

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

**Atividade vasodilatadora da 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona, uma oxima derivada do Lapachol**

**NAYARA MACÊDO MAGALHÃES**

**Orientador: Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar**

**Co-orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**João Pessoa - PB**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NAYARA MACÊDO MAGALHÃES**

**Atividade vasodilatadora da 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona uma oxima derivada do Lapachol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros/LTF-UFPB como requisito para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar**

**Co-orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**João Pessoa – PB**

**2007**

**NAYARA MACÊDO MAGALHÃES**

**Atividade vasodilatadora da 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil) naftalen-1(4H)-ona, uma oxima derivada do Lapachol**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Jaci Carlos Lima de Alencar (Orientador)**

---

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

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Eurica Adélia Nogueira Ribeiro**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Liana Clébia Soares Lima de Moraes**

**João Pessoa - PB**

**2007**

*Dedicatória*

Dedico esta grande conquista a minha família, pessoas mais importantes de minha vida:

Aos meus pais Maria de Lourdes e Osman Gonçalves, pelo amor, carinho, apoio e dedicação fornecida ao longo de toda a minha vida, visando sempre o melhor para a minha formação pessoal e profissional;

Aos meus irmãos, Natália, Nelson e Osman , pelo amor, carinho e incentivo na minha educação. Vocês ajudaram e sempre me ajudarão a construir minha personalidade e sempre serão importantes em minha vida.

## *Agradecimientos*

A Deus, pelo seu amor;

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Osman Gonçalves por todo apoio prestado durante a trajetória das minhas conquistas;

Aos meus irmãos, Natália Macedo Magalhães, Nelson Gonçalves Macedo Magalhães e Osman Gonçalves filho por fazerem parte da minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar agradeço por ter me aceitado como sua orientanda, pela consideração, paciência, amizade e atenção durante todo o decorrer da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros pela parceria e ajuda durante a realização de toda essa pesquisa, pelas discussões científicas, seriedade que me ajudam a cada dia a gostar ainda mais da pesquisa científica;

Ao Prof Dr. Celso Amorim Câmara, junto com a sua equipe da química, por ter sintetizado e cedido a substância para a realização deste trabalho científico;

Aos meus amigos do mestrado, em especial a Luciano, Ana Carolina Pessoa, Willian Bulhões, Alethéia Lacerda, Herman, Marcelo Dantas, Marcílio, Kristerson Reinaldo, Fernando, Roberto Jefferson, Islânia;

A todos os componentes do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, em especial a Valéria Lopes de Assis e Bruna Priscila Dantas pela parceria e contribuição para a realização desta pesquisa;

A todo o corpo docente e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), pelo trabalho e dedicação em busca de um ensino e pesquisa de melhor qualidade;

A José Crispim Duarte, pelo apoio e amizade prestados assim como as conversas e ensinamentos;

A seu Luís pela ajuda e zelo do Biotério;

Ao CNPQ pelo incentivo científico e apoio financeiro.

**SUMÁRIO**

<b>Índice de Figuras</b> -----	<b>XII</b>
<b>Índice de Gráficos</b> -----	<b>XIII</b>
<b>Índice de tabelas</b> -----	<b>XVI</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> -----	<b>XVII</b>
<b>RESUMO</b> -----	<b>XIX</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> -----	<b>3</b>
<b>2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE NAFTOQUINONAS</b> -----	<b>3</b>
<b>2.2 IMPORTÂNCIA DA SEMI-SÍNTESE EM QUÍMICA DE COMPOSTOS NATURAIS</b> -----	<b>5</b>
<b>2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO (NOS) E O ÓXIDO NÍTRICO (NO).</b> -----	<b>7</b>
<b>2.4 CANAIS PARA POTÁSSIO E O SEU PAPEL NO CONTROLE DO TÔNUS DO MÚSCULO LISO VASCULAR.</b> -----	<b>10</b>
<b>2.5 PAPEL DAS ENZIMAS DO COMPLEXO MICROSSOMAL P-450, GLUTATIONA S-TRANSFERASE, PEROXIDASES E XANTINA OXIDASE.</b> -----	<b>11</b>
<b>2.6 POSSÍVEL MECANISMO DA CLIVAGEM OXIDATIVA DO GRUPAMENTO (C=NOH) PELO P450 E PELA NOS.</b> -----	<b>12</b>

2.7	OXIMAS	13
3.	OBJETIVOS	15
3.1.	Geral	15
3.2.	Específicos	15
4.	MATERIAL	16
4.1	ANIMAIS	16
4.2	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	17
4.3	SOLUÇÕES NUTRITIVAS UTILIZADAS	17
5.	MÉTODOS	20
5.1	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	20
5.1.1	Ensaio farmacológico para estudos <i>in vivo</i> .	20
5.1.2	Ensaio farmacológico para estudos “ <i>In Vitro</i> ”.	21
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICAS	25
7.	RESULTADOS	26
7.1	Ensaio Farmacológico <i>in vivo</i> .	26
7.1.1	Efeitos da oxima S1 sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos e não-anestesiados.	26
7.2	Ensaio Farmacológico <i>in vitro</i> .	29
7.2.1	Estudos com anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso.	29
8.	DISCUSSÃO	42
9.	CONCLUSÕES	46

<b>10. REFERÊNCIAS</b>	<b>47</b>
------------------------	-----------

<b>Trabalhos publicados em anais de congressos</b>	<b>59</b>
--	-----------

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Tabebuia avallanadae</i> Lor.Ex.Gris .....	4
Figura 2: Estrutura química do lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-butenil)-nafto-1,4-diona).....	5
Figura 3: Esquema da síntese da oxima (3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil) naftalen-1-(4H)-ona) a partir do Lapachol. ....	7
Figura 4: Esquema da biosíntese do óxido nítrico (Fonte: Principles of Biochemistry 4th Edition - D.L. Nelson, Cox Le). ....	8
Figura 5: Esquema do possível mecanismo do segundo passo da síntese de NO (Oxidação da NOHA para citrulina e NO) ( Fonte: JOUSSERANDOT et al., 1998). ....	8
Figura 6: Possíveis mecanismos para a clivagem oxidativa do grupamento C=N(OH) pelo P450 e NOSs. Para as reações do P450 que estão envolvidas Fe(V)=O, pode haver um possível envolvimento de N-hydroxiguanidinas, amidoximas, e ketoximas para a formação de uréia, amidas e cetonas ainda não foi mencionada (Figura retirada do artigo de MANSUY et al., 1994). ....	13
Figura 7: Rato Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	16

## Índice de Gráficos

- Gráfico 1: Efeitos da oxima S1 sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados (n=5) mostrados em registros originais. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 27
- Gráfico 2: Efeito da oxima S1 sobre a pressão arterial média em ratos normotensos não anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 28
- Gráfico 3: Efeito da oxima S1 sobre a frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 28
- Gráfico 4: Efeito de concentrações crescentes de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de isolada de rato, com endotélio intacto (n=6) ou na ausência do endotélio funcional (n=6), pré-contraídos com 0,1  $\mu$ M de FEN. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 29
- Gráfico 5: Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M) na ausência (Endotélio intacto, n=6) e presença de atropina 1nM (n=6). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 30
- Gráfico 6: Curvas concentração-resposta dos efeitos vasorelaxantes da oxima S1( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M) na ausência (Endotélio intacto, n=6) ou presença de indometacina (10 $\mu$ M, n=6). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM..... 31

- Gráfico 7: Curvas concentração-resposta da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto pré-contraídos com FEN 0,1 $\mu$ M (n=6) e na presença de L-NAME 300  $\mu$ M (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.32
- Gráfico 8: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de hidroxocobalamina 30  $\mu$ M (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM..... 33
- Gráfico 9: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de azul de metileno 10  $\mu$ M (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM..... 34
- Gráfico 10: Efeito relaxante induzido por S1( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato, na ausência de endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 30mM ou 80 mM..... 35
- Gráfico 11: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de TEA<sup>+</sup> (10 mM) (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM... 36
- Gráfico 12: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de 4-AP (1 mM) (n = 6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.... 37
- Gráfico 13: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de Gliben (1  $\mu$ M) (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM..... 38

Gráfico 14: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de Glibenclamida (1  $\mu$ M) (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM..... 39

Gráfico 15: Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença da mistura dos bloqueadores (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM..... 40

**Índice de tabelas**

Tabela 1: Composição da solução normal de Krebs Henseleit (KHS). ----- 18

Tabela 2: Composição da solução KHS despolarizante com 30 mM de potássio (KCl 30). --- 18

Tabela 3: Composição da solução tyrode despolarizante com 80 mM de potássio (KCl 80). - 19

Tabela 4: Relaciona todos os resultados de  $E_{m\acute{a}x.}$  (%) e  $CE_{50}$  (M) obtidos nos ensaios *in vitro*.

-----41

### Lista de abreviaturas

Ach	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
b.p.m	Batimentos por minuto
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Bário
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterina
CaM	Calmodulina
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva 50%
DC	Débito Cardíaco
DMSO	Dimetil Sufóxido
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado Do Endotélio
E <sub>Máx</sub>	Efeito Máximo
FMO	Monooxigenase que contém flavinas
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência Cardíaca
FEN	Fenilefrina
g	Gramas
GCs	Ciclase de Guanilil solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
i.p.	Intra-peritoneal
i.v.	Intravenoso
K <sup>+</sup>	Íons Potássio
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio sensíveis ao ATP
K <sub>Ca</sub> <sup>2+</sup>	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma

L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina methyl ester
L-NOHA	N <sup>ω</sup> -hidroxi-L-arginina
mg	Miligramas
mL	Milítro
min.	Minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
mm	Milímetros
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
n	Número de experimentos
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NOS	Sintase do NO
NPS	Nitroprussiato de sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase G
RVPT	Resistência vascular periférica total
TEA <sup>+</sup>	Tetraetilamônio
4-AP	4-aminopiridina

## RESUMO

**Atividade vasodilatadora da 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona uma oxima derivada do Lapachol**

Os efeitos farmacológicos da Oxima S1, uma naftoquinona derivado semi-natural do lapachol extraído da *Tabebuia avallanadae* Lor.Ex.Gris (Bignoniaceae), sobre o sistema cardiovascular, foram estudados usando técnicas combinadas *in vivo* e *in vitro*. Em ratos normotensos não-anestesiados, a oxima S1 (1, 5, 15 e 30 mg.Kg<sup>-1</sup> i.v., administradas randomicamente) produziu uma hipotensão independente da dose, além de uma diminuição da resistência vascular periférica acompanhada por uma resposta taquicárdica, provavelmente devido a uma resposta reflexa. Em anéis isolados de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com FEN a oxima S1 induziu um relaxamento dependente de concentração [E<sub>máx</sub>=50,52±10,38%, CE<sub>50</sub>=3,6±2x10<sup>-6</sup>μM], o efeito vasorelaxante da oxima foi aumentado após a remoção do endotélio vascular [E<sub>máx</sub>=87±9,9%, CE<sub>50</sub>=6,8±1,3x10<sup>-6</sup>μM]. Não houve uma alteração significativa da resposta relaxante da oxima quando na presença da atropina (E<sub>Máx</sub> = 49,33 ± 5,51 %; CE<sub>50</sub> = 4,4 ± 1,5 x 10<sup>-6</sup> M) e indometacina (E<sub>Máx</sub> = 47,19 ± 11,53%; CE<sub>50</sub> = 3,3 ± 2,8 x 10<sup>-6</sup>M). Quando anéis com endotélio foram pré-incubados com L-NAME o efeito relaxante da oxima foi potencializado [E<sub>máx</sub>=92,30±5,6%, CE<sub>50</sub>=7,0±2,5x10<sup>-6</sup>μM]. Em anéis sem endotélio pré-incubados com hidroxocobalamina houve uma diminuição do efeito relaxante promovido pela oxima [E<sub>máx</sub>= 68,1± 4,1%, CE<sub>50</sub>=1,8±0,4x10<sup>-5</sup>μM], azul de metileno [E<sub>Máx</sub>= 62,96 ± 5,98 %, CE<sub>50</sub>= 7,9 ± 1,8 x 10<sup>-6</sup>M], . Em anéis sem endotélio pré-contraídos com 30mM e 80 mM de KCl a oxima promoveu um pequeno relaxamento na presença de 30mM KCl [E<sub>máx</sub>= 41,86 ± 8,4%, EC<sub>50</sub>=1,7± 2,6x10<sup>-5</sup>μM] enquanto que na presença de 80 mM KCl foi observado ausência do efeito relaxante [E<sub>máx</sub>= 4,9 ± 2,4 %, EC<sub>50</sub>=Não significativa]. Na presença do TEA<sup>+</sup> (E<sub>Máx</sub> = 99,83 ± 0,16 %; EC<sub>50</sub> = 5,20 ± 0,63 x 10<sup>-6</sup> M), 4-AP (E<sub>Máx</sub> = 97 ± 2,8 %; CE<sub>50</sub>= 14,30 ± 2,8 x 10<sup>-6</sup>M), BaCl<sub>2</sub> (E<sub>Máx</sub> = 97,18 ± 2,81%; CE<sub>50</sub>= 1,5 ± 0,3 x 10<sup>-5</sup>M), Gliben (E<sub>Máx</sub> = 99,46 ± 1,87%; CE<sub>50</sub> = 15,52 ± 3,74 x 10<sup>-6</sup>M), não houve uma mudança significativa na resposta relaxante promovida pela oxima S1. No entanto quando utilizados simultaneamente, numa mistura de bloqueadores houve uma redução do E<sub>Máx</sub> e EC<sub>50</sub> (E<sub>Máx</sub>= 39,18 ± 2,78 %; CE<sub>50</sub>= 1,7 ± 0,4 x 10<sup>-5</sup> M) mostrando que há um envolvimento dos canais para potássio no efeito vasorelaxante promovido pela oxima S1. Esses resultados mostram que a oxima S1 induziu um efeito hipotensor e vasorelaxante que é provavelmente devido a uma vasodilatação periférica que envolve, em parte, a liberação do NO e ativação dos canais para potássio pela oxima S1.

**PALAVRAS CHAVES:** Oxima, *Tabebuia avallanadae* Lor.Ex.Gris, aorta torácica, canais para potássio, hipotensão, vasorelaxamento.

## ABSTRACT

### Activity vasodilated of the 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil) naftalen-1(4H)-ona a Lapachol's oxima derivative

The pharmacological effects of oxima S1, a naftoquinona derivative semi-natural of lapachol extracted of *Tabebuia avallanadae* Lor.Ex.Gris (Bignoniaceae), about the cardiovascular system, they were going studied using technical agreements in alive and in vitro. In mice normotensive-not anesthetized, oxima S1 (1, 5, 15 and 30 mg.Kg<sup>-1</sup> i.v., randomly) produced a hypotension independent of the dose, besides a periphery vascular resistance decrease accompanied for an answer taquicardic, probably of an answer reflex. In rings isolated of aorta with intact endothelium pré-contracted with FEN oxima S1 induced a concentration dependent relaxation [ $E_{Máx}=50,52\pm 10,38\%$ ,  $CE_{50}=3,6\pm 2\times 10^{-6}\mu M$ ], the effect vasorelaxante of oxima was going increased after the vascular endothelium removal [ $E_{Máx}=87\pm 9,9\%$ ,  $CE_{50}=6,8\pm 1,3\times 10^{-6}\mu M$ ]. There wasn't an oxima relaxing answer significant alteration when in the atropine presence  $E_{Máx} = 49,33 \pm 5,51 \%$ ;  $CE_{50} = 4,4 \pm 1,5 \times 10^{-6} M$ ) and indometacin ( $E_{Máx} = 47,19 \pm 11,53\%$ ;  $CE_{50} = 3,3 \pm 2,8 \times 10^{-6} M$ ). When rings with endothelium were pré-incubated with L-NAME oxima relaxing effect was potent [ $E_{Máx}=92,30\pm 5,6\%$ ,  $CE_{50}=7,0\pm 2,5\times 10^{-6}\mu M$ ]. In rings without endothelium pré-incubated with hidroxocobalam there was a promoted relaxing effect decrease by oxima [ $E_{Máx}= 68,1\pm 4,1\%$ ,  $CE_{50}=1,8\pm 0,4\times 10^{-5}\mu M$ ], methylene blue [ $E_{Máx}= 62,96 \pm 5,98 \%$ ,  $CE_{50}= 7,9 \pm 1,8 \times 10^{-6} M$ ], . In rings without endothelium pré-contracted with 30mM and 80 KCl mM oxima promoted a small relaxation in the presence of 30mM KCl [ $E_{Máx}= 41,86 \pm 8,4\%$ ,  $EC_{50}=1,7\pm 2,6\times 10^{-5}\mu M$ ] while in the presence of 80 mM KCl was going observed relaxing effect absence [ $E_{Máx}= 4,9 \pm 2,4 \%$ ,  $EC_{50}=\text{Não significant}$ ]. In the presence of TEA<sup>+</sup> ( $E_{Máx} = 99,83 \pm 0,16 \%$ ;  $EC_{50} = 5,20 \pm 0,63 \times 10^{-6} M$ ), 4-AP ( $E_{Máx} = 97 \pm 2,8 \%$ ;  $CE_{50} = 14,30 \pm 2,8 \times 10^{-6} M$ ), BaCl<sub>2</sub> ( $E_{Máx} = 97,18 \pm 2,81\%$ ;  $CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5} M$ ), Glibenclamida ( $E_{Máx} = 99,46 \pm 1,87\%$ ;  $CE_{50} = 15,52 \pm 3,74 \times 10^{-6} M$ ), there wasn't a significant change in the promoted relaxing answer by oxima S1. However when used simultaneously, in a mixture of blocking there was an  $E_{Máx}$  reduction and  $EC_{50}$  ( $E_{Máx} = 39, 18 \pm 2,78 \%$ ;  $CE_{50} = 1,7 \pm 0,4 \times 10^{-5} M$ ) showing that there is an involvement of the channels for potassium in the effect vasorelaxante promoted by oxima S1. These results show that oxima S1 induced an effect hypotension and vasorelaxante that probably is due to vasodilatation peripheral that involves, in part, the liberation of the in the and channels activation for potassium by oxima S1.

