase tônica sustentada da contração induzida por de FEN, ficando estabelecido como anéis (E⁺) aqueles cujos percentuais de relaxamento induzidos pela ACh fossem iguais ou superiores a 70 % e (E⁻), os menores que 5 % de relaxamento. Os tecidos preparados nas cubas eram novamente contraídos FEN e, decorridos cinco a sete minutos de sustentação da fase tônica da contração, concentrações crescentes do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) eram adicionadas nas preparações contendo anéis (E⁺) ou nas contendo anéis (E⁻). A porcentagem de relaxamento foi determinada através da comparação dos valores da contração da FEN antes e após adição cumulativa do extrato e também pelos valores calculados das CE₅₀.

Avaliação do efeito de EACL após inibição das enzimas da via da produção do óxido nítrico (NO), da via de produção das Prostaciclina (PGE₂ e PGI₂) e do boqueio muscarínico endotelial

Em preparações contendo anéis (E⁺), era feita a administração cumulativa do EACL sobre o platô da contração induzida pela FEN, antes e depois do L-NAME (100 µM) incubado durante 30 minutos, para avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito do EACL. Para avaliar o envolvimento das prostaciclina, do mesmo modo, a indometacina (10 µM), ao invés do L-NAME, era incubada também por 30 minutos. Para verificar a também possível participação dos receptores muscarínico, seguindo o mesmo protocolo experimental, era previamente feita a incubação de atropina (1 µM) por 15 minutos ao invés dos dois inibidores de enzimas.

Avaliação da atividade do EACL em anéis de aorta contraídos com KCl

Para avaliar o envolvimento de canais iônicos foram realizados experimentos utilizando-se anéis (E⁻). Nessas abordagens, após estabilização das preparações e outros procedimentos preliminares obrigatórios, ao invés da contração por FEN, eram produzidas contrações induzidas por elevação da concentração de K⁺ no banho – meio extracelular ([K⁺]_e), operação realizada com solução KCl 20 mM ou KCl 80 mM, em montagens individuais distintas e, no platô delas, feita a administração cumulativa de concentrações crescentes do EACL.

Análise estatística

Todos os pontos plotados nos gráficos estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um n=6 para cada concentração de um mesmo grupo da mesma natureza. Os valores de CE₅₀ das curvas concentração-resposta individuais foram calculados pelos valores médios para cada concentração utilizada, dentro de um mesmo tipo de abordagem, a partir de regressão não-linear, e então, feitas as comparações estatísticas. As diferenças estatísticas entre as médias dos resultados foram determinadas pelo teste t de Student pareado e, quando apropriado (para comparações múltiplas), pela análise de variância (ANOVA). As análises e representações foram feitas no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo significativo quando p < 0,05.

Resultados

Toxicidade

Nos estudos de toxicidade nenhum animal morreu ou apresentou alterações comportamentais deletérias capazes de comprometer os limites da normalidade (dados não mostrados). O grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg, mesmo até o décimo quinto dia de observação, permaneceu sem qualquer alteração devida ao tratamento. Na dose de 5000 mg/kg houve leve sedação na primeira hora após administração do extrato em apenas um animal do grupo. Nas horas e dias subsequentes nenhum animal apresentou qualquer alteração comportamental ou morreu. Assim é que EACL não apresentou alterações de importância clínica nos animais submetidos aos tratamentos.

Influência do endotélio vascular na atividade do EACL sobre anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Em anéis (E^+) EACL aboliu as contrações induzidas com FEN. A administração de concentrações crescentes do EACL induziram significativo ($p < 0,01$) efeito relaxante ($CE_{50} = 4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$). O vasorelaxamento ocorreu de modo dependente da concentração. A resposta de EACL foi significativamente ($p < 0,01$) modificada pela remoção do endotélio vascular ($EC_{50} = 134,20 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$), indicando que o efeito do EACL é muito dependente de fatores derivados do endotélio vascular (Figura 1).

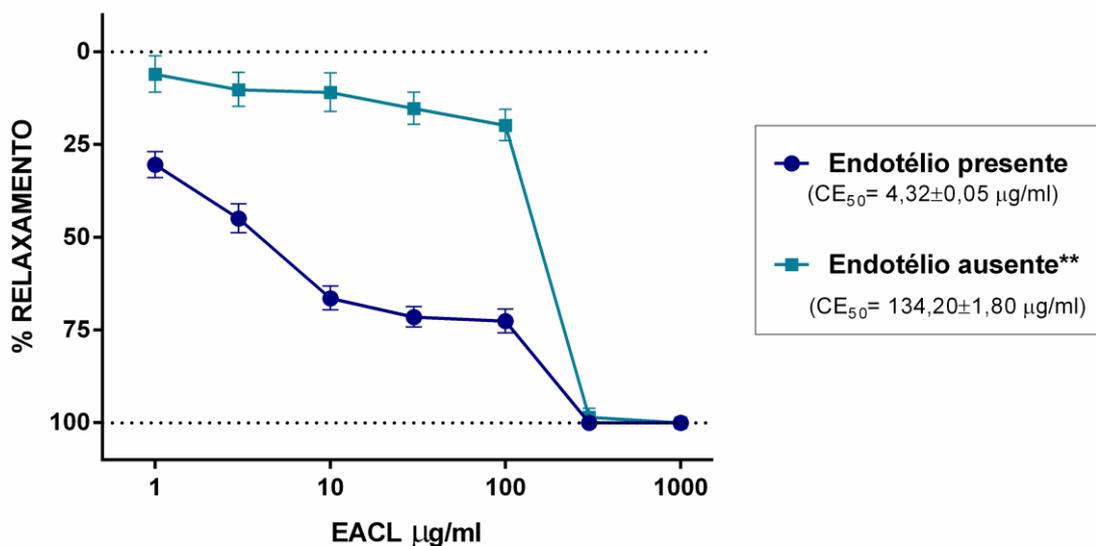


Figura 1: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre contrações induzidas por FEN (0,1 μM) em anéis de aorta isolada de ratos na presença e na ausência de endotélio funcional. ** ($p < 0,01$) *versus* (E^+).