**KEY WORDS:** Oxime, *Tabebuia avallanadae* Lor.Ex.Gris, thoracic aorta, channels for potassium, hypotension, vasodilatation.

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial média (PAM), uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico; necessitando da ação integrada de outros sistemas como o renal, neural e endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001).

A pressão arterial (PA), pressão exercida pelo sangue nas paredes dos vasos sanguíneos, é o resultado do débito cardíaco (DC) multiplicado pela resistência periférica total (RVPT) e pode ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OASTES, 1996), ajustados para manter a pressão sanguínea em níveis sistólicos abaixo de 120 mmHg e diastólico abaixo de 80 mmHg (FREIS, 1960).

No sistema cardiovascular, a RVPT que está diretamente envolvida no controle da pressão arterial, sofre interferências resultantes de modificações tensionais no músculo liso vascular. Este é revestido internamente por uma camada unicelular denominada de endotélio vascular funcional. O endotélio tem função essencial na regulação e controle do tônus e das respostas contráteis do músculo liso vascular pela liberação de fatores contracturantes e relaxantes em condições basais e em resposta a estímulo do agonista ou alterações no fluxo sanguíneo (FURCHGOTT et al, 1980).

Atualmente, vários trabalhos na literatura têm mostrado a participação do endotélio vascular nos relaxamentos induzidas por uma variedade de substâncias químicas, endógenas e exógenas (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; COHEN e VANHOUTTE, 1995; CHAUHAN et al, 2003). O óxido nítrico (NO) e outras substâncias sintetizadas no endotélio, como as prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), têm sido implicadas nas respostas relaxantes dependentes do endotélio (MONCADA & VANE, 1993; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 1998).

Dentre estes fatores o NO, sintetizado pela enzima sintase de NO (NOS), é o principal fator relaxante na maioria dos leitos vasculares (MAYER, 1999).

É importante salientar que disfunções na função protetoras do endotélio levam a várias doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, hipertensão, disfunção cardíaca, doenças coronarianas e desordens trombóticas arteriais (IGNARRO, 1999)

Assim, baseando-se na necessidade de novas alternativas farmacológicas que possam ser utilizadas para o tratamento das doenças cardiovasculares, o presente trabalho pretende

investigar uma possível atividade cardiovascular originada a partir de um produto natural, de forma a proporcionar expectativas para a elaboração de um novo agente farmacológico para a terapêutica cardiovascular, com boa estabilidade e mais efetivo que os disponíveis comercialmente, tanto em processos agudos como crônicos de hipertensão, com uso respectivamente de grandes (para processos agudos) e pequenas doses (para processos crônicos) e mínimos efeitos colaterais, que possam diminuir a PAM sem promover prejuízos para a saúde dos pacientes.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

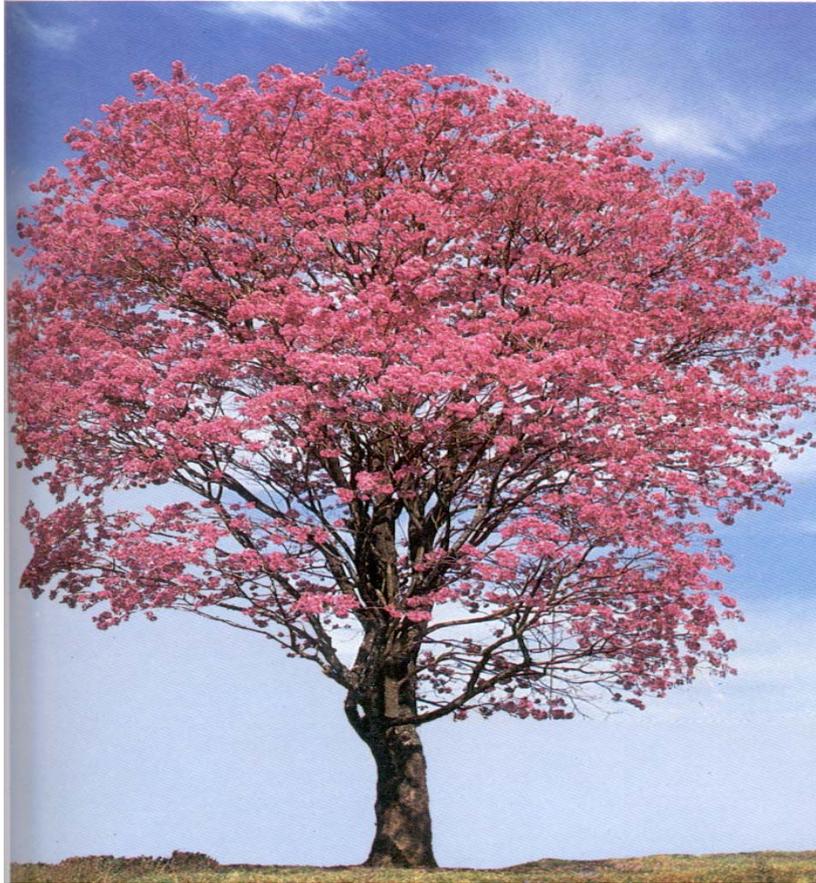
### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE NAFTOQUINONAS

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural (THOMSON, 1997). Na natureza, estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese, como por exemplo as ubiquinonas e as plastoquinonas. As naftoquinonas, como por exemplo às vitaminas do tipo K, são de irrestrita necessidade aos seres vivos, pois possuem ação controladora da coagulação sanguínea (SILVA et al., 2003).

Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. A distribuição dessas substâncias nos variados organismos implica, possivelmente, em funções biológicas múltiplas, agindo de forma visível em seus diversos ciclos bioquímicos (WENDEL, 1946). Em estudos farmacológicos as quinonas mostram variadas “biodinamicidades”, destacando-se, dentre muitas, as propriedades antimicrobianas (FERREIRA, 1992), antifúngicas (GUIRAUD et al., 1998), tripanossomicidas, antiviral, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (SILVA et al., 2003). Estudos mostram que quinonas heterocíclicas e quinonas contendo em sua estrutura átomos de nitrogênio exibem excelente atividade antitumoral além de outras atividades biológicas (HAYASHI et al., 2005). Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies reativas derivadas do oxigênio ( $O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ), como ocorre contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta um tanto recentemente, é a inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (morte celular programada) (SILVA et al., 2003). A interferência das quinonas na apoptose constitui-se hoje em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, existindo grande expectativa quanto o delineamento de estratégias racionais visando o combate de neoplasias, principalmente as relacionadas ao câncer de próstata (CROOKE & BRADNER, 1976).

Em 1956, Gonçalves de Lima e colaboradores constataram no cerne dos ipês, mais especificamente do pau d'arco rôxo, *Tabebuia sp.* (**FIGURA 1**), a existência de uma

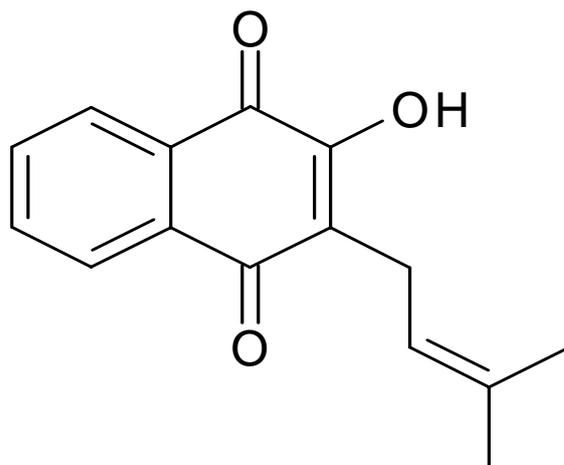
substância de coloração amarela com atividade antimicrobiana, principalmente para o gênero *Brucella* (Brucelose), e que no decurso dos estudos químicos chegaram à conclusão de que era uma naftoquinona chamada lapachol (**FIGURA 2**) .



**Figura 1.** *Tabebuia avallaneda* Lor.Ex.Gris

(Ipê Roxo-Fonte: Arvores Brasileiras vol 1. H. Lorenzi)

O Lapachol pode ser rapidamente extraído de várias espécies de *Tabebuia sp.* (Bignoniaceae) abundante no Brasil e no sul das Américas. Este conhecido, desde 1858, e tem sido encontrado como constituinte presente de várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae. Entretanto, sua ocorrência é maior na família Bignoniaceae, particularmente na espécie *Tabebuia avallaneda* Lor.Ex.Gris.



PM = 242,26 U.M.

**Figura 2:** Estrutura química do lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-butenil)-nafto-1,4-diona).

O lapachol é de fácil e barata extração da serragem da madeira de também muitas outras espécies de ipê. Há no Brasil cerca de 46 tipos de madeiras comerciais conhecidas como "ipês" (*Tabebuia sp*) (SILVA et al, 2003). Quase todos os ipês possuem um lenho bastante resistente, o que confere à sua madeira grandes valores comerciais, além de que muitas espécies apresentam potencial de utilização como corante (PIO CORRÊA, 1984). As cascas das árvores são utilizadas na medicina popular com várias finalidades, sobretudo como adstringente, febrífugo, anti-reumático (DUKE, 1985).

Atualmente são exportados pela empresa PVP Sociedade Anônima (Parnaíba, Piauí) ao custo de US\$ 1.200/kg. Outrora, o lapachol foi comercializado para utilização como coadjuvante no tratamento de certos tipos de câncer, sendo o medicamento fabricado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEP), não mais disponível no mercado (SILVA et al., 2003).

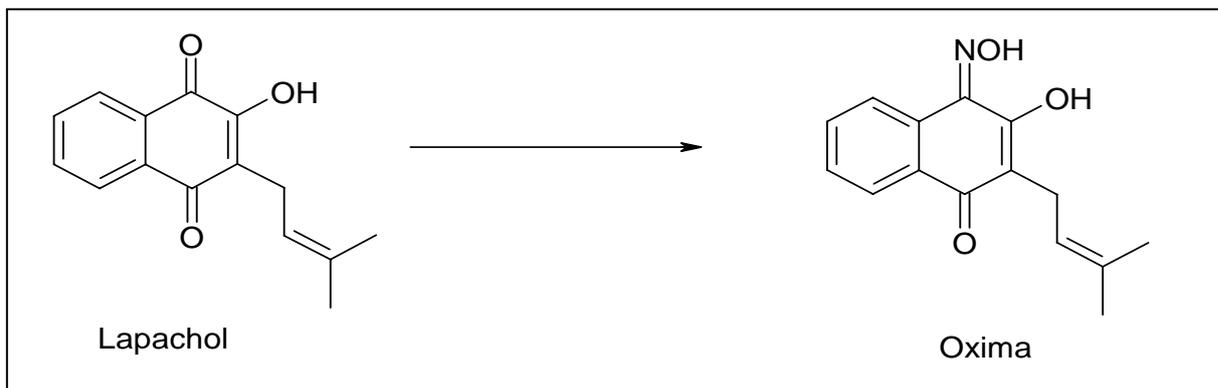
## 2.2 IMPORTÂNCIA DA SEMI-SÍNTESE EM QUÍMICA DE COMPOSTOS NATURAIS

Atualmente vários produtos naturais de plantas têm sido utilizados como estruturas básicas para desenho, síntese e desenvolvimento de novos medicamentos. Podemos citar como exemplos, a fisostigmina, a quinina, a cocaína, os opiáceos, a papaverina e o ácido salicílico, que têm servido de modelos como estrutura e para síntese de drogas

anticolinérgicas, anticolinesterases, antimaláricas, assim como a benzocaína, procaína, lidocaína, aspirina dentre outras (GARCIA, 1995). A síntese orgânica e os seus derivados sintéticos começaram então a se destacar em diversidade e em competitividade quando comparado aos produtos naturais em diversos setores industriais. No setor farmacêutico, por exemplo, predomina atualmente o uso de insumos sintéticos enquanto que o uso de produtos naturais foi predominante na primeira metade do século passado (FERREIRA et al., 1996).

A química medicinal engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento ou modificações de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica até as suas características estruturais quando da interação dos diferentes sistemas biofase/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E, finalmente, proposições e validações de modelos matemáticos através dos estudos de relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas entidades de interesse. Esta área de conhecimento, utilizando diferentes estratégias metodológicas complementares, é tradicional e reconhecidamente usada no planejamento de fármacos visando sua aplicabilidade na terapêutica (AMARAL & MONTANARI, 2002).

No presente estudo, uma equipe colaboradora de química liderada pelo Professor Dr. Celso Amorim Camara, sintetizou o oxima S1 através de uma reação de semi-síntese do lapachol com cloridrato de hidroxilamina à 80°C, com rendimento de 90%, , adicionando um átomo de nitrogênio à molécula do lapachol passando a ter em sua estrutura um grupamento (C=NOH) que é característico das oximas (CAMARA et al., 2001; CAMARA et al., 2002; SILVA et al., 2004) (**Figura 3**).



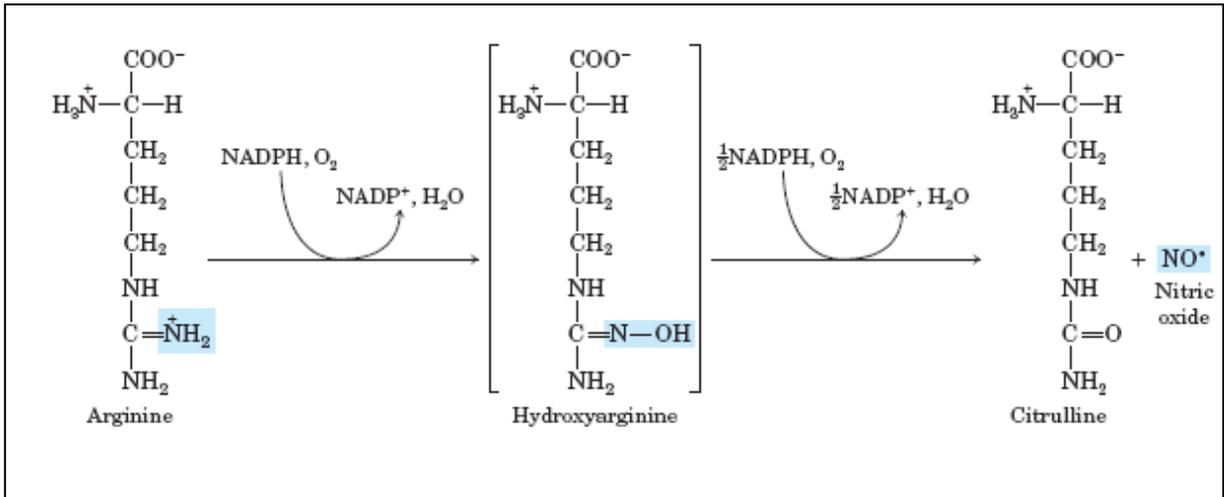
**Figura 3:** Esquema da síntese da oxima (3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil) naftalen-1-(4H)-ona) a partir do Lapachol.