Participação do NO no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Após inibição da enzima NO sintase pelo L-NAME, o efeito vasorelaxante de EACL em anéis aórticos intactos foi significativamente ($p < 0,01$) inibido, evento comprovado pela elevação da CE_{50} antes $4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ para $126,50 \pm 2,35 \mu\text{g/ml}$ (figura 2), indicando claro envolvimento da via da produção do NO no efeito do EACL.

Mesmo com o envolvimento do NO no efeito de EACL, por tratar-se de um extrato, portanto um composto de muitas substâncias, é possível sugerir, que outras vias relaxantes derivadas do endotélio possam também estar envolvidas na atividade vasorelaxante do EACL.

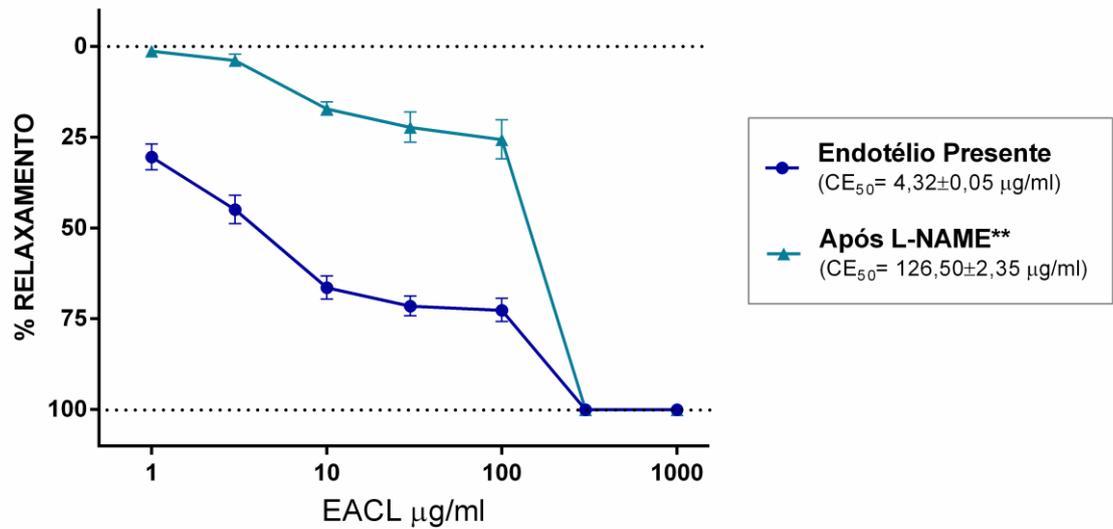


Figura 2: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1µM), antes (controle E⁺) e após a inibição da NO sintase. ******(p<0,01) *versus* E⁺.

Envolvimento da via de produção das prostaciclinas no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Após o bloqueio da síntese de prostaglandinas através da Indometacina, a resposta vasorelaxante induzida por EACL foi significativamente (p<0,01) inibida após incubação da indometacina, fato revelado na elevação da CE₅₀ de 4,32±0,05 µg/ml para 124,6±0,05 µg/ml, sugerindo que o efeito de EACL também é relacionado a via da produção das prostaciclinas (Figura 3).

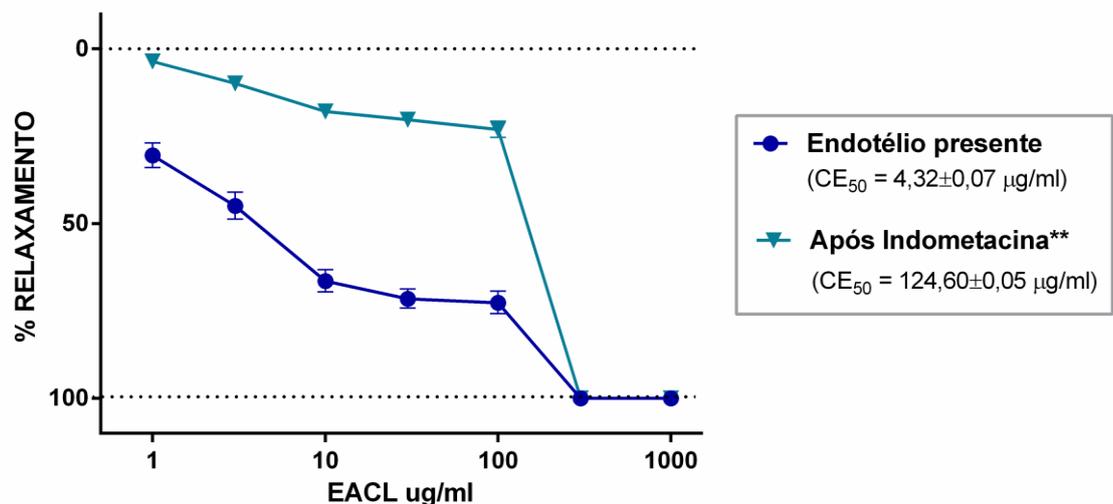


Figura 3: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1µM), antes (controle E⁺) e após a inibição da cicloxigenase (COX-1). ******(p<0,01) *versus* E⁺.

Envolvimento da *via* muscarínica no efeito relaxante do EACL em anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos pré-contraídos com FEN

Nessa abordagem, a resposta vasorelaxante induzida pelo EACL foi a mais significativamente atenuada, como mostra a proeminente ($p < 0,01$) elevação da CE_{50} de $4,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ para $437,10 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ (figura 4). Esses dados sugerem que os receptores muscarínicos parecem ser os mais significativamente implicados ($p < 0,01$) no efeito vasorelaxante induzido pelo EACL em aorta torácica isolada de ratos.

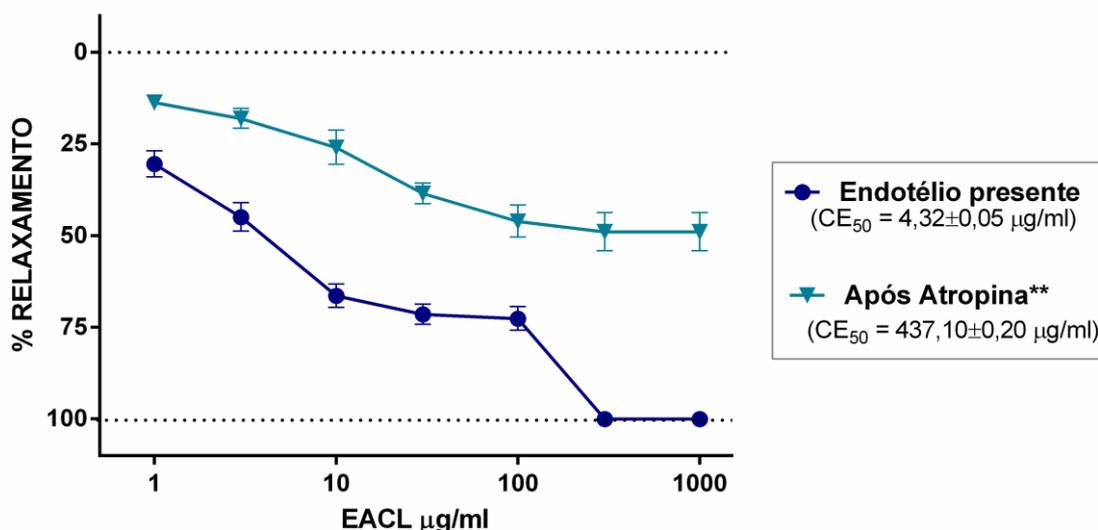


Figura 4: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ($0,1 \mu\text{M}$), antes (controle E^+) e após a incubação com atropina ($1 \mu\text{M}$). **($p < 0,01$) *versus* E^+ .

Efeito do EACL sobre a contração dada pelo represamento ao efluxo do K^+ intracelular

Em anéis desprovidos de endotélio, ainda que com expressão bem menor, EACL continuou apresentando atividade vasorelaxante significativa ($p < 0,01$). A resposta vasorelaxante induzida por EACL em anéis de aorta torácica isolada de ratos pré-contraídos com $KCL_{20} \text{ mM}$ foi significativamente ($p < 0,01$) menor que o relaxamento induzido por EACL sobre a contração dada pela FEN em anéis (E^-) (figura 5). O percentual de vasorelaxamento sobre a contração do $KCL_{20} \text{ mM}$ foi 56,98% e de 31,56% sobre a contração do $KCL_{80} \text{ mM}$. Nesse sentido, parece que o efeito de EACL tem maior significância na abertura de canais de K^+ do que do que no bloqueio à canais de cálcio operados por voltagem (VOCCS's) (Figura 5).

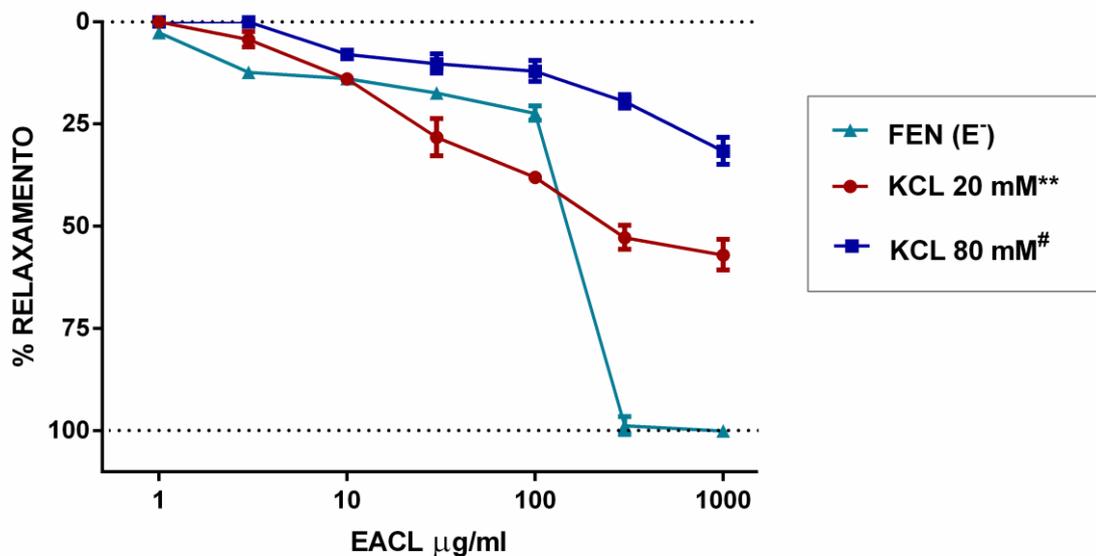


Figura 5: Curva concentração-resposta para EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) em anéis sem endotélio de aorta torácica isolada de rato pré contraídos com FEN, KCL 20 e 80. **($p < 0,01$) versus (FEN) #($p < 0,01$) versus KCL 80.

Discussão

Na primeira abordagem (figura 1) com anéis (E⁺) e (E⁻), observou-se que o efeito de EACL é muito dependente de fatores derivados do endotélio vascular devido ao seu maior relaxamento em anéis E⁺.

O endotélio vascular, pela camada de células que o reveste internamente, produz substâncias mediadoras de várias naturezas, que regula o tônus da musculatura lisa vascular^{19,24}. Há um controle natural da liberação desses mediadores, no limite das funções fisiológicas a liberação dos fatores relaxantes se antecipa a dos contracturantes²⁰, sendo o NO o primeiro a ser liberado, seguido pelas prostaciclina e por outros agentes relaxantes derivados do endotélio²¹.