### 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO (NOS) E O ÓXIDO NÍTRICO (NO).

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, com 11 elétrons na camada de valência e um desemparelhado o que lhe confere seu caráter radicalar e que o torna um agente químico altamente reativo (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

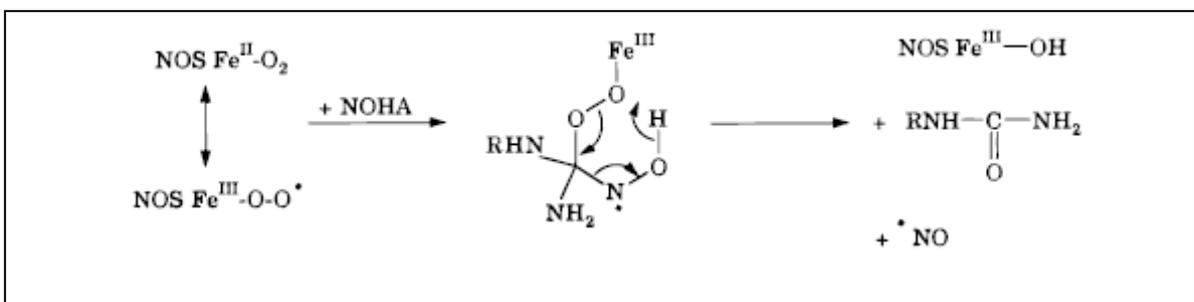
Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 3-10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica. Esta molécula tem revolucionado na neurologia, cardiologia, nefrologia e gastroenterologia. (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Na figura 3 podemos observar o esquema da síntese de NO a partir da L-arginina pela sintase do óxido nítrico (NOS) através de uma reação constituída de duas etapas (STUEHR et al., 1999) (**FIGURA 4**). A NOS catalisa a oxidação de cinco elétrons da L-arginina formando como produto NO e citrulina. Para que a reação ocorra são necessários co-substratos como oxigênio molecular e NAD(P)H. É necessário para que a reação ocorra à presença de tetrahydrobiopteridina ( $BH_4$ ) (WHITE & MARLETTA, 1992). O primeiro passo é específico e exclusivamente catalisado pelas isoformas da NOS (VETROVSKY et al., 2002), onde ocorre uma N-hidroxilação do grupo guanidino da L-arginina, formando a  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (L-NOHA) (STUEHR et al., 1991; KLATT et al., 1993). Na segunda etapa, L-NOHA é metabolizada em L-citrulina e NO.



**Figura 4:** Esquema da biosíntese do óxido nítrico (Fonte: Principles of Biochemistry 4th Edition - D.L. Nelson, Cox Le).

Estudos relatados na literatura mostram que diversas enzimas podem catalisar a segunda etapa da reação (clivagem oxidativa do grupamento C=NOH) de vários compostos não alfa aminoácidos, como também a L-NOHA, por exemplo as peroxidases (BOUCHER et al., 1992), isoformas da família citocromo “P450-like” e “P450-hepático”, chamadas de NO sintetases (BOUCHER et al., 1992), hemoglobina e catalase (VETROVSKY et al., 2002) (**Figura 5**). Isto resulta na formação de óxidos de nitrogênio estáveis, com a possível formação intermediária do NO (BOUCHER et al., 1992; JOUSSERANDOT et al., 1998; CARO et al., 2001).



**Figura 5:** Esquema do possível mecanismo do segundo passo da síntese de NO (Oxidação da NOHA para citrulina e NO) ( Fonte: JOUSSERANDOT et al., 1998).

Todas as isoformas da NOS são enzimas modulares. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. Quando intactas possui um domínio redutase C-terminal e são dependentes de O<sub>2</sub>, NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade.

Desde sua descoberta, diversos mecanismos nos quais está implicado foram caracterizados até os dias atuais, despertando um grande interesse na indústria farmacêutica de produzir compostos que interfiram nestes mecanismos. O interesse maior é o da oferta exógena de NO, principalmente, no tratamento de doenças cardiovasculares.

Estudos mostram que no sistema cardiovascular, o NO liberado pelo endotélio vascular desempenha uma função vasoprotetora, inibe a adesão e agregação plaquetária, além da adesão de leucócitos ao endotélio e controla a proliferação de células do músculo liso vascular regulando o fluxo sanguíneo e o controle do extravasamento tecidual, modulando assim o diâmetro e a resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular, através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta enzima catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico (GMPc), o qual atua ativando diversas proteínas-quinases (responsáveis por fosforilações de proteínas a partir de ATP). A inativação do GMPc ocorre através de sua hidrólise, catalisada por enzimas da família das fosfodiesterases (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; IGNARRO, L. J. et al., 2000; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; DANIEL & JAMES, 2005).

Uma alteração (diminuição ou excesso) nos níveis de NO endotelial pode ser a causa de vários processos fisiopatológicos, podendo ser observado com a diminuição dos níveis basais a hipertensão e hipercolesterolemia (PANZA, J.A et al, 1990) aterosclerose e trombose vascular, estenose, aterogênese (PANZA, J.A et al, 1990) diabetes, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência coronariana e infarto do miocárdio (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002) além de contribuir para a patogênese da síndrome aguda coronária (MOLLACE et al., 2005). Na superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias severas, sepse, choque circulatório ou até mesmo infarto (BARRETO et al., 1995).

Nos casos patológicos, onde há uma diminuição dos níveis basais de NO, tem havido nos últimos anos um grande ímpeto na descoberta de drogas que forneçam um aporte exógeno de NO. Os doadores de óxido nítrico representam uma classe de drogas heterogênea que exercem sua atividade através da liberação de NO para assim restabelecer os seus níveis basais, podem ser divididas de acordo com os caminhos bioquímicos tomados para a

formação do NO (enzimático ou não-enzimático, redutivo ou oxidativo) (BARRETO et al., 2005).

Existem diversas classes de compostos que têm potencial de se decompor e produzir espécies reativas de nitrogênio. Entre elas, podem-se citar os nitritos e nitratos orgânicos (dinitrato de isosorbida e nitroglicerina), complexos NO-metálicos (nitroprussiato de sódio), diazenolatos, N-nitrosaminas, S-nitrosotióis e N-hidroxi guanidinas (WANG et al., 2002). Contudo, todos apresentam limitações quanto à estabilidade, desenvolvimento de tolerância (no caso da nitroglicerina), toxicidade quando usando por mais de duas semanas (Nitroprussiato de sódio) ou liberação relativamente rápida de óxido nítrico (no caso da sidnoniminas ou dos S-nitrosotióis) (WANG et al., 2002).

Assim, além desses compostos considerados doadores “clássicos” de NO outros compostos contendo ligação do tipo C=NOH, podem provavelmente fornecer NO, como por exemplo, as N-hidroxi guanidinas (CLEMENT et al., 1993), oximas – amidoximas ou cetoximas (CARO et al., 2001) que, através de processos oxidativos, podem levar a formação de NO por vias independentes da NOS (CHALUPSKY et al., 2004).

#### **2.4 CANAIS PARA POTÁSSIO E O SEU PAPEL NO CONTROLE DO TÔNUS DO MÚSCULO LISO VASCULAR.**

Os canais para potássio podem ser conceituados como proteínas integrais de membrana presente tanto em células excitáveis quanto em células não excitáveis, desempenham um importante papel na regulação do potencial de membrana e na contratilidade do músculo liso vascular conduzindo seletivamente potássio e assim regulando o tônus vascular (TAMMARO et al., 2004; SHIEH et al., 2000).

Estes canais constituem uma família de proteínas homólogas e possui sítios de ligação para fármacos e neurotransmissores, além disso estão associadas a um sistema de sinalização celular de nucleotídeos cíclicos, como AMPc e GMPc, e proteínas cinases, como a PKG e PKA (HILLE, 1991).

No músculo vascular, foram identificadas a expressão funcional de várias diferentes classes de canais para potássio: canais sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca_2^+$  de grande condutância (BKCa), canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca_2^+$  de pequena condutância (SKCa), canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca_2^+$  de intermediária condutância (IKCa), canais de potássio sensíveis a voltagem (Kv) e canais para potássio retificadores de entrada (Kir) (JACKSON, 2000).

A ativação dos canais para potássio repolariza e/ou hiperpolariza as células musculares promovendo o fechamento dos canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ), inibindo o efeito contrátil. Por esta razão drogas que alteram direta ou indiretamente a função desses canais para potássio são eficientes vasodilatadoras e na terapêutica das doenças vasculares (COX, 2002).

Estudos relatados na literatura que mostram que o NO é solúvel na membrana lipídica celular e pode atuar indiretamente em vários alvos no meio citosólico, um dos efeitos vasculares mais relevantes do NO é a ativação da GCs. A ativação desta enzima promove o aumento intracelular do GMPc e este ativa direta ou indireta PKG-dependentes do GMPc, que poderão fosforilar e ativar vários sítios no meio citosólico incluindo os canais para potássio. Sabe-se também que o NO pode ativar por uma interação direta de muitas proteínas canais ou por uma modificação química interna do canal por S-nitrosilação e assim promover o acúmulo (formação de estoques-reserva) de NO nos vasos e tecidos vasculares (ALENCAR, et al., 2003; GARCIA, 2006).

## **2.5 PAPEL DAS ENZIMAS DO COMPLEXO MICROSSOMAL P-450, GLUTATIONA S-TRANSFERASE, PEROXIDASES E XANTINA OXIDASE.**

As enzimas P450 são também conhecidas como citocromo P450, constituem uma superfamília de proteínas heme-tioladas, são encontradas nas bactérias, fungos, plantas e animais (NEBERT et al., 1987). O citocromo P-450 pode ser definido como um grupo de proteínas que transferem elétrons e possuem um ou vários grupos heme em sua estrutura (KUO & DAFOE, 1995).

A especificidade do citocromo P-450 é determinada pela capacidade do substrato para se ligar no sítio ativo da enzima, pela capacidade de mudar o estado de equilíbrio do spin e assim promover a transferência do elétron para o ferro do grupo heme, e a medida que o ciclo catalítico completa-se ocorre sem o acoplamento do NADPH e utilização de oxigênio para oxidação do substrato (VOSS et al., 1997).

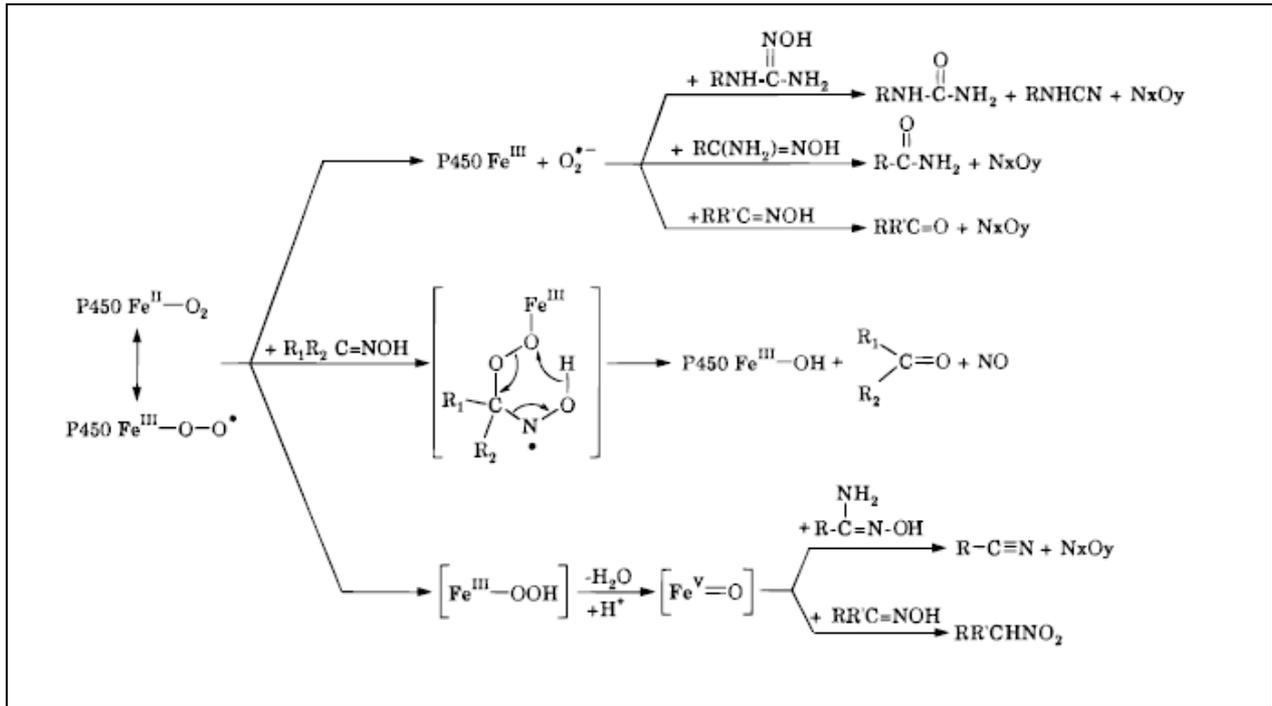
As enzimas hepáticas e extra-hepáticas do citocromo P-450 estão envolvidas na síntese de moléculas biologicamente ativas com importantes funções fisiológicas. Estas incluem a formação de metabólitos do ácido araquidônico, como por exemplo as ciclooxigenases, leucotrienos, entre outros, que regulam a pressão sanguínea e a síntese de prostaciclina e hormônios esteroides (EDWARD et al., 2001).

As enzimas NOS catalisam a formação de NO e citrulina a partir da L-arginina via o intermediário L-NOHA, e a química desta reação é típica das reações de monooxigenações do citocromo P-450, estudos mostram a presença de um grupo heme tiolato ligado (MARLETTA, 1994). As enzimas microsossomais do P-450 podem catalisar a formação de NO e citrulina a partir da L-NOHA mas não a partir da L-arginina (RANAUD, et al., 1993). Em outros estudos, foi sugerido que as enzimas do P-450 participam da formação fisiológica de NO durante a resposta inflamatória (KOU et al., 1995).

As monooxigenases que contém flavinas (FMOs) compreendem uma família genética de cinco enzimas (LAWTON et al., 2006) que estão envolvidas no metabolismo de numerosas drogas, pesticidas e outras substâncias químicas (ZIEGLER, 1993). As FMOs (FMO1 até a FMO5) através de oxidação nucleofílica de átomos como nitrogênio, fósforo e selênio de muitas estruturas químicas. Assim como o citocromo P-450, as FMO são localizadas primariamente no retículo endoplasmático, necessita de NADPH e oxigênio molecular para a sua atividade, são encontradas em todas as espécies de mamíferos aproximadamente em todos os tecidos (HALPERT et al., 1998).

## **2.6 POSSÍVEL MECANISMO DA CLIVAGEM OXIDATIVA DO GRUPAMENTO (C=NOH) PELO P450 E PELA NOS.**

Tanto a NOS e quanto a P450 3A são capazes de catalisar a oxidação da NOHA pelo NAD(P)H e O<sub>2</sub> para formar citrulina e NO. Entretanto, a superóxidodismutase (SOD) inibe a oxidação da NOHA dependente do P450 em grande extensão enquanto que a oxidação dependente da NOS da L-arginina para formar citrulina é levemente inibida (HOBBS et al., 1994). Estes dados podem ser facilmente entendidos se for admitido que tanto O<sub>2</sub><sup>-</sup> quanto o complexo Fe (III), Fe (III)-O-O<sup>·</sup>, são capazes de reagir com o grupamento C=N(OH). Compostos intermediários semelhantes podem ou não se ligar ao Fe (III), formando assim o NO e RR'C=O, e tanto OH<sup>-</sup> (ou H<sub>2</sub>O) no caso do O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou Fe(III)-OH (ou Fe (III)-H<sub>2</sub>O) no caso Fe(III)OO<sup>-</sup> (MANSUY et al., 1994).) **(Figura 6).**



**Figura 6:** Possíveis mecanismos para a clivagem oxidativa do grupamento C=N(OH) pelo P450 e NOSs. Para as reações do P450 que estão envolvidas Fe(V)=O, pode haver um possível envolvimento de N-hidroxi guanidinas, amidoximas, e ketoximas para a formação de uréia, amidas e cetonas ainda não foi mencionada (Figura retirada do artigo de MANSUY et al., 1994).

## 2.7 OXIMAS

A formação de NO e espécies de óxidos de nitrogênio a partir da oxidação microsomal dependente do P-450 de compostos que possuem o grupamento C=NOH já foi reportada no caso da pentamidina (CLEMENT & JUNG, 1994) amidoximas (LION et al., 1992) da NOHA (BOUCHER et al., 1992) e de várias N-hidroxi guanidinas (CLEMENT et al., 1993).

Relatos descritos na literatura mostram que muitos compostos contendo o grupamento C=NOH (aldoximas, ketoximas, amidoximas e N-hidroxi guanidinas) são oxidadas pelo citocromo microsomal hepático P450 com a formação de produtos orgânicos correspondentes contendo a função C=O e óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) (JOUSSERANDOT et al., 1995). Por exemplo, 4-hexiloxibenzamidoxime é transformada para 4-hexyloxybenzamide por uma oxidação dependente do P-450 do grupamento C=NOH (JOUSSERANDOT, et al., 1995).

Em um trabalho recente, Chalupsky et al (2004) demonstraram que a formaldoxima leva a formação de NO (detectada por ressonância paramagnética eletrônica, e inibido por PTIO, ODQ ou Rp-Bromo-cGMPS) por um mecanismo sensível ao 7-etoxiresorufin, um inibidor de redutases dependentes de NADPH, contudo resistente a inibidores da NOS (L-NNA e L-NAME) e do citocromo P-450 (proadifen).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pela oxima derivada do lapachol, 3-hidroxi-4-(hidroxiimino)-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona codificada como oxima S1, a partir de técnicas *in vivo* e *in vitro*, procurando elucidar os mecanismos de ação envolvidos nas respostas observadas.