O NO, produzido pelas células endoteliais com função vasodilatadora fisiológica^{22,23} em muitos estudos tem se pronunciado como o principal fator relaxante derivado do endotélio vascular. Ele atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular promovendo o relaxamento das células dessa musculatura²⁴, atua por estimulação da guanilil ciclase da fração solúvel do citoplasma, a transformação de Guanosina trifosfato (GTP) em Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que é o segundo mensageiro responsável pelo efeito relaxante vascular²⁵.

Na síntese de NO ocorre primeiramente a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidínicos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA), depois ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina²⁶. Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da L-arginina, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)²⁷. Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS²².

Após o bloqueio da produção de NO (figura 2), verificou-se que no efeito EACL há um importante envolvimento do NO na produção do relaxamento, porém, mesmo com tal importância do NO neste efeito, por tratar-se de um extrato, portanto um composto de muitas

substâncias, é possível sugerir, que outras vias relaxantes derivadas do endotélio possam também estar envolvidas na atividade vasorelaxante do EACL.

A partir do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolípidios da membrana das células endoteliais por fosfolipases ativadas (A₂ e C), e através da ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) as prostaglandinas são sintetizadas²⁸. Uma vez liberadas, principalmente a PGI₂ e PGE₂, se difundem para as células musculares lisas promovendo vasorrelaxamento por meio de receptores IP e EP₄, aumento do AMPc e reduzindo Ca²⁺ intracelular²⁹.

O bloqueio da síntese das prostaglandinas vasorelaxantes se dá através da inativação das enzimas que degradam o ácido araquidônico (COX-1 e COX2)²⁸. A indometacina é um inibidor não seletivo à produção dessas prostaglandinas³⁰. Diante deste bloqueio realizado e a diminuição do efeito vasorelaxante do extrato mostrado na figura 3, é possível sugerir também o envolvimento das prostaglandinas.

Ainda no endotélio vascular estão presentes os receptores muscarínicos que existem em muitos tipos de células e participam da sinalização celular logo que ativados pelo ligante acetilcolina³. Aceita-se atualmente cinco subtipos de receptores muscarínicos, designados M1, M2, M3, M4 e M5, sendo os receptores M3 que contribuem para a contração do músculo liso, para a secreção glandular e para a secreção endotelial de NO, sendo através da produção de NO endotelial que a ACh tem efeitos vasodilatadores *in vivo*³². Para verificação do envolvimento da via muscarínica no efeito relaxante do EACL, foi realizado o antagonismo dos receptores muscarínicos por meio da incubação de atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos que age por competitividade nesses receptores, impedindo que a ACh se ligue e exerça sua atividade. Nesta abordagem (figura 4), onde a resposta vasorelaxante de EACL foi mais atenuada, aponta-se que os receptores muscarínicos parecem ser os mais significativamente implicados (p<0,01) no efeito vasorelaxante induzido pelo EACL em aorta torácica isolada de ratos.

A resposta relaxante em anéis (E⁻) também foi importante nestas abordagens para avaliar o possível envolvimento de canais iônicos. A atividade dos canais K⁺ consiste em um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares, sendo um determinante importante do tônus vascular³³. A abertura de um canal de potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular causando hiperpolarização da membrana celular e então há um bloqueio canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e conseqüente diminuição da entrada de íons Ca²⁺ para o meio intracelular, causando o relaxamento vascular^{33,34}. De forma contrária, o fechamento de canais de potássio causa um estado de despolarização, abertura de canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem, aumento da Ca²⁺ intracelular e vasoconstrição³³.

Esse mecanismo de relaxamento e contração do músculo liso difere quanto ao mecanismo de ação da FEN, que estimula diretamente os receptores α -adrenérgicos da proteína G, agindo via fosfolipase C, aumentando os níveis de IP3 e ocasionando liberação do Ca²⁺ intracelular provocando a contração muscular³⁵.

Esses resultados mostrados na figura 5 apontam que parte do efeito relaxante de EACL está relacionado à influência que o extrato parece ter na abertura de canais iônicos, principalmente sobre canais de K⁺, uma vez que a hiperpolarização da membrana das células do

músculo liso pode ser produzida por agentes que abrem os canais de K^+ , levando ao efluxo de K^+ da célula ³⁶.

A contração induzida por K^+ em aorta parece ser dependente do influxo de Ca^{2+} através de VOCC's, sendo sua contração inibida pela remoção do Ca^{2+} do meio externo e pelos bloqueadores destes canais³⁷. Ao mesmo tempo em que a abertura de canais de Ca^{2+} pode ser requerida por um processo de despolarização de membrana, os agentes que produzem hiperpolarização de membrana podem causar o fechamento dos canais de Ca^{2+} , reduzindo o influxo de Ca^{2+} , promovendo o relaxamento do músculo liso³⁸.

Canais iônicos parecem também envolvidos na significativa atividade vasorelaxante do EACL, sendo maior sua expressão na abertura de canais de K^+ do que no bloqueio a VOCC's.

Conclusão

EACL induziu vasorelaxamento significativo, sendo mais expressivo na presença de endotélio. A via muscarínica parece ser a principal envolvida nesse efeito, seguida pela *via* da produção de NO a das Prostaciclina. A abertura de canais de K^+ pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio à VOCC's. EACL não apresentou indícios de toxicidade nas concentrações administradas. Há necessidade de maiores estudos sobre a fitoquímica do EACL, bem como de melhor investigação farmacológica por meio de muitas outras abordagens e modelos experimentais, em como pelo uso de ferramentas para elucidação dos mecanismos de ação assumidos pelo extrato.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico para o financiamento do projeto (CNPQ - CNPQ - 407943/2013-7). Brozzo, NPM é apoiada por uma bolsa de mestrado da CAPES.