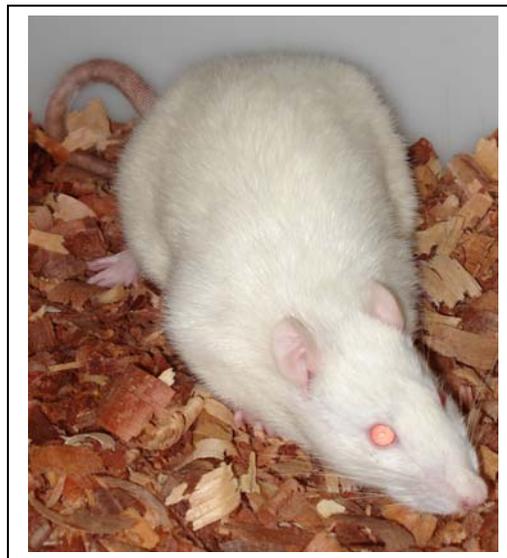
#### 3.2. Específicos

- **Testes *in vivo***
  - Caracterizar os efeitos da oxima derivada do lapachol (S1) sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e não anestesiados.
  
- **Testes *in vitro***
  - Caracterizar o efeito vasodilatador da oxima derivada do lapachol (S1) em aorta torácica isolada de rato avaliando;
  - Papel do endotélio e seus mediadores nos efeitos vasculares da oxima;
  - A participação do óxido nítrico (NO) na resposta vasorelaxante;
  - Papel dos canais para potássio no efeito relaxante da oxima S1.

## 4. MATERIAL

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) (**Figura 7**), machos, pesando entre 250-300 gramas, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do núcleo de pesquisas Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Estes animais foram mantidos sob condições controladas e adequadas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C), submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas tendo estes, livre acesso à água e a alimentação. Todos os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação no (Comitê de ética e Pesquisa de animais) CEPA/LTF.



**Figura 7:** Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

## 4.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas:

**Quadro 1:** Relação das drogas utilizadas nos experimentos.

<b>Drogas</b>	<b>Laboratório</b>
Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN)	Sigma
Cloridrato de acetilcolina (Ach)	Sigma
Sulfato de atropina	Sigma
Brometo de tetraetilamônio (TEA)	Sigma
N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME)	Sigma
Indometacina (1-[p-clorobenzil]-5metoxi-2metilindole-3-ac.acético)	Sigma
Hidroxocobalamina (HDX)	BUNKER
Dimetiç Sulfoxido (DMSO)	Sigma
Cloreto de Bário (BaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Glibenclamida (GLIB)	Sigma
4- Aminopiridina (4-AP)	Sigma
Caribdotoxina (ChTX)	Sigma

Todas as soluções foram mantidas a -20°C. Quando necessário, as drogas foram diluídas em água destilada (experimentos *in vitro*) ou em solução salina (experimentos *in vivo*) para concentrações desejadas. Foi utilizado cremofor para diluição da oxima derivada do lapachol (S1).

## 4.3 SOLUÇÕES NUTRITIVAS UTILIZADAS

As soluções nutritivas que foram utilizadas nas técnicas *in vitro* foram preparadas utilizando os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (todos da MERCK), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Vetec), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (Vetec). As tabelas a seguir mostram as composições das soluções nutritivas:

**Tabela 1:** Composição da solução normal de Krebs Henseleit (KHS).

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	118,0
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,7
KCl	4,5
glicose	11,0

**Tabela 2:** Composição da solução KHS despolarizante com 30 mM de potássio (KCl 30).

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	92,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,7
KCl	30,0
glicose	11,0

**Tabela 3:** Composição da solução tyrode despolarizante com 80 mM de potássio (KCl 80).

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	42,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,7
KCl	80,0
glicose	11,0

## 5. MÉTODOS

### 5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Foram utilizadas duas formas de abordagem: uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros normotensos não anestesiados para medida direta da pressão arterial, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando órgãos isolados, com a finalidade de detalhar o mecanismo de ação da oxima S1.

#### 5.1.1 Ensaios farmacológicos para estudos *in vivo*.

##### 5.1.1.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados.

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/Kg, i.p.) e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (scapulae).

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foi medida 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA) conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS 16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) e com programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para administração das drogas.

### 5.1.1.2 Protocolo experimental para o estudo *in vivo*.

Para a realização desses experimentos foram utilizados ratos normotensos. Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 minutos., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (10 µg/kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 minutos, doses randômicas (; 1; 5; 15 e 30 mg/kg) da oxima S1 foi administradas com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornem aos seus valores de linha de base. Os valores da PAM e FC máxima foram computados antes (valores da linha de base). Imediatamente após a administração das substâncias e suas variações foram expressas em valores absolutos para cada dose a partir da seguinte fórmula:

$$\Delta = PA_{\text{depois}} - PA_{\text{antes}}$$

Onde:

$\Delta$  = Variação dos valores de pressão arterial

$PA_{\text{depois}}$  = Valores de PA depois da administração das drogas

$PA_{\text{antes}}$  = Valores de PA antes da administração das drogas

### 5.1.2 Ensaios farmacológicos para estudos “*In Vitro*”.

#### 5.1.2.1 Preparações dos anéis de aorta torácica de rato.

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida de secção dos vasos cervicais. Após uma incisão tóraco-abdominal seguindo a linha alba, a porção torácica proximal da aorta foi isolada, dessecada de tecidos adjacentes e seccionada em anéis de 2 –4 mm, que foram mantidos em cubas de 10 mL, contendo KHS, pH 7,4 a 37 °C aerados com uma mistura carbogênica de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> e montados em hastes de aço inoxidável inseridas no lúmen da artéria para produzir tensão, sendo uma das hastes fixada em um suporte e a haste maior conectada a um transdutor de tensão (7003 UGO Basile), o qual foi conectado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota-USA) para o registro das contrações isométricas, sob uma tensão inicial de 2 g por um período de 60 minutos.

Durante este tempo de equilíbrio, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA e ALTURA, 1970). Para obtenção de anéis sem endotélio, foi 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. Após o período de estabilização foram induzidas duas contrações uma com uma solução despolarizante de KCl 80 mM e outra com fenilefrina FEN (0,1 $\mu$ M), durante o componente tônico, 12 a 15 minutos da segunda resposta, foi adicionado 0,1 $\mu$ M de acetilcolina a todas as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentarem relaxamento igual ou superior a 80 %. Quando o relaxamento era inferior a 10 %, os anéis foram considerados sem endotélio funcional. Após a lavagem, esperou-se 30 minutos, e durante o componente tônico de uma terceira resposta ao agonista, a oxima S1 foi adicionada, de maneira cumulativa à cuba.

#### **5.1.2.2 Protocolos experimentais para preparações *In vitro* utilizando anéis de aorta torácica isolada de rato.**

##### **a) Efeito da oxima S1 sobre as contrações induzidas por FEN (0,1 $\mu$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional.**

Nestes experimentos, após um período de estabilização de 60 minutos, concentrações crescentes da oxima S1 (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup>M) foram adicionadas em preparações na presença de endotélio ou em anéis desprovidos de endotélio, ambos pré-contraídos com fenilefrina (FEN). Anéis sem endotélio foram obtidos como descrito anteriormente nos protocolos gerais. As respostas obtidas na ausência do endotélio foram comparadas com àquelas obtidas em condições onde o endotélio funcional se fazia presente nas preparações. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN. Os valores da concentração das substâncias que produz 50 % de seu efeito máximo (CE<sub>50</sub>) foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para a substância em anéis com e sem endotélio funcional.

**b) Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.**

A influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorelaxante induzido pela oxima S1 foi avaliada em experimentos realizados na presença ou na ausência de um antagonista não seletivo destes receptores muscarínicos, a atropina (1nM) (RATTMANN et al., 2006; SHIRAKI et al., 2001). As respostas induzidas pela oxima antes e depois da incubação com atropina foram estimadas. Os valores individuais de  $CE_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente.

**c) Avaliação da participação da via dos metabólitos derivados da ciclooxigenase (Indometacina) na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.**

Para avaliar a influência de alguns metabólitos do ácido araquidônico no efeito da oxima S1, indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor não seletivo ciclooxigenase (COX) (ANGELIS et al., 2004) foi incubada por 30 minutos. Na seqüência obteve-se uma contração induzida pela FEN (0,1  $\mu$ M), na fase tônica da qual foi feita a adição cumulativa da oxima S1 ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M). As respostas induzidas pela oxima antes e após a incubação com indometacina foram estimadas. Os valores individuais de  $CE_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente.

**d) Avaliação do efeito da inibição da síntese do NO (L-NAME) sobre a resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.**

Para avaliar a participação da produção endógena do óxido nítrico no efeito da oxima S1, foi utilizado o L-NAME (300 $\mu$ M) um antagonista competitivo da NOS (MONCADA e HIGGS, 1993), sendo este adicionado às cubas contendo anéis de aorta com endotélio intacto, ficando incubado por 30 minutos. Na seqüência obteve-se uma contração induzida pela FEN (0,1 $\mu$ M), na fase tônica da qual foi feita a adição cumulativa da oxima S1. As respostas induzidas pela oxima antes e após a incubação com L-NAME foram estimadas. Os valores individuais de  $CE_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente.

**e) Avaliação da participação da via L-arginina-NO-GMPc na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.**

Para avaliar a participação da via L-arginina-NO-GMPc sobre o efeito vasorelaxante induzido pela oxima S1 utilizou-se a preparação de anéis arteriais, sem endotélio funcional, na presença ou ausência do sequestrador de NO, a hidroxocobalamina 30  $\mu\text{M}$ , ou de um inibidor não seletivo da ciclase de guanilil solúvel, azul de metileno 10  $\mu\text{M}$  (KANG et al., 2005). As respostas induzidas pela oxima antes e após a incubação com cada inibidor foram estimadas. Os valores individuais de  $\text{CE}_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente.

**f) Avaliação da atividade da oxima S1 sobre contrações induzidas por KCl em aorta.**

A aorta foi montada como descrito anteriormente no item 5.1.2.1, período de estabilização, em anéis com e sem endotélio funcional, duas curvas similares concentrações-resposta simples foram obtidas por substituição da solução de Krebs pela solução isosmótica de KCl 30 ou 80 mM e durante o componente tônico da segunda resposta, S1 foi adicionada cumulativamente à cuba. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo KCl 30 mM ou 80 mM. Os valores de  $\text{CE}_{50}$  foram calculados e comparados entre si.

**g) Avaliação dos canais para potássio envolvidos no relaxamento induzido pela oxima S1 em anéis de aorta.**

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito anteriormente, as preparações foram incubadas com tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ) um bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (QIU & QUILLEY, 2001), na presença de 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis a voltagem ( $\text{K}_v$ ) (TIRAPELLI et al., 2004), na presença de 1  $\mu\text{M}$  de Glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio ativados pelo ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) (KANG et al., 2005) e na presença de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{BaCl}_2$ , um bloqueador dos canais para potássio retificadores de entrada ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) (GARDENER et al., 2004). Após 30 minutos foi induzido uma nova contração tônica com FEN (0,1 $\mu\text{M}$ ) e em seguida a curva concentração-resposta para a oxima S1 foi obtida. As respostas obtidas após a adição dos bloqueadores foram comparadas com a resposta obtidas na ausência do mesmo (controle).

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média de “n” experimentos  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e dois parâmetros farmacológicos foram analisados:  $E_{Máx}$  (Efeito máximo promovido pela droga) e  $CE_{50}$  (Concentração capaz de promover 50% do efeito máximo promovido pela droga estudada).

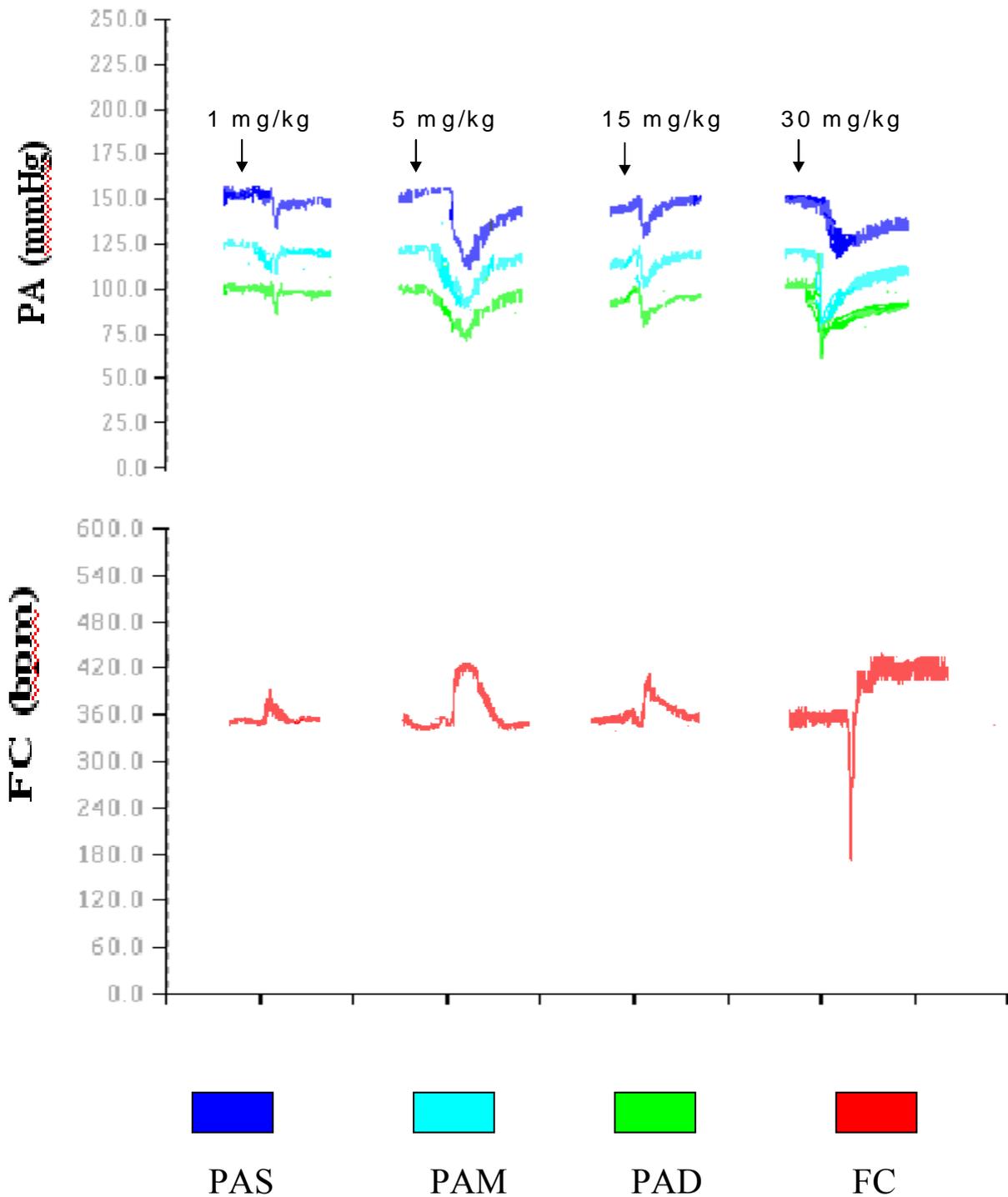
Os dados concentração-resposta foram analisados por regressão não linear, de onde foram obtidos os valores de  $CE_{50}$  e  $E_{Máx}$  (MOTULSKY, H., 1995). As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste “t” de student (pareado e não-pareado), este procedimento comparou as médias de dois grupos de casos, e pela análise de variância ANOVA “One Way” seguida do pós-teste de Bonferroni para amostras pareadas e não pareadas para avaliar a significância das diferenças das médias, quando o número de casos for superior a dois. Os dados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todos dados foram analisados através do programa estatístico Graph Pad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

## 7. RESULTADOS

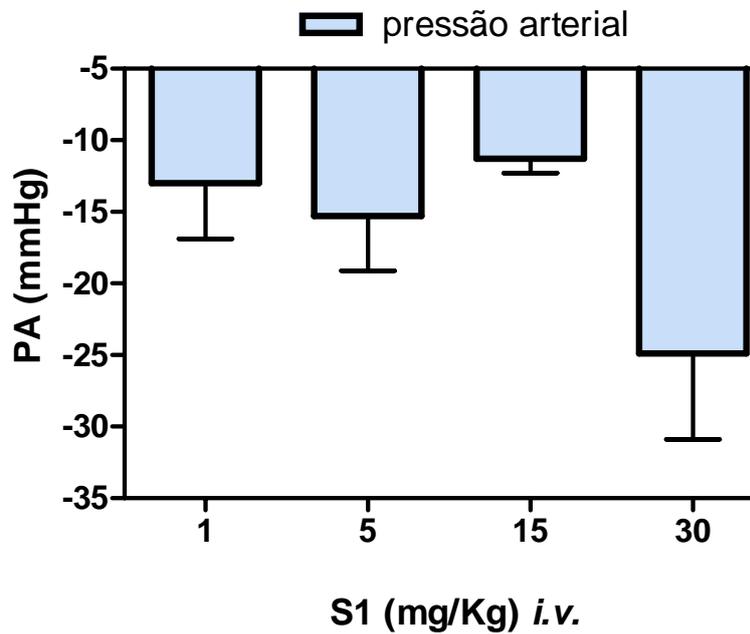
### 7.1 Ensaio Farmacológicos *in vivo*.