Contribuição de autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Brozzo, NPM; Obtenção de dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Brozzo, NPM, CUNHA, RM, MENEGUETTI, DUO; Análise e interpretação dos dados: Brozzo, NPM, Cunha, RM, SILVA, EF, SILVA, DA; Análise estatística: Brozzo, NPM, GONÇALVES, EA; Obtenção de financiamento: CUNHA, RM.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo CNPq.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Natacha Pinheiro Melo Brozzo pela Universidade Federal do Acre.

Referências

- 1- Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças Cardiovasculares. Brasília (DF); 2016.
- 2- Braga ADA, Barleta VCN. Alimento Funcional: Uma Nova Abordagem Terapêutica das Dislipidemias como Prevenção da Doença Aterosclerótica. Cad uniFOA. 2017 Mar; 2(3): 100-120.
- 3- Oliveira GMM, Mendes M, Malachias MVB, Morais J, Filho OM, Coelho AS, et al. Diretrizes de 2017 para manejo da hipertensão arterial em cuidados primários nos países de língua portuguesa. Rev Port Cardiol. 2017 Out; 36(11): 789-798.
- 4- Fonteneles JL, Santos ZMSA, Silva MP. Estilo de vida de idosos hipertensos institucionalizados: Análise com foco na educação em saúde. Rev Rene. 2009 Set; 10(3): 53-60.
- 5- Martelli A, Longo MAT, Seriane C. Aspectos clínicos e mecanismo de ação das principais classes farmacológicas usadas no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Estud Biol. 2008 Jan; 30(70/72): 149-156.
- 6- Barbosa MO, Lacerda GM, Alves DA, Oliveira CJ, Kerntopf MR, Fernandes GP. Uso de recursos naturais para o tratamento de diabetes e de hipertensão em comunidades tradicionais. R Interd. 2017 Jun; 10(2): 125-131.
- 7- Souza JBP, Ataliba FJB, Costa DA, Farias, AD. Interações planta medicinal x medicamento convencional no tratamento da hipertensão arterial. Rev Cienc Farm. 2017 Mar; 29(2): 90-99.
- 8- Chainani-Wu, N.afety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). J Altern Complement Med. 2003 Fev; 9(1): 161-168.
- 9- Pintão AM, Silva IF. A verdade sobre o açafraão. In: Workshop Plantas Medicinaiis e Fitoterapêuticas nos Trópicos. 2008 Out.Portugal, IICT/CCCM; 29(30): 1-19.
- 10- Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Abhari A, Chodari L, Mohaddes G. Cardioprotective Effect of Crocin Combined with Voluntary Exercise in Rat: Role of Mir-126 and Mir-210 in Heart Angiogenesis. Arq. Bras. Cardiol. 2017 Jun; 109(1):54-62.
- 11- Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. Altern Med Ver 2009 Jun; 14(2): 141-153
- 12- Chainani-Wu, N.afety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). J Altern Complement Med. 2003 Fev; 9(1): 161-168.
- 13- Araujo CAC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul; 96(5):723-728.
- 14- Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. Chem Pharm Bull. 1985 Jun; 33(4): 1725-1728.
- 15- Apisariyakul A, Vanittanakom, N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). J Ethnopharmacol 1995 Dez; 49(3): 163-169.
- 16- Adamayore OA, Anjos RM, Almeida MM, Veras RC, Silva DF, Oliveira FA, et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. J Ethnopharmacol. 2009 Jul; 124(3): 457-462.
- 17- OECD. In: Acute oral toxicity- Acute oral toxic class method. Eleventh Addendum to the OECD guidelines for the testing of chemicals, Organization for Economic Co-operation and Development. Paris; 2001.
- 18- Malone M H, Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. Lloydia. 1962 Jan; 25(4): 320-332.

- 19- Ceballos G; Gutiérrez SG, Meaney E. The vascular endothelium: a review series I. Basic aspects of the vascular endothelium. *Rev Mex Cardiol.* 2015 Jun; 26(2): 95-100.
- 20- Pinto WJ, Areas MA, Reyes FGR. Óxido nítrico e o sistema vascular: uma revisão. *Acta Cient Biol Sau.* 2003 Jul; 5(1): 47-61.
- 21- Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens.* 2001 Jul; 8(3): 328-338.
- 22- Dusse LMS, Vieira M, Carvalho MDG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab.* 2003 Mai; 39(4): 435-50.
- 23- Jeddi S, Asl AN, Asgari A, Ghasemi A. The effect of sleep deprivation on cardiac function and tolerance to ischemia-reperfusion injury in male rats. *Arq. Bras. Cardiol.* 2016 Jan; 106(1): 41-48.
- 24- Potje SR. Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico [Ru (terpy)(bdq) NO] 3+(TERPY) em artéria de resistência e sua interação com a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) [Tese]. Araçatuba (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita”, 2016.
- 25- Cabral JE, Belik J. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: recent advances in pathophysiology and treatment. *J Pediatr.* 2013 Jun; 89(3): 226-242.
- 26- Flora FR, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções.* *Rev Assoc Med Bras.* Set 2013; 46(3): 265-271.
- 27- Maggi C A, Barbanti G, Turini, D, Giuliani S. Effect of NG-monomethyl l-arginine (l-NMMA) and NG-nitro l-arginine (l-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Br J Pharmacol.* 2001 Ago 103(4): 1970-1972.
- 28- Batlouni M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *Arq. Bras. Cardiol.* 2010 Abr; 94(4): 556-563.
- 29- Andre E. Análise dos mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo sesquiterpeno poligodial em vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho in vitro [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- 30- Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper’s illustrate biochemistry, 30ª ed. New York: McGraw Hill Global, 2015. ISBN10: 0071825347
- 31- Rodrigues LU, Soares CT, Venuto D.B, Santana RG, Xavier AR, da Silva JCT, et al. Receptores muscarínicos na doença pulmonar obstrutiva crônica: o que é importante saber da Biologia à prática clínica?. *Rev Med* 2016 Jul; 95(3): 128-132.
- 32- Vieira AM. Eficácia do extrato aquoso de maytenus rigida mart.(celestaceae) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: análise do envolvimento de óxido nítrico, prostaglandinas, receptores opioides e α -2-adrenérgicos [dissertação]. Sobral (CE): Universidade Federal do Ceará, 2013.
- 33- Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. ISBN 13:9788527715201.
- 34- Veloso CC, Soares GL, Perez AC, Rodrigues VG, Silva FC. Pharmacological potential of Maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. *Rev Bras Farmacogn.* 2017 Ago; 27(4): 533-540.
- 35- Chioca LR, Segura RCF, Andreatini R, Losso EM. Antidepressivos e anestésicos locais: interações medicamentosas de interesse odontológico. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2010 Dez; 7(4): 466-473.