#### 7.1.1 Efeitos da oxima S1 sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos e não-anestesiados.

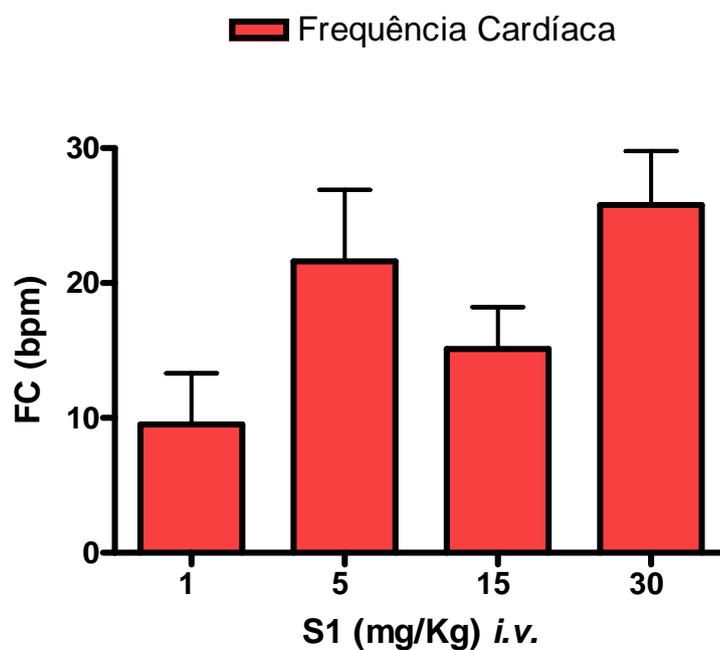
Durante a realização dos procedimentos experimentais, os valores basais de PAM e FC apresentados pelos animais antes da administração da oxima S1 foram respectivamente em torno de  $115 \pm 1$  mmHg e  $370 \pm 5$  bpm . Após a administração da oxima S1 (1; 5 ; 15 e 30 mg. Kg<sup>-1</sup>,i.v) observou-se uma hipotensão associada a um aumento na frequência cardíaca de maneira independente das doses (n=5). O efeito máximo para cada dose administrada foi alcançado em média, após o período de 5 segundos, com duração em torno de 20 segundos (**Gráficos 1, 2 e 3**).



**Gráfico 1:** Efeitos da oxima S1 sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados (n=5) mostrados em registros originais. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM.



**Gráfico 2:** Efeito da oxima S1 sobre a pressão arterial média em ratos normotensos não anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média ± EPM.



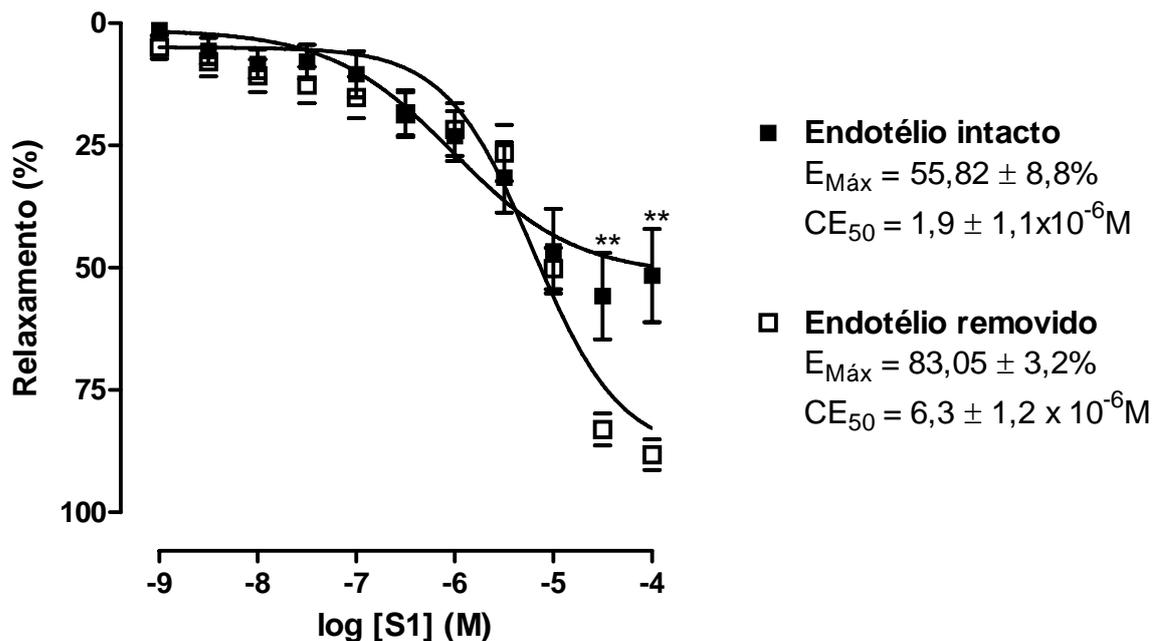
**Gráfico 3:** Efeito da oxima S1 sobre a frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média ± EPM.

## 7.2 Ensaios Farmacológicos *in vitro*.

### 7.2.1 Estudos com anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso.

#### 7.2.1.1 Efeito da oxima S1 sobre as contrações induzidas por FEN (0,1 $\mu$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional.

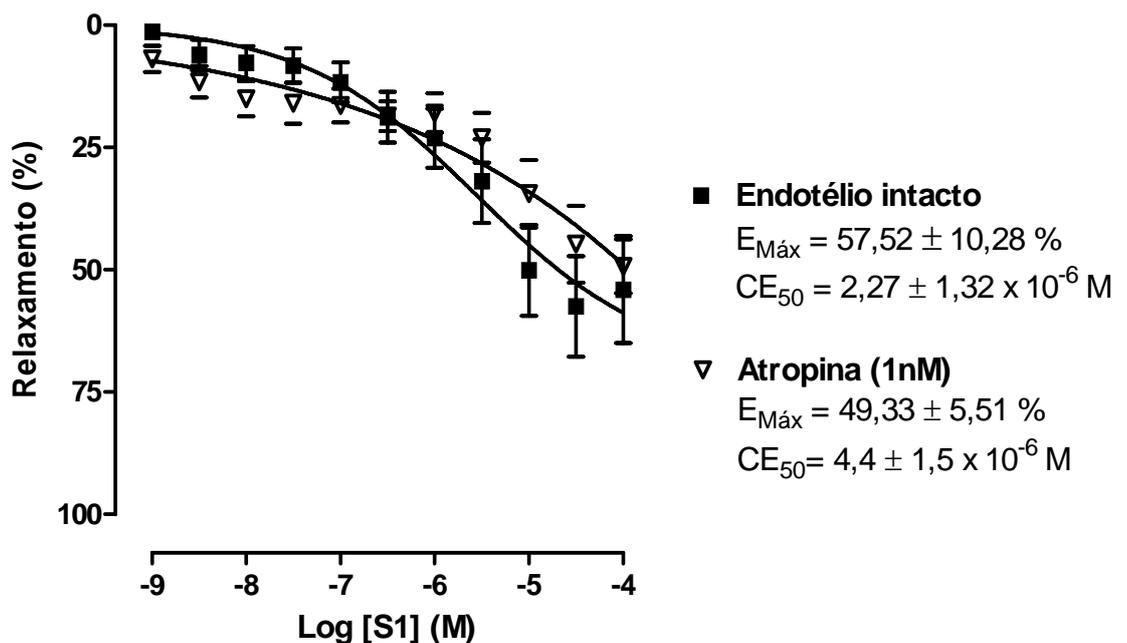
O relaxamento induzido por S1, ocorreu de maneira dependente de concentração, em anéis de aorta torácica superior isolada de rato, pré-contraídos com 0,1 $\mu$ M de FEN, com endotélio intacto ( $E_{m\acute{a}x} = 55,82 \pm 8,8 \%$ ,  $CE_{50} = 1,9 \pm 1,1 \times 10^{-6}M$ ,  $n=6$ ). Na ausência do endotélio funcional este efeito foi aumentado significativamente ( $E_{m\acute{a}x} = 83,05 \pm 3,2 \%$ ,  $CE_{50} = 6,3 \pm 1,2 \times 10^{-6}M$ ,  $n=6$ ) (**Gráfico 4**). O tempo necessário para que fossem observadas as respostas máximas para cada concentração de S1 variou de 6 a 10 minutos.



**Gráfico 4:** Efeito de concentrações crescentes de S1 ( $10^{-9} - 10^{-4}M$ ) em anéis de aorta torácica de isolada de rato, com endotélio intacto ( $n=6$ ) ou na ausência do endotélio funcional ( $n=6$ ), pré-contraídos com 0,1  $\mu$ M de FEN. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.2 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.

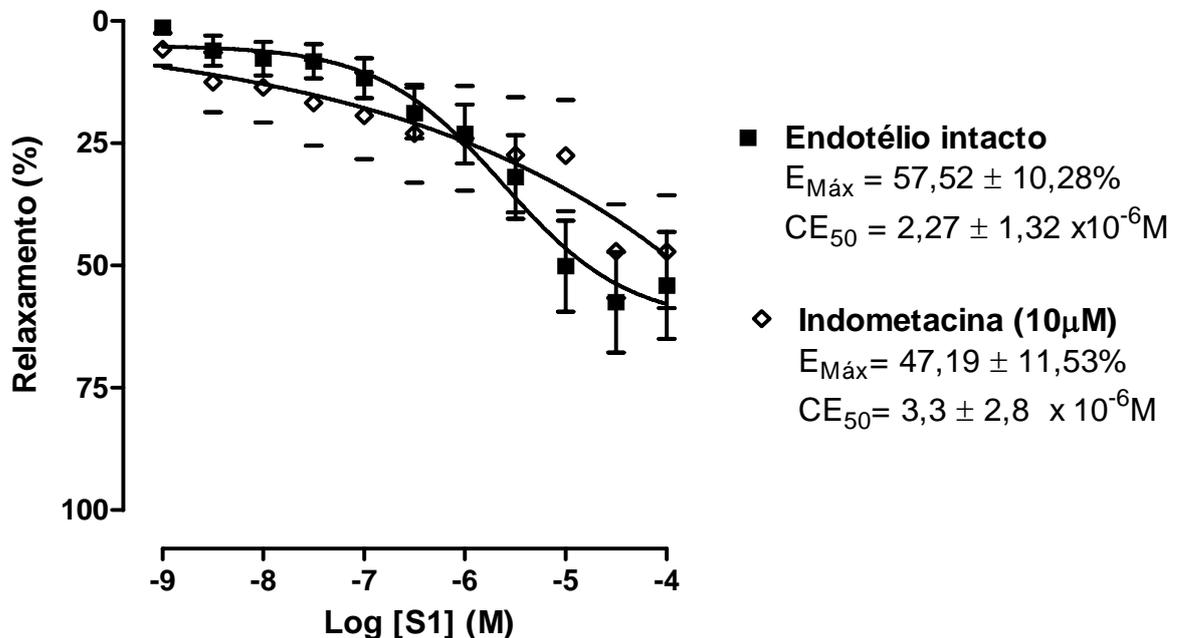
Na presença de atropina (1nM), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (RATTMANN et al., 2006; SHIRAKI et al., 2001), as respostas relaxantes induzidas por contrações crescentes da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M), em anéis de aorta torácica isolada de rato, com endotélio intacto e pré-contraídos com 0,1  $\mu$ M de FEN, não foram alteradas significativamente, assim como não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os valores de  $E_{M\acute{a}x}$  e  $CE_{50}$  ( $E_{M\acute{a}x} = 57,52 \pm 10,28 \%$  ;  $CE_{50} = 2,27 \pm 1,32 \times 10^{-6}$  M , endotélio intacto); ( $E_{M\acute{a}x} = 49,33 \pm 5,51 \%$ ;  $CE_{50} = 4,4 \pm 1,5 \times 10^{-6}$  M, atropina) (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M) na ausência (Endotélio intacto, n=6) e presença de atropina 1nM (n=6). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.3 Avaliação da participação da via dos metabólitos derivados da ciclooxigenase na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.

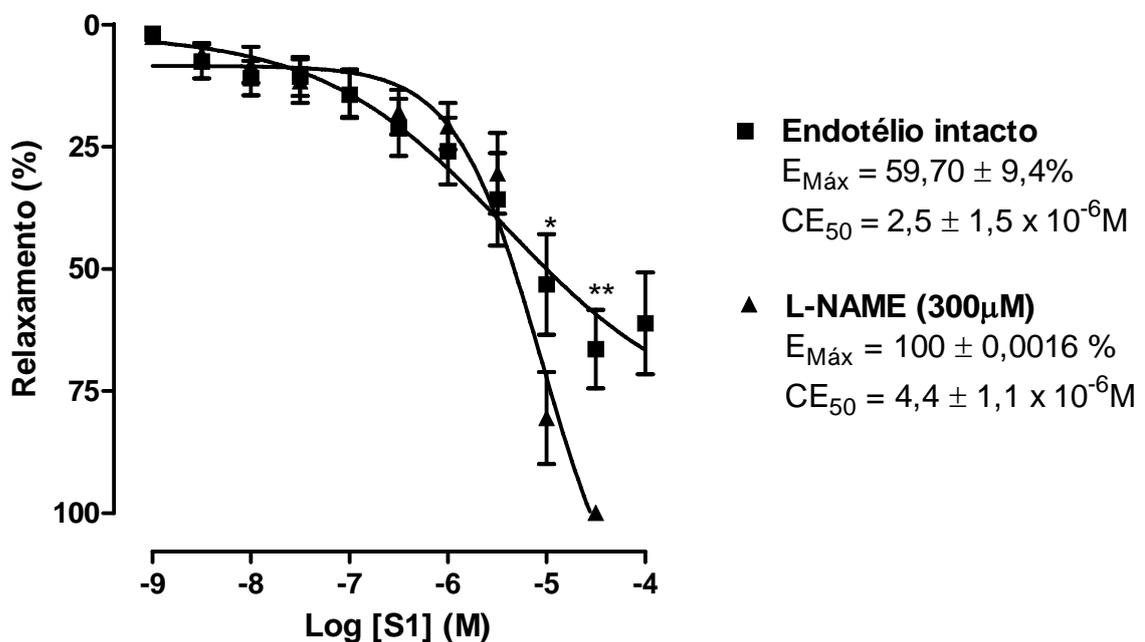
Na presença de indometacina (10 $\mu$ M), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase (ANGELIS et al., 2004), a curva concentração resposta para oxima S1 (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-4</sup>M), em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M), não foram alteradas significativamente, assim como não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os valores de E<sub>Máx</sub> e CE<sub>50</sub> (E<sub>Máx</sub> = 57,52  $\pm$  10,28% CE<sub>50</sub> = 2,27  $\pm$  1,32 x 10<sup>-6</sup> M, (endotélio intacto) (E<sub>Máx</sub>= 47,19  $\pm$  11,53%; CE<sub>50</sub>= 3,3  $\pm$  2,8 x 10<sup>-6</sup> M, indometacina) (Gráfico 6).



**Gráfico 6:** Curvas concentração-resposta dos efeitos vasorelaxantes da oxima S1(10<sup>-9</sup> – 10<sup>-4</sup>M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M) na ausência (Endotélio intacto, n=6) ou presença de indometacina (10 $\mu$ M, n=6). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.4 Avaliação da influência do L-NAME sobre a resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio funcional.

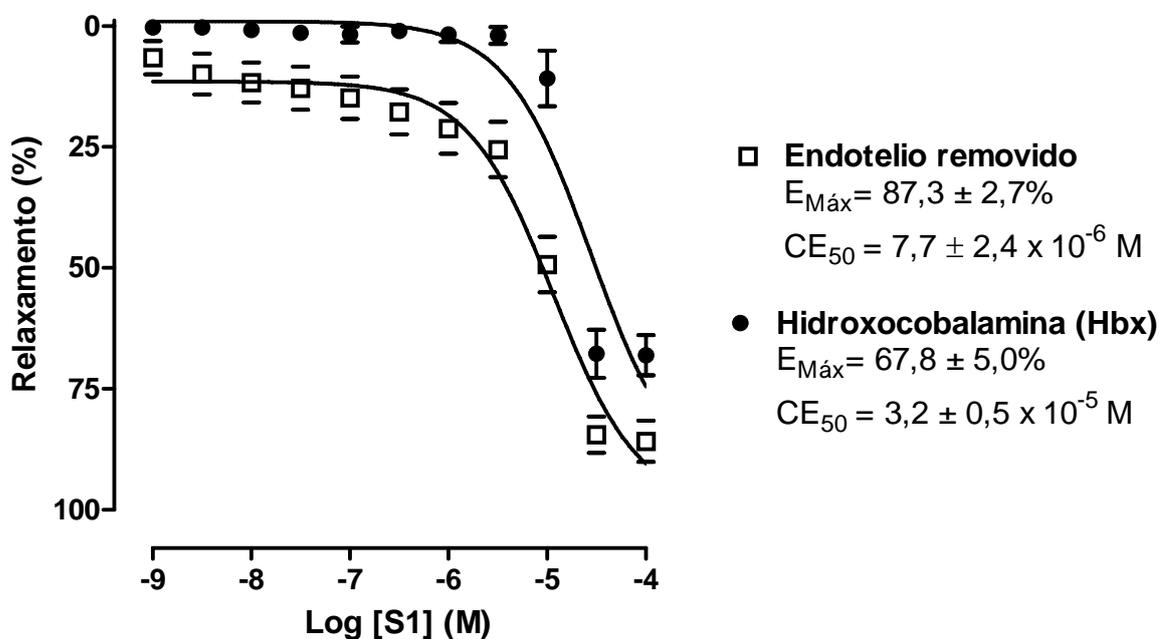
Na presença de L-NAME (300  $\mu$ M), um antagonista competitivo da NOS (MONCADA & HIGGS, 1999), as respostas relaxantes induzidas pelas concentrações crescentes da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio funcional e pré-contraídos com 0,1 $\mu$ M de FEN foram potencializadas. ( $E_{M\acute{a}x} = 59,70 \pm 9,4\%$ ;  $CE_{50} = 2,5 \pm 1,5 \times 10^{-6}$ M, endotélio intacto) ( $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0,006\%$ ;  $EC_{50} = 4,4 \pm 1,1 \times 10^{-6}$ M). A curva foi deslocada para esquerda com aumento do efeito máximo (**Gráfico 7**).



**Gráfico 7:** Curvas concentração-resposta da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto pré-contraídos com FEN 0,1 $\mu$ M (n=6) e na presença de L-NAME 300  $\mu$ M (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.5 Avaliação do efeito NO na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica de rato na presença de Hidroxocobalamina (30 $\mu\text{M}$ ).

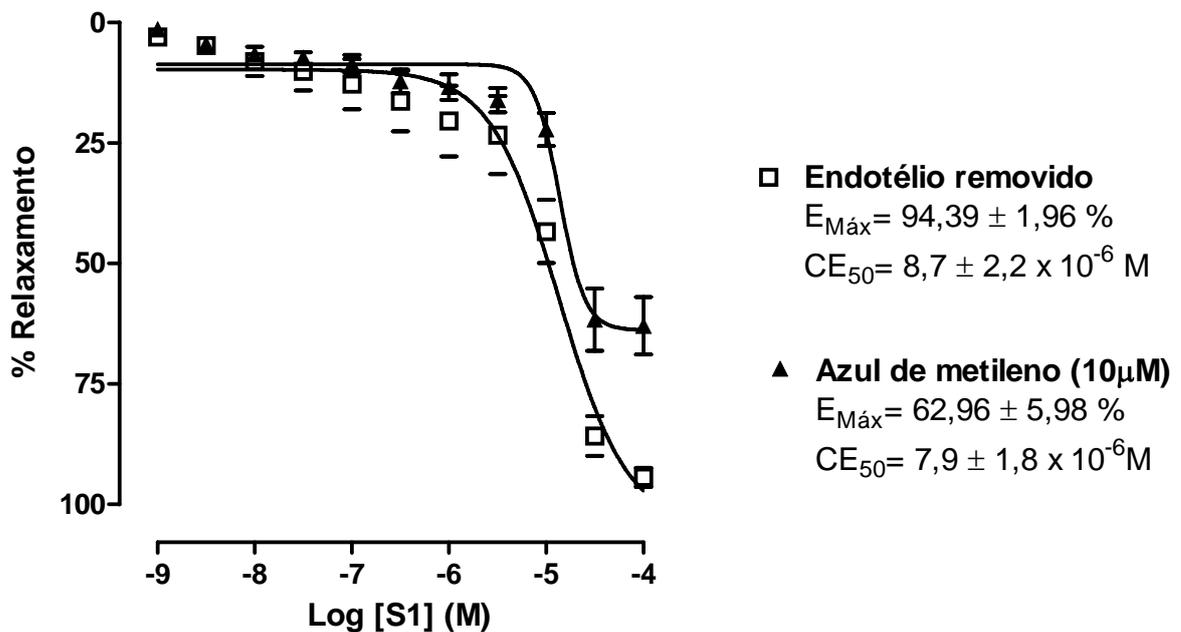
Na presença de hidroxocobalamina (30 $\mu\text{M}$ ), um sequestrador não permeável celular do NO (BROUWER et al., 1996), as respostas relaxantes induzidas pela oxima S1 ( $10^{-9}$ – $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu\text{M}$ ) foram atenuadas significativamente, apresentando um deslocamento da curva para direita com diminuição tanto do  $E_{\text{Máx}}$  quanto da  $CE_{50}$  ( $E_{\text{Máx}} = 87,3 \pm 2,7\%$ ;  $CE_{50} = 7,7 \pm 2,4 \times 10^{-6}$ M, endotélio removido) ( $E_{\text{Máx}} = 67,8 \pm 5,0\%$   $CE_{50} = 3,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$  M, Hidroxocobalamina) (Gráfico 8).



**Gráfico 8:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu\text{M}$ ) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de hidroxocobalamina 30  $\mu\text{M}$  (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.6 Influência da via NO-GMPc na resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1.

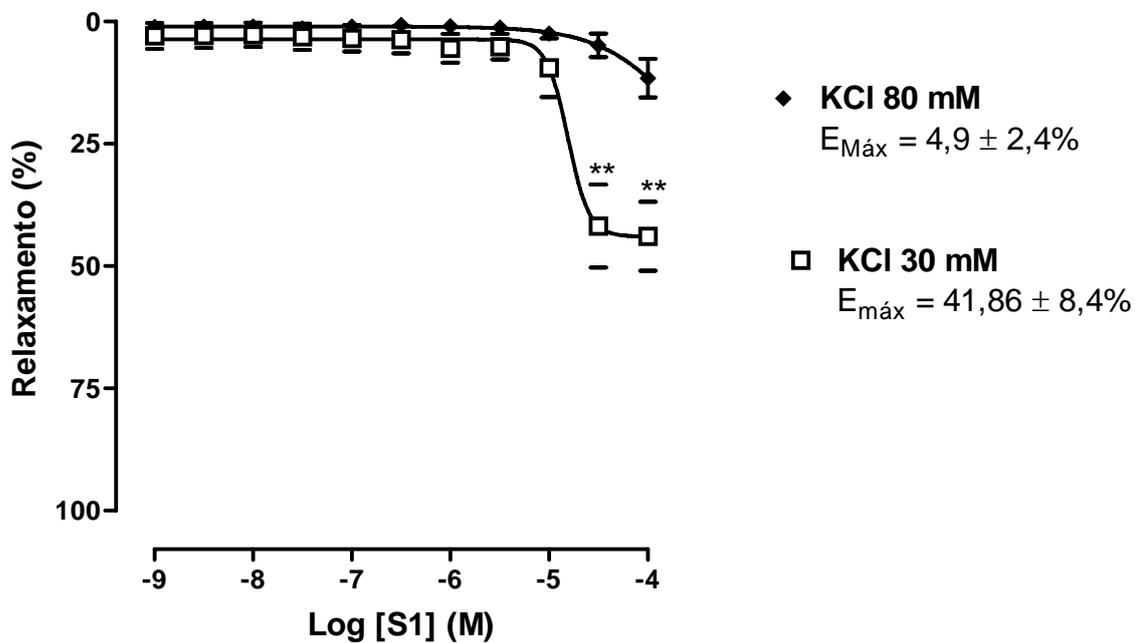
Na presença do azul de metileno (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da ciclase de guanilil solúvel (KANG et al., 2005), as respostas vasorelaxantes induzidas por concentrações crescentes da oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis sem endotélio de aorta torácica isolada de rato e pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu\text{M}$ ) foi atenuado significativamente, apresentando um deslocamento da curva para direita e com uma diminuição do efeito máximo (**Gráfico 9**).



**Gráfico 9:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu\text{M}$ ) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de azul de metileno 10  $\mu\text{M}$  (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.7 Avaliação do efeito relaxante da oxima S1 sobre as contrações induzidas por uma solução despolarizante de KCl (30 e 80 mM) em anéis de aorta torácica isolada de rato.

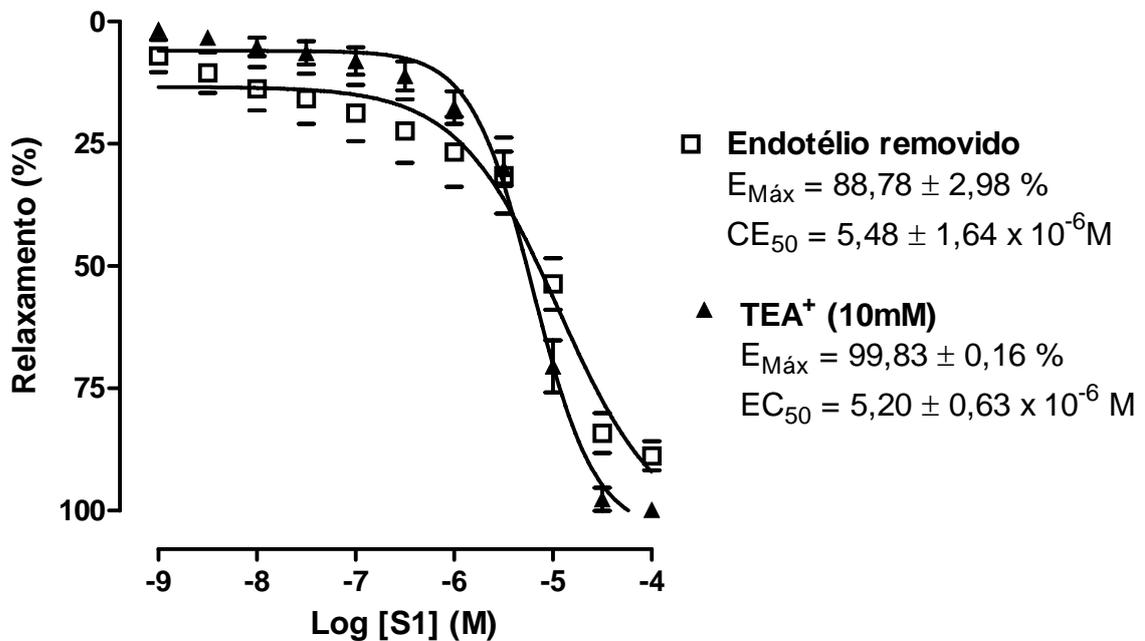
Em anéis de aorta sem endotélio funcional, a oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) promoveu um efeito vasorelaxante significativo e de maneira dependente de concentração, nas contrações induzidas pelo KCl 30 mM (Baixo Potássio) ( $E_{\text{máx}} = 41,86 \pm 8,4\%$ ) enquanto que na presença de KCl 80 mM (Alto Potássio) esse efeito relaxante foi quase totalmente abolido ( $E_{\text{máx}} = 4,9 \pm 2,4\%$ ) (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Efeito relaxante induzido por S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica de rato, na ausência de endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 30mM ou 80 mM.

### 7.2.1.8 Identificação dos canais para $K^+$ na resposta relaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica superior isolada de rato.

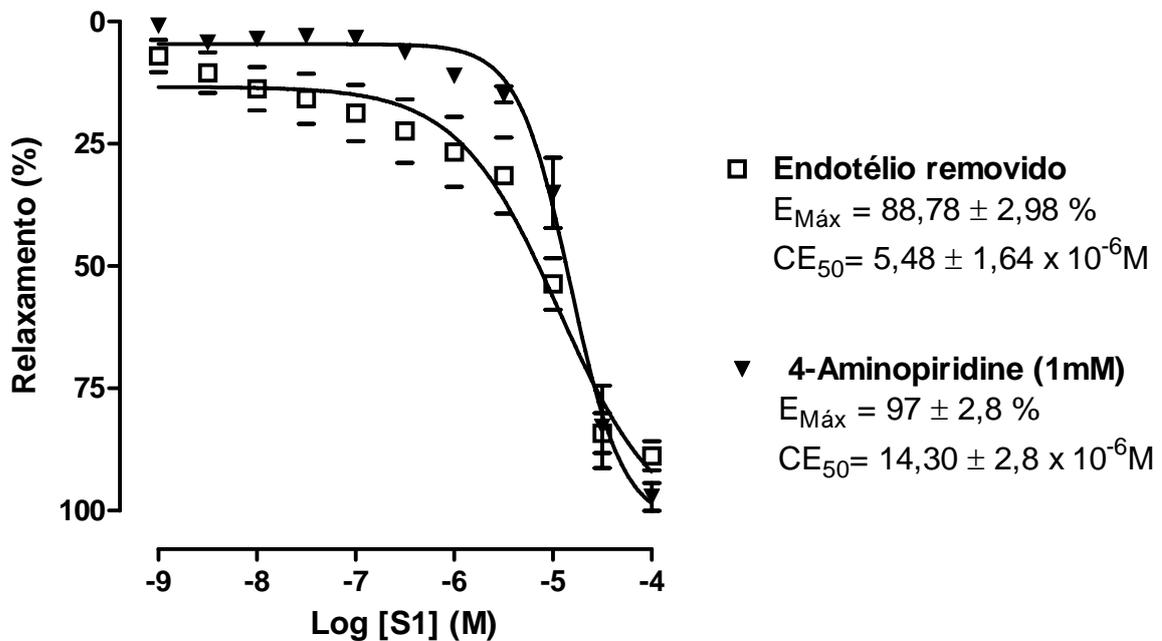
Em anéis de aorta sem endotélio funcional, na presença de 10 mM de tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) um bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (QIU & QUILLEY, 2001), a oxima S1 ( $10^{-9} - 10^{-4}$  M) promoveu um efeito vasorelaxante significativo e de maneira dependente de concentração, deslocando inicialmente a curva para a direita com conseqüente aumento da  $CE_{50}$  e posterior relaxamento com também um aumento do  $E_{Máx}$  quando comparado aos anéis de aorta sem endotélio funcional ( $E_{Máx} = 99,83 \pm 0,16$  %;  $CE_{50} = 5,20 \pm 0,63 \times 10^{-6}$  M) e ( $E_{Máx} = 88,78 \pm 2,98$  %;  $CE_{50} = 5,48 \pm 1,64 \times 10^{-6}$  M,  $TEA^+$ ) (**Gráfico 11**).



**Gráfico 11:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9} - 10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contráidos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença de  $TEA^+$  (10 mM) (n=6). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.9 Efeito do 4-aminopiridina (4-AP) nos canais para $K^+$ sensíveis a voltagem ( $K_v$ ) sobre a resposta relaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica superior isolada de rato.