- 36- SILVA AS, ZANESCO A. Exercício físico, receptores β -adrenérgicos e resposta vascular. *J Vasc Bras.* 2010 Mar; 9(2): 47-56.
- 37- Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *R Pharmacol*, 1997 Set; 47(3): 387-573.
- 38- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998 Jan; 78(1): 53–97.

ANEXO II: Comprovante de submissão do artigo nos Arquivos Brasileiros de
Cardiologia

28/02/2018 Gmail - Submitting of the File by the author - Awaiting PDF Confirmation / Envio do Artigo pelo autor - Aguardando Aprovação do PDF



Natacha Brozzo <natachabruzzo@gmail.com>

Submitting of the File by the author - Awaiting PDF Confirmation / Envio do Artigo pelo autor - Aguardando Aprovação do PDF

Arquivos Brasileiros de Cardiologia <abc@cardiol.br>
Para: natachabruzzo@gmail.com

24 de fevereiro de 2018 00:28

The author NATACHA PINHEIRO MELO BROZZO has sent the manuscript:Curcuma longa abole contrações induzidas por fenilefrina em artéria aorta isolada de ratos 10189. The manuscript wait upon the approval of the PDF generated, in case of it has already been approved, please disregard this message. O autor NATACHA PINHEIRO MELO BROZZO enviou o Artigo:Curcuma longa abole contrações induzidas por fenilefrina em artéria aorta isolada de ratos 10189.O artigo no momento aguarda a aprovação do PDF gerado, caso já tenha sido aprovado, favor desconsiderar essa mensagem.

ANEXO III: Qualificação da revista QUALIS

Qualis Periódicos

*** Evento de Classificação:**
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS TRIÊNIO 2010-2012 ▾

Área de Avaliação:
 INTERDISCIPLINAR ▾ +

ISSN:
 0066-782X

Título:

Classificação:
 B1 ▾

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0066-782X	ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA (IMPRESSO)	INTERDISCIPLINAR	B1

[Início](#) [Anterior](#) [1](#) ▾ [Próxima](#) [Fim](#)

1 a 1 de 1 registro(s)

ANEXO IV: Resumos publicados e apresentados em congressos.

RESUMO I: Efeito relaxante de *Curcuma longa* (Açafrão) em aorta torácica de isolada de ratos.



EFEITO RELAXANTE DO AÇAFRÃO EM AORTA TORÁCICA ISOLADA DE RATOS

Natacha Pinheiro Melo Brozzo¹; Efraim dos Santos Ferreira²; Eduardo Andrade Gonçalves³; Delano Aníbal da Silva⁴; Renildo Moura da Cunha⁵

1. Universidade Federal do Acre (mestranda pelo CITA), 2. Universidade Federal do Acre (mestrando pelo CITA); 3. Universidade Federal do Acre (mestre pelo CITA); 4. Faculdade Meta (professor doutor); 5. Universidade Federal do Acre (professor orientador).

Introdução: O estudo das plantas utilizadas na medicina popular contribui de forma extremamente importante para o universo científico, possibilitando constatar seus possíveis efeitos no tratamento de doenças que se acometem no corpo social, como por exemplo a hipertensão arterial. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito relaxante do açafrão (*Curcuma longa*) em aorta torácica isolada de ratos (AOTIR). **Metodologia:** Foi realizado extrato aquoso das folhas de açafrão (EACL) e separados 2 animais (n= 6 anéis de aorta). Os animais foram sacrificados e foi realizada a secção das aortas em tamanhos de 3 a 5 mm e então transferidas para uma placa de Petri com solução de KREBS. Após limpeza os anéis eram colocados no banho de órgãos isolado para realização da curva concentração resposta. Os anéis foram pré-contráidos com Fenilefrina e para avaliar a participação do endotélio vascular foi adicionado Acetilcolina e após eram adicionadas concentrações crescentes do extrato na cuba contendo os anéis. A porcentagem de relaxamento foi determinada através da comparação dos valores da contração da FEN antes e após adição do extrato. **Resultados e Discussão:** As concentrações crescentes de EACL induziu significativamente ($p < 0,05$) efeito relaxante em AOTIR de maneira dependente da concentração. A resposta de EACL foi significativamente modificada pela remoção do endotélio dos anéis, sugerindo que o EACL age de maneira muito dependente do endotélio. **Conclusão:** EACL demonstrou atividade relaxante em AOTIR, isso indica que possa ter um potencial na diminuição da pressão arterial, sendo um efeito positivo para o tratamento de doenças cardiovasculares.