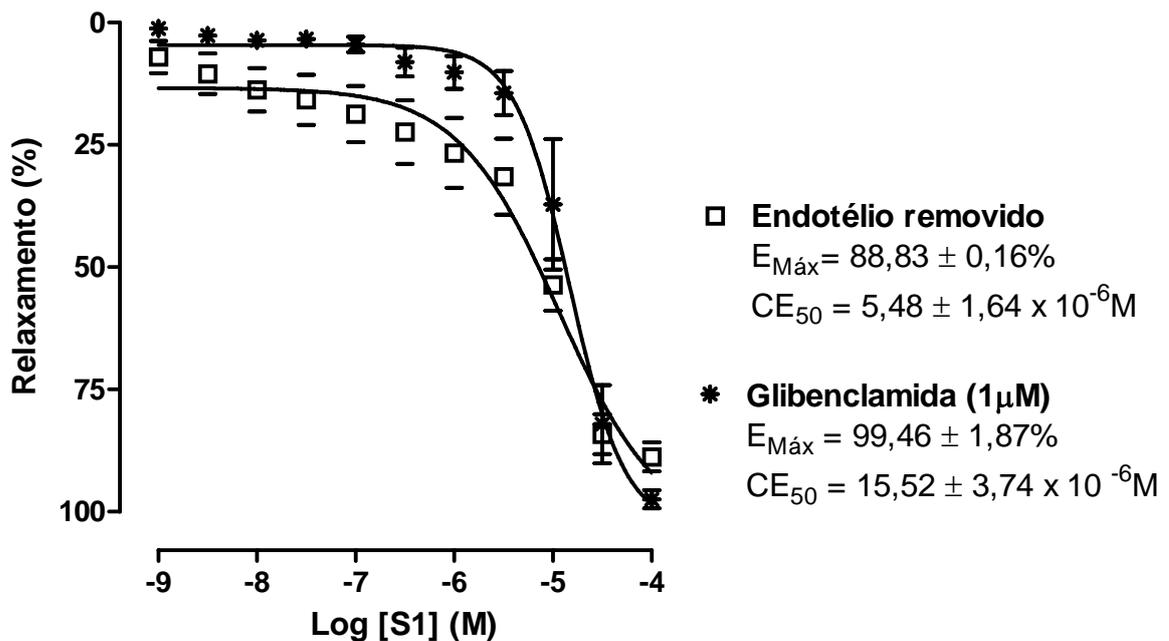
Em anéis de aorta sem endotélio funcional, na presença de 1 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis a voltagem ( $K_v$ ) (TIRAPELLI et al., 2004), a oxima S1 ( $10^{-9} - 10^{-4}$  M) promoveu um efeito vasorelaxante significativo e de maneira dependente de concentração, deslocando inicialmente a curva para a direita com conseqüente aumento da  $CE_{50}$  e posterior relaxamento com um aumento do  $E_{Máx}$  quando comparado aos anéis de aorta sem endotélio funcional ( $E_{Máx} = 99,83 \pm 0,16$  %;  $CE_{50} = 5,20 \pm 0,63 \times 10^{-6}$  M, endotélio removido) e ( $E_{Máx} = 97 \pm 2,8$  %;  $CE_{50} = 14,30 \pm 2,8 \times 10^{-6}$  M, 4-AP) (Gráfico 12).



**Gráfico 12:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9} - 10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ) na ausência de endotélio ( $n=6$ ) e na presença de 4-AP ( $1 \text{ mM}$ ) ( $n = 6$ ). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.10 Efeito da Glibenclamida (Gliben) nos canais para $K^+$ sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) sobre a resposta relaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica superior isolada de rato.

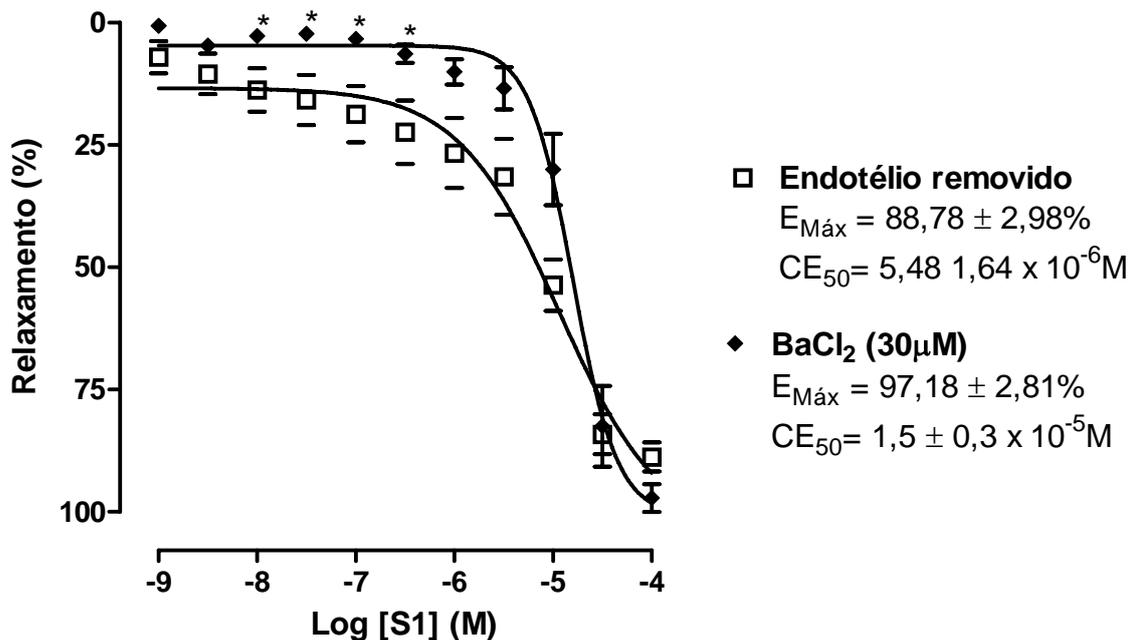
Em anéis de aorta sem endotélio funcional, na presença de  $1 \mu\text{M}$  de Gliben, um bloqueador dos canais para potássio ativados pelo ATP ( $K_{ATP}$ ) (KANG et al., 2005), a oxima S1 ( $10^{-9} - 10^{-4} \text{M}$ ) promoveu um efeito vasorelaxante significativo e de maneira dependente de concentração, deslocando inicialmente a curva para a direita com conseqüente aumento da  $CE_{50}$  e posterior relaxamento com um aumento do  $E_{Máx}$  quando comparado aos anéis de aorta sem endotélio funcional ( $E_{Máx} = 88,83 \pm 0,16\%$ ;  $CE_{50} = 5,48 \pm 1,64 \times 10^{-6} \text{M}$ , endotélio removido) e ( $E_{Máx} = 99,46 \pm 0,16\%$ ;  $CE_{50} = 15,52 \pm 3,74 \times 10^{-6} \text{M}$  (Glibenclamida)(Gráfico 13).



**Gráfico 13:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9} - 10^{-4} \text{M}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ) na ausência de endotélio ( $n=6$ ) e na presença de Gliben ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.11 Efeito do Cloreto de Bário ( $\text{BaCl}_2$ ) nos canais para $\text{K}^+$ retificadores de entrada ( $\text{K}_{ir}$ ) sobre a resposta relaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica superior isolada de rato.

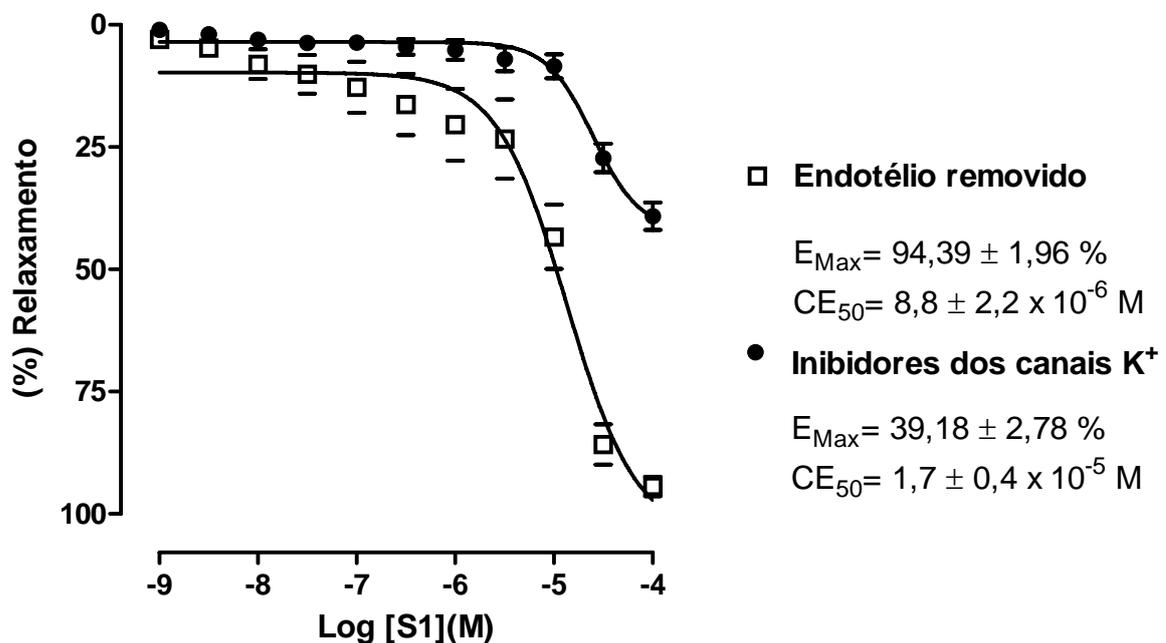
Em anéis de aorta sem endotélio funcional, na presença de  $30 \mu\text{M}$  de  $\text{BaCl}_2$ , um bloqueador dos canais para potássio retificadores de entrada ( $\text{K}_{ir}$ ) (GARDENER et al., 2004), a oxima S1 ( $10^{-9} - 10^{-4} \text{ M}$ ) promoveu um efeito vasorelaxante significativo e de maneira dependente de concentração, deslocando inicialmente a curva para a direita com conseqüente aumento da  $\text{EC}_{50}$  e posterior relaxamento com um aumento do  $\text{E}_{\text{Máx}}$  quando comparado aos anéis de aorta sem endotélio funcional ( $\text{E}_{\text{Máx}} = 88,83 \pm 0,16 \%$ ;  $\text{CE}_{50} = 5,48 \pm 1,64 \times 10^{-6} \text{ M}$ , endotélio removido) e ( $\text{E}_{\text{Máx}} = 97,18 \pm 2,81 \%$ ;  $\text{CE}_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $\text{BaCl}_2$ ) (Gráfico 14).



**Gráfico 14:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9} - 10^{-4} \text{ M}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$ ) na ausência de endotélio ( $n=6$ ) e na presença de Glibenclamida ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ). Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

### 7.2.1.12 Efeito da mistura dos bloqueadores dos canais para $K^+$ sobre a resposta relaxante induzida pela oxima S1 em anéis de aorta torácica superior isolada de rato.

Em anéis de aorta sem endotélio funcional, na presença de uma associação dos bloqueadores (10 mM de tetraetilamônio  $TEA^+$ , 1  $\mu$ M de Glibenclamida, 30  $\mu$ M de  $BaCl_2$ , 1 mM de 4-AP) a oxima S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) promoveu uma diminuição do efeito vadorelaxante promovido pela oxima S1 e conseqüentemente da  $CE_{50}$  e do  $E_{Máx}$  quando comparado aos anéis de aorta sem endotélio funcional ( $E_{Máx} = 94,39 \pm 1,96, \%$ ;  $CE_{50} = 8,8,5 \pm 2,2 \times 10^{-6} M$ , endotélio removido) e ( $E_{Máx} = 39,18 \pm 2,78 \%$ ;  $CE_{50} = 1,7 \pm 0,4 \times 10^{-5} M$ , associação dos inibidores) (Gráfico 15).



**Gráfico 15:** Curvas concentração resposta de S1 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) em anéis de aorta torácica isolada de rato pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M) na ausência de endotélio (n=6) e na presença da mistura dos bloqueadores (n=6). Os valores foram expressos como Média ± EPM.

Ensaio ( <i>in vitro</i> )	Finalidades (Avaliar o papel)	Efeitos	
		E <sub>máx.</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (M)
Fenilefrina	endotélio	83,05 ± 3,2	6,3 ± 1,2 x 10 <sup>-6</sup>
Atropina	Muscarínicos M <sub>3</sub>	49,33 ± 5,51	4,4 ± 1,5 x 10 <sup>-6</sup>
Indometacina	Metabólitos da COX	47,19 ± 11,53	3,3 ± 2,8 x 10 <sup>-6</sup>
L-NAME	NOS	100 ± 0,006	4,4 ± 1,1 x 10 <sup>-6</sup>
Hidroxicoalamina	NO	67,8 ± 5,0	3,2 ± 0,5 x 10 <sup>-5</sup>
Azul de Metileno	GCs	62,96 ± 5,98	7,9 ± 1,8 x 10 <sup>-6</sup>
KCl (30 mM)	Canais para K <sup>+</sup>	41,86 ± 8,4	-
KCl (80 mM)	Canais para Ca <sup>++</sup>	4,9 ± 2,4	-
TEA <sup>+</sup>	Canais para K <sup>+</sup>	99,83 ± 0,16	5,20 ± 0,63 x 10 <sup>-6</sup>
4-AP	K <sub>V</sub>	99,83 ± 0,16	5,20 ± 0,63 x 10 <sup>-6</sup>
Glibenclamida	K <sub>ATP</sub>	99,46 ± 0,16	15,52 ± 3,74 x 10 <sup>-6</sup>
BaCl <sub>2</sub>	K <sub>ir</sub>	97,18 ± 2,81	1,5 ± 0,3 x 10 <sup>-5</sup>
Associação dos inibidores	Canais para K <sup>+</sup>	39,18 ± 2,78	1,7 ± 0,4x10 <sup>-5</sup>

**Tabela 4:** Relaciona todos os resultados de E<sub>máx.</sub> (%) e CE<sub>50</sub> (M) obtidos nos ensaios *in vitro*.

## 8. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a atividade farmacológica da oxima S1 sobre aorta torácica de rato e suas principais constatações foram às propriedades hipotensoras e taquicárdicas, bem como o efeito vasorelaxante em aorta torácica isolada de rato, apresentada por esta substância. O efeito hipotensor foi decorrente provavelmente de uma diminuição da resistência periférica total com conseqüente diminuição da pressão arterial (**Gráficos 1, 2 e 3**).

Recentes dados relatados na literatura mostram que as oximas são drogas capazes de doar óxido nítrico (CHALUPSKY et al., 2004). Estas drogas tem como característica principal, na sua estrutura química, a presença de um grupamento  $C=NOH$  ligado a molécula (**Figura 3**). A presença deste grupamento na estrutura faz com que as oximas se comportem como a L-NOHA, um intermediário estável da reação de formação do óxido nítrico, que tem a capacidade de promover relaxamento independente do endotélio em anéis isolados de aorta de rato (VETROVSKY, P. et al., 2002) (**Figura 4**).

Estas novas drogas capazes de doar óxido nítrico por um processo enzimático e independente da NOS, representam hoje uma nova alternativa para liberação de NO, por uma via de ativação exógena, para tratar diversas doenças que ocorrem devido a uma imperfeição da atividade da NOS-3 como por exemplo em alguns casos de diabetes, hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão entre outras (RALF et al., 2006)

Os resultados obtidos mostraram que a oxima S1 apresentou um efeito vasorelaxante independente do endotélio em anéis de aorta torácica com ou sem endotélio funcional. Sendo importante ressaltar que este efeito, nos anéis de aorta com endotélio funcional foi atenuado significativamente (**Gráfico 4**).

Tendo em vista as características de S1 a serem avaliadas, o modelo vascular experimental escolhido para este estudo foram os vasos de grande condutância.

Para avaliar se o estímulo para a produção do óxido nítrico após a administração da oxima S1 seria devido a estimulação dos receptores muscarínicos (subtipo  $M_3$ ), foram realizados experimentos em anéis de aorta torácica de rato pré-incubados com atropina (1 nM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (RATTMANN et al., 2006; SHIRAKI et al., 2001). Na presença de atropina o efeito vasorelaxante produzido pela oxima S1 não foi modificado significativamente, sugerindo que a ativação direta dos receptores

muscarínicos parece não está relacionado com a resposta vasorelaxante induzida pela oxima S1 (**Gráfico 5**).

Para investigar o efeito dos metabólitos derivados do ácido araquidônico a partir da via da ciclooxigenase, utilizamos a indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase (ANGELIS et al., 2004). As respostas relaxantes induzidas por concentrações crescentes da oxima S1, em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto, não foram alterados significativamente. Estes resultados sugerem que os metabólitos da via da ciclooxigenase parecem não participarem do efeito relaxante indizado pela oxima S1 (**Gráfico 6**).

Em anéis com endotélio na presença de L-NAME (300 $\mu$ M) o efeito relaxante de S1 foi potencializado e esse efeito foi superior ao obtido pela adição de S1 em anéis sem endotélio (**Gráfico 7**). Sendo assim estes dados nos permite sugerir que a NOS esta atuando como um fator atenuante da resposta de S1 e assim diminuindo a resposta vasorelaxante.

Para avaliar se o NO fornecido por S1 estaria sendo o mediador responsável pela resposta relaxante, independente de endotélio vascular, foi utilizada a hidroxocobalamina, um seqüestrador de NO não permeável celular (KRUSZYNA et al., 1998, LA et al., 1998) e foi observado que as respostas, em anéis de aorta torácica isolada de rato, sem endotélio funcional, foram atenuadas significativamente com uma diminuição do efeito máximo promovido por S1 (**Gráfico 8**). É importante destacar que a hidroxocobalamina, por não ter a capacidade de penetrar no interior das células musculares lisas, onde o NO esta sendo formado enzimaticamente, seqüestrou apenas uma pequena porção a qual foi deslocada para o meio externo celular.

Baseando-se nestas considerações, resolvemos avaliar se o efeito vasorelaxante dependente do NO, induzido pela oxima S1 seria devido à ativação da ciclase de guanilil solúvel no músculo liso vascular. Para investigar este mecanismo utilizamos o azul de metileno, um inibidor não seletivo da ciclase de guanilil solúvel (KANG et al., 2005). Na presença deste inibidor observamos que as respostas relaxantes induzidas por concentrações crescentes da oxima S1 em anéis de aorta torácica sem endotélio foram atenuadas significativamente, sugerindo que o NO formado por estimulação da oxima S1 se difunde até o músculo liso vascular e produz seu efeito em parte pela ativação da ciclase de guanilil solúvel (**Gráfico 9**).