RESUMO II: Efeito relaxante de *Curcuma longa* sobre contrações induzidas por Fenilefrina frente ao bloqueio da via de produção do óxido nítrico em artéria aorta isolada de ratos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
COLÉGIO DE APLICAÇÃO
FÓRUM DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E MEIO AMBIENTE NO ENSINO BÁSICO TÉCNICO E TECNOLÓGICO
Construção de Saberes



SOUTH AMERICAN

Journal of Basic Education, Technical and Technological

EFEITO RELAXANTE DE *Curcuma longa* SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR FENILEFRINA FRENTE AO BLOQUEIO DA VIA DE PRODUÇÃO ÓXIDO NÍTRICO EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS

Natacha Pinheiro Melo Brozzo^{1*}, Efraim dos Santos Ferreira², Delano Anibal da Silva³, Eduardo Andrade Gonçalves⁴, Dionatas Uíses de Oliveira Meneguetti⁵, Mc O'nnill Nascimento Dias⁶, Elionardo Pereira Barroso⁷, Renildo Moura da Cunha⁸

- 1,2. Discente PPG-CITA da Universidade Federal do Acre (UFAC);
 3. Docente da Faculdade Meta (FAMETA)
 4. Docente da Universidade Federal do Acre (UFAC)
 5. Docente do Colégio Aplicação (CAP/UFAC) e da Universidade Federal do Acre (UFAC)
 - 6,7. Discente de Nutrição da Universidade Federal do Acre (UFAC)
 8. Pesquisador da Universidade Federal do Acre (UFAC)/ Orientador
- * Autor correspondente: natacha_ieq@hotmail.com

Introdução

As plantas usadas na medicina tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (FIRMO, et al., 2012). O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, onde somente na região amazônica a riqueza da flora compreende aproximadamente 30 mil espécies, cerca de 10% das plantas de todo o planeta (SOUZA, et al., 2015) e muitas dessas plantas são medicinais e sempre foram utilizadas por tribos indígenas nativas (BETTEGA, et al., 2011).

O estudo das plantas usadas na medicina popular contribui de forma muito importante para ciência, possibilitando constatar seus possíveis efeitos no combate a várias moléstias, entre elas as doenças cardiovasculares.

Estudos mostram que uma das principais causas de mortalidade no Brasil e por doenças cardiovasculares (ISHITANI, et al., 2006). As doenças isquêmicas do coração assumem importante papel no quadro de morbimortalidade atual (REZENDE, 2004) e a hipertensão arterial (HA) é considerado um dos maiores problemas de saúde pública sendo reconhecida como grave fator de risco para as doenças cardiovasculares (LOPES, et al., 2003).

Com base nessas constatações este trabalho teve por objetivo a verificação de

possível efeito relaxante de *Curcuma longa* (Açafrão) sobre contrações induzidas por Fenilefrina (FEN), antes e após o bloqueio da via de produção óxido nítrico (NO), em anéis de artéria isolada de ratos.

Material e Métodos

O extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL) foi preparado de acordo com normas técnicas. Para curva concentração-resposta foram separados 2 ratos machos (n= 6 anéis de aorta) e após serem sacrificados era retirada a artéria aorta torácica e imediatamente transferida para uma placa de Petri com solução de Krebs aerada com mistura carbogênica para realizar a secção do vaso em tamanhos de 3 a 5 mm.

Após limpeza, os anéis eram montados em um sistema de cubas contendo solução de Krebs e ligado a transdutores de tensão isométrica conectados a um "software" em um computador para registros gráficos das variações de tensão. Após a estabilização das preparações por 1 hora em tensão de 1g, os anéis eram pré-contraídos com 1µM de FEN e no platô da sua contração feita adição de 1µM de acetilcolina para verificação do percentual de endotélio dos anéis.

Após a lavagem das preparações até a linha de base, era feita uma segunda contração com 1µM de FEN e sobre o platô dela era feita a adição de concentrações



crescentes do EACL.

Para verificar a participação do NO, novos anéis (n=6) com endotélio íntacto eram preparados da mesma maneira até a verificação do endotélio vascular. Após lavagem era adicionado às cubas 100 μ M de L-NAME por 30 minutos e na sequência era induzida uma segunda contração com 1 μ M de FEN e sobre o platô dela era feita a adição de concentrações crescentes do EACL. Na análise estatística utilizou-se de Two-Way ANOVA e teste T no programa Graphpad Prisma 6.0.

Resultados e Discussão

EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 μ g/ml, n=6) induziu significativamente ($p < 0,05$) efeito relaxante ($\text{LogCE}_{50} = 0,63 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). Os efeitos vasorrelaxantes ocorreram de maneira dependente da concentração. A resposta de EACL foi significativamente modificada pela remoção do endotélio dos anéis ($\text{LogCE}_{50} = 2,12 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$).

O efeito vasorrelaxante de EACL foi significativamente inibido após incubação L-NAME ($\text{LogCE}_{50} = 2,10 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$). Já é bem compreendido que o Óxido Nítrico produzido no endotélio tem função vasodilatadora fisiológica (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular promovendo o relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Com a diminuição do relaxamento após a retirada do endotélio na curva concentração-resposta e a significativa inibição do seu efeito após bloqueio da via de produção do NO, parecendo ser um ativador da síntese NO que pode promover quedas da pressão arterial, podendo ser este um efeito positivo para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Conclusão:

EACL apresentou atividade vasorrelaxante em anéis de aorta torácica de ratos, sua atividade parece ser dependente do endotélio vascular e um indutor da produção da síntese de NO. Isso pode sugerir EACL como um potencial hipotensor.

Palavras-chave: hipertensão arterial; plantas medicinais; açafraão.

Apoio financeiro: CAPESME, PROPEGUFAC.

Referências bibliográficas

DE SOUZA, S.S. et al. Impacto das estruturas urbanas em relação à biodiversidade Amazônica. *Revista de Arquitetura IMED*, v. 3, n. 2, p. 145-155, 2015.

BETTRIGA, P.V.C. et al. Fitoterapia dos canteiros ao lado da farmácia. *Archives of Oral Research*, v. 7, n. 1, p. 52-57, 2011.

ISHTANI, L.H. et al. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. *Rev Saúde Pública*, v. 40, n. 4, p. 654-61, 2006.

REZENDE, S.M.; SAMPAIO, I.S.M.; ISHTANI, L.H. Causas múltiplas de morte por doenças crônico-degenerativas: uma análise multidimensional. *Múltiplas causas of death of non-communicable diseases*. *Cad. Saúde Pública*, v. 20, n. 5, p. 1222-1231, 2004.

LOPES, H.F.; BARRETO-FILHO, J.A.S.; RICCIO, G.M.G. Tratamento não-medicamentoso da hipertensão arterial. *RevSocCardiol Estado de São Paulo*, v. 13, n. 1, p. 145-55, 2003.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, S. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 45, n. 3, p. 265-271, 2000.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. ÓXIDO NÍTRICO. REVISÃO. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, 2002.

FIRMO, W.D.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais*. *Cadernos de Pesquisa*, v. 15, 2012.

RESUMO III: Efeito relaxante de *Curcuma longa* sobre contrações induzidas por Fenilefrina e KCl em artéria aorta isolada de ratos normotensos.



Efeito relaxante de *Curcuma longa* L. sobre contrações induzidas por Fenilefrina e KCl em artéria aorta isolada de ratos normotensos

Natacha Pinheiro Melo Brozzo¹, Efraim dos Santos Ferreira², Eduardo Andrade Gonçalves³, Renildo Moura da Cunha⁴

1. Discente PPG-CITA da Universidade Federal do Acre (UFAC)
2. Discente PPG-CITA da Universidade Federal do Acre (UFAC)
3. Docente da Universidade Federal do Acre
4. Pesquisador da Universidade Federal do Acre (UFAC) Orientador

Introdução: Estudos voltados para plantas medicinais possibilitam constatar seus efeitos no combate a doenças que se acometem na sociedade, como a hipertensão arterial. **Objetivos:** Este trabalho objetivou verificar o vasorelaxamento do extrato aquoso de *Curcuma longa* L. (EACL) em aorta torácica isolada de ratos (AOTIR). **Metodologia:** EACL foi obtido conforme normas técnicas. Anéis de 3 a 5 mm de AOTIR eram montados em um sistema de cubas contendo solução nutritiva (Krebs) e ligados a transdutores de tensão conectados a um “software” para registros das variações da tensão. Após estabilização das preparações, AOTIR eram pré-contraídos com Fenilefrina (1 μ M) e no platô da sua contração adição de Acetilcolina (1 μ M) para verificação do percentual de endotélio. Após lavagem, era feita uma segunda contração com Fenilefrina e, em outras preparações, com KCL, então sobre o platô dessas contrações era feita adição de EACL. A porcentagem de relaxamento foi determinada pela comparação dos valores da contração da FEN e KCL antes e após adição de EACL aplicado análise estatística ANOVA Two-Way. **Resultados e Discussão:** EACL induziu significativo ($p < 0,0001$) efeito vasorelaxante de maneira dependente da concentração. Esse efeito foi significativamente inibido pela remoção do endotélio assim como, após incubação com KCL 20 e 80 mM, sugerindo que EACL age muito dependente da via endotelial, possuindo envolvimento com canais de K⁺ e de Ca²⁺ operados por voltagem. **Conclusão:** É possível que EACL seja um potencial indutor da diminuição da pressão arterial. É necessário aprofundamento dos estudos por meio de outros testes cardiovasculares.

Palavras-chave: hipertensão arterial, açafrão, vasorelaxamento.

RESUMO IV: Efeito relaxante de *Curcuma longa* sobre contrações com fenilefrina e KCL em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos



Efeito relaxante de *Curcuma longa* sobre contrações com fenilefrina e KCL em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos

BROZZO, Natacha P.M.¹; FERREIRA, Efraim S.¹; GONÇALVES, Eduardo A.²; MENEGUETTI, Dionatas O.²; CUNHA, Renildo M.².

1. Mestranda(o) pelo Programa em Ciência e Inovação Tecnológica para Amazônia da Universidade Federal do Acre (UFAC).
2. Doutoranda pelo programa de pós-graduação da rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.
3. Professor da Universidade Federal do Acre (UFAC).

Introdução: As doenças cardiovasculares são uma das mais importantes causas de morte no mundo, sendo um forte fator de risco para ocorrência delas a hipertensão arterial, possuindo uma prevalência de mais 20% dos brasileiros.

Objetivos: Investigar os efeitos vasorelaxantes do extrato aquoso de *Curcuma longa* (EACL).

Métodos: Anéis de aorta torácica isolada de ratos normotensos, com ou sem endotélio, medindo 4 mm, eram montados em cubas, fixados a um transdutor, imersos em solução Krebs a 37 °C, aeradas por mistura carbogênica e estabilizados por 1 h, sob tensão de 1 grama, em um sistema de registro de dados. Sobre uma contração por Fenilefrina, era feita a incubação do EACL (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) antes e após a incubação de atropina ou de L-name ou de indometacina. Do mesmo modo, testaram-se concentrações do EACL sobre contrações por elevação de K⁺ extracelular.

Resultados: EACL induziu vasorelaxamento significativo (p<0,01). O efeito foi significativamente dependente do endotélio vascular (CE₅₀ = 4,32±0,05 µg/mL). Após inibição da via de produção do NO a CE₅₀ foi para 126,50±2,35 µg/ml, após inibição da produção prostaciclina, para 124,6±0,05 µg/ml e após o bloqueio muscarínico para 437,10±0,2 µg/mL. A abertura de canais de K⁺ (relaxamento de 56,98%) e bloqueio a VOCC's (relaxamento de 31,56%), foram significativamente evidentes.

Conclusão: EACL induziu vasorelaxamento significativo, sendo mais expressivo na presença de endotélio. A via muscarínica parece ser a principal envolvida nesse efeito, seguida pela via da produção de NO e das Prostaciclina. A abertura de canais de K⁺ pelo EACL parece ter maior expressão do que seu bloqueio a VOCC's, sendo esses efeitos positivo para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Açafrão; vasodilatação; hipertensão.