O KCl induz contração em músculo liso através da ativação de canais de cálcio operados por voltagem ( $Ca^{2+}$  V) promovendo influxo de  $Ca^{2+}$  e subsequente liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (GURNEY, 1994; NASA et al., 1992; YOSHIHISA et al., 1992),

enquanto que a vasoconstrição induzida por FEN é devida a estimulação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos acoplados a proteína-G com conseqüente aumento dos níveis de IP3 e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares e também pelo influxo via canais de cálcio operados por receptores ROCC's (PÉREZ-VÍSCAÍNO et al., 1998). Por qualquer um desses mecanismos a resultante é um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e contração (PÉREZ-VÍSCAÍNO et al., 1998).

A hiperpolarização das membrana das células do músculo liso pode ser produzida por agentes que abrem canais de  $\text{K}^+$ , levando ao efluxo de  $\text{K}^+$  da célula (GURNEY, 1994). Ao mesmo tempo em que a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , promovendo o relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

Uma propriedade típica das drogas que promovem vasorelaxamento por abrirem canais de  $\text{K}^+$ , é que elas efetivamente inibem a contração da musculatura lisa vascular produzida por um aumento moderado na concentração de  $\text{K}^+$  extracelular (30mM), porém essas drogas não são efetivas quando a concentração de  $\text{K}^+$  são elevadas para níveis mais altos (80 mM). Isto ocorre por que em elevadas concentrações de  $\text{K}^+$ , o potencial de membrana da célula muscular lisa está próximo ao do potencial de equilíbrio para o  $\text{K}^+$ , onde não ocorreu efluxo deste íon, evitando a hiperpolarização. Esta propriedade permite estabelecer distinção entre os abridores dos canais de  $\text{K}^+$ , e os antagonistas dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , que demonstram comportamento diferenciado nesta circunstância (GURNEY, 1994).

Sendo assim o pequeno efeito vasorelaxante nas contrações com KCl 30 mM nos permite sugere que S1 provavelmente esta ativando algum canal de  $\text{K}^+$ , tendo em vista que muitos relatos mostrados na literatura apontam que efeitos promovidos pelo NO pode ocorrer através da via de ativação de (algum ou alguns) tipos de canais de  $\text{K}^+$  (**Gráfico 10**).

Para avaliar a hipótese e identificar qual o subtipo de canal para potássio poderia está envolvido na resposta vasorelaxante independente do endotélio, curvas concentração resposta para a oxima S1, após a incubação separadamente na presença de 10 mM de tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ) um bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (QIU & QUILLEY, 2001), na presença de 1 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis a voltagem ( $\text{K}_v$ ) (TIRAPELLI et al., 2004), na presença de 1  $\mu\text{M}$  de Glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio ativados pelo ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) (KANG et al., 2005) e na presença de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{BaCl}_2$ , um bloqueador dos canais para potássio retificadores de entrada ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) (GARDENER et al., 2004). Desta forma foi observado nos anéis de aorta sem endotélio e na presença de cada bloqueador que não houve uma diminuição significativa da resposta promovida pela oxima S1, ocorrendo apenas um desvio não significativo da curva (**Gráficos 11, 12, 13 e 14**).

Podemos então sugerir inicialmente que a oxima S1 não está atuando por estas vias. No entanto, quando na presença de todos os inibidores simultaneamente adicionados na cuba, houve um deslocamento significativo da curva para esquerda e assim promovendo uma diminuição do efeito promovido pela oxima S1, reduzindo assim seu efeito máximo e a  $CE_{50}$  (**Gráfico 15**). Mostrando de forma simultânea que há um envolvimento destes canais para  $K^+$ . Isto indica que a oxima S1 atua de forma inespecífica sobre estes canais, e pode na presença de um inibidor usar outras formas de atuação por outros subtipos de canais para  $K^+$  que não estão sendo inibidos naquele momento.

Este estudo em conjunto mostra que os efeitos farmacológicos induzidos por S1 em nossos experimentos envolvem a participação do NO por uma via independente da NOS e do endotélio vascular. Este NO parece estar atuando em parte por uma ativação dos canais de  $K^+$  e não parecem envolver a ativação de canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem. Todos os dados representativos relacionados ao poder vasorelaxante da oxima S1 estão relacionados na (**Tabela 4**).

## 9. CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo através de experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstram que:

- 1) A oxima S1 induz efeito hipotensor e quando em altas concentrações uma pequena bradicardia seguida por taquicardia em ratos normotensos não anestesiados;
- 2) O efeito hipotensor parece ser devido a uma diminuição da resistência vascular periférica em função da atividade vasorelaxante promovida pelo NO liberado na presença da oxima S1;
- 3) O efeito vasorelaxante induzido pela oxima S1 sobre anéis de aorta parece ser independente do endotélio;
- 4) O efeito vasorelaxante de S1 não está ocorrendo através do bloqueio dos canais para cálcio operados por voltagem, mas sim por uma ativação dos canais para potássio que faz parte do mecanismo da via de ativação pelo NO;

## 10. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. L.; CHALUPSKY, K. SARR, M. ; SCHINI-KERTH, V. ;VANIN, A.F. STOCLET, J. & Muller, B. Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl–iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO)release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. **Biochemical Pharmacology**. v. 66, p. 2365–2374, 2003.
- ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Differential Effects of Substrate Depletion on Drug-Induced Contractions of Rabbit Aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1968-1705, 1970.
- ANDRONIK-LION, V.; BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M.; HENRY, Y.; MANSUY, D. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 185, p. 452-458.1992.
- ANGELIS, A.; RINALDI B.; CAPUANO, A.; ROSSI, F.; FILIPPELLI, A. Indomethacin potentiates acetylcholine-induced vasodilation by increasing free radical production. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p.1233–1240, 2004.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C. R. Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais usos terapêuticos.**Química Nova**, v. 28, 1046-1054, 2005.
- BOUCHER, J.L.; GENET, A.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D. Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by hemeproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v.184, p. 1158-1164, 1992.
- BUOCHBERG, M. S. **Planta Medica.**, v. 60, p. 373, 1994.
- BOUCHER, J. L.; GENET, A.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; HENRY,Y.; MANSUY, D. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.187, p. 880-886, 1992.
- BROUWER, M.; CHAMULITRAT, W.; FERRUZZI, G.; SAULS, D. L.; J.;WEINBERG B. Nitric Oxide Interactions With Cobalamins: Biochemical and Functional Consequences. **Blood**, v. 88, p. 1857-1864, 1996.

CAMARA, C. A.; PINTO, A. C.; VARGAS, M.D.; ZUCKERMANN-SCHPECTOR, J. Azepines from the intramolecular Prins cyclization of an aminoderivative of lapachol. **Tetrahedron**, v. 58, p. 6135-6140, 2002.

CAMARA, C. A.; ROSA, M. A.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Secondary amines and unexpected 1-aza-anthraquinones from 2-methoxy-lapachol. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9569-9574, 2001.

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

CARO, A. A.; CEDERBAUM, A.I.; STOYANOVSKY, D.A. Oxidation of the ketoxime acetoxime to nitric oxide by oxygen radical-generating systems. **Nitric Oxide**, v.5, p. 413-424, 2001.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 17, p.417, 2002.

CHALUPSKY, K.; LOBYSHEVA, I.; NEPVEU, F.; GADEA, I.; BERANOVA, P.; ENTLICHER, G.; STOCLET, J.C.; MULLER, B. Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta: role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1203-1214, 2004.

CHOI, B.T.; CHEONG, J.; CHOI, Y.H. Beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. **Anticancer Drugs**, v.14, p. 845-850, 2003.

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M.H.; WOHLERS, H. Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. **Biochemical Pharmacology** , v.46, p. 2249-2267, 1993.

CLEMENT, B. The oxidation of benzamidines in vitro. **Xenohiotica**, v. 13,467-473, 1983.

CLEMENT, B.; JUNG F. N-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P450 2C3 or human liver microsomes, microsomal reduction, and further oxidative transformation of the formed: amidoximes. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v.22, p. 486-497, 1994.

CLEMENT, B.; Jung, F. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals** .v. 22, p. 486-497, 1994.

CLEMENT, B.; SCHULTZC-MOSGAU M. H.; Wohlers, H. Cytochrome P450- dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalyzed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. **Biochemical Pharmacology**, v.46, p.2249-2267, 1993.

CLEMENT. B; SCHULTZE-MOSGAU, M. H; WOHLERS H, JUNG F.In: Biology of nitric oxide pt 4 (Feelisch M, Busse R, Moncada S, eds) **Portland Press**,London, 15-20. 1995.

COX, R. H. Changes in expression and function of arterial potassium channels during hypertension. **Vascular Pharmacology**. v. 38, p.13-23, 2002.

COX, R. H. Changes in expression and function of arterial potassium channels during hypertension. **Vascular Pharmacology**. v. 38, p.13-23, 2002.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M., Endothelium-Dependent Hiperpolarization:Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. **Circulation Research**, v 92, p.3337-3349, 1997.

CROOKE, S. T.; BRADNER, W.J. **Cancer Treatment Reviews**, v 3, p. 21, 1976.

DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. **Boca Raton: CRC**, 1985.

EDWARD, G.; DORA, K.A.GARDENER, M. J.; GARLAND, C.J.; WESTON, A.H. K is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.**Nature**. v.396, p.296-272, 2001.

FÉLÉTOU, M. & VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hiperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 93 p.515-524, 1998.

FELDMAN, P. L, GRIFFITH, O. W., STUEHR, D.J. The surprising life of nitric oxide. **Chemical and Engineering News**, v. 71, p. 26-38. 1993.

FERREIRA, V. F. **Química Nova**, v.15, p.348, 1992.

FERREIRA, V. F..**Química nova na escola**, conceitos de ácido e base. nº 4, novembro, 1996.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FREIS, E.D.; Hemodynamics of Hipertension. **Physiology Reviews**. v.40, p. 27-54, 1960.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, R. B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v.46, p.265-7, 2000.

GARCIA, C. C. Las versátiles proteínas zinc fingers. Revista **QuímicaViva**, número 1, ano 5, abril 2006.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.11 p.495-500, 1995.

GARDENER, M. J.; JOHNSON, I. T.; BURNHAM M. P.; EDWARDS, G.; HEAGERTY. A. M.; WESTON, H. A. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. **British Journal of Pharmacology**. v.142, p.192–202, 2004.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. -M.; SEIGLE-MURANDI, F.; KUMAGAI, Y.;NAKAJIMA, H.; MIDORIKAWA, K.; HOMMA-TAKEDA, S.;SHIMOJO, N. Inhibition of nitric oxide formation by neuronal nitric oxide synthase by quinones: nitric oxide synthase as a quinone reductase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 608-613, 1998.

HALPERT, R. J.; DOMANSKI, T. L.; ADALI, O.; BIAGINI, C. P. COSME J.; ELIZABETH, D. A.; JOHNSON, E. F.; JONES, J. P. MONTELLANO, P.O.; PHILPOT, R.M.; OLE SIBBESEN, W. KEITH WYATT, AND ZHOUPENG ZHENG. Structure-function of cytochromes p450 and flavin-containing monooxygenases. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic**. v. 26, 1998.

HAYASHI, T.; SMITH, F. T.; LEE, K. H. J. **Medicinal Chemistry**. v.26, 2005.

HINES, R.N.; HODGSON, E.; KIMURAT, F.; OZOLS, J.; PHILLIPS, I.R.; PHILPOT, R.M.; POULSEN, L.L.; RETTIE, A.E. SHEPARD, E.A.; WILLIAMS DE ANDZIEGLER, D.M. A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.308, p.254–257, 1994.

HILLE, B. **Ionic Channels of excitable membranes**. 2° ed. SINAUER, Sunderland, Massashusetts, USA, 1991, 1967.

HOBBS, A.J.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase : direct enhancement of generation by superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 91, p.10992-10996. 1994.

HINES, R.N.; HODGSON, E.; KIMURAT, F.; OZOLS, J.; PHILLIPS, I.R.; PHILPOT, R.M.; POULSEN, L.L.; RETTIE, A.E. SHEPARD, E.A.; WILLIAMS DE ANDZIEGLER, D.M. A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.308, p.254–257, 1994.

IGNARRO L. J.; HARBISON, R. G; WOOD, K.S.; KADOWITZ, P. J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradikinin and arachidonic acid. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.237, p.89-900, 1986.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**. v.35, p. 173-178, 2000.

JOUSSERANDOT, A., BOUCHER, J. L., DESSEAUX, C., DELAFORGE, M., & KIEL, J.L. Typeb Cytochromes: Sensors and Switches. **CRC Press, Boca Raton**. 1995.

JOUSSERANDOT, A.; BOUCHER, J. L.; DESSEAUX, C.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D. Formation of nitrogen oxides including NO from oxidative cleavage of C = N(OH) bonds : a general cytochrome P450-dependent reaction. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 5, p. 423–426, 1995.

KANG, D. G.; LEE, J. K.; CHOI, D. H.; SOHN, E. J.; MOON, M. K.; LEE, H. S. Vascular Relaxation by the Methanol Extract of Sorbus Cortex via NO-cGMP Pathway. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p. 860-864, 2005.

KUO, P. C; ABE, K.Y.; DAFOE, D.C. Cytochrome P450IIIa activity and cytokine mediated synthesis of nitric oxide. **Surgery**, v. 118, p.310–317, 1995.

KLATT, P.; SCHMIDT, K.; URAY, G. & MAYER, B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement and the role of *N*-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.14781–14787, 1993.

KORTH, H. G.; SUSTMANN, R.; TAHTER, C.; BURTHER A. R; LINGOLD, K.U. On the mechanism of the nitric oxide synthase catalyzed conversion of N-hydroxy-L-arginine to citrulline and nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.17776-17779, 1994.

LAWTON, M.P.; CASHMAN, J.R.; CRESTEIL, T.; DOLPHIN, C.T.; ELFARRA, A.A.; EUN, L.; JIYEON, K.; CHANG, K. S. ; JUNG, H. S. Dual Effects of Nitric Oxide on the Large Conductance Calcium-activated Potassium Channels of Rat Brain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 91-96, 2006.

LAWTON, M.P.; CASHMAN, J.R.; CRESTEIL, T.; DOLPHIN, C.T.; ELFARRA, A.A.; LEE, J.Y.; LEE, M.Y.; CHUNG, S.M.; CHUNG, J.H. Menadione-induced vascular

endothelial dysfunction and its possible significance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 161, p.140-145, 1999.

LIMA, O.G.; D. ALBUQUERQUE, I. L., GONÇALVES DE LIMA, C., MACHADO, M. P. Primeiras Observações sobre a Ação Antimicrobiana do Lapachol.- **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco** v.14, p.129-135, 1956.

LIU, S.H.; TZENG, H.P.; KUO, M.L.; LIN-SHIAU, S.Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by beta-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. **British Journal of Pharmacology**, v.126, p.746-750, 1999.

MANSUY, D. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.5, p. 423-426, 1995.

MANSUY, D.; RENAUD, J. P.;MONTELLANO,O. P.R. Heme-thiolate proteins different from cytochromes P450 catalyzing monooxygenations. In: Cytochrome P450." structure, mechanism and biochemistry, **Ed Plenum Press**, New York, 1994.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.**Cell**. v.78, p.927-930, 1994.

MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.Macrophage oxidation of L - arginine to nitriteand nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, Columbus, v. 27, p. 8706-8711,1988.

MARIETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.12231- 12234, 1993.

MAYER,B.,LEBER,A.,HEMMENS,B.,KLOSCH,B.,GOESSLER,W.,RABER,G.,SCHMID, K. Characterization of Recombinant Human Endothelial Nitric-oxide Syntase Purified from the Yeast *Pichia pastoris*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.37658-37664, 1999.

MANSUY, D; BOUCHER,J.L.; CLEMENT,B.On the mecanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C=N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450. **Biochimie**, v.77, p.661-667, 1995.

MONTELLANO, O. P.R. Cvtochrome P450." I Structure. Mechanism and Biochemistry. **Plenum Press**, New York, 1986.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 29, p.2002-2012, 1993.

MOLLACE, V.;MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S. & SALVEMINI D. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacological Review**. v.57, p.217–252, 2005.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v.29, p.2002-2012, 1999.

MOTULSKY, H. Intuitive Biostatistics, **Oxford University Press**, 1995.

NEBERT, D.W.; GONZALES, F.J. P450 genes: structure, evolution, and regulation. **Annual Reviews Biochemistry**, v.56, p.945-993, 1987.

NEVES-PINTO, C.; MALTA, V. R. S.; PINTO, M. C. F. R.; SANTOS, R.H. A.; de CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. J. **Medicinal Chemistry**, v.45, p.2112, 2002.

OATES, J.A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In:HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.;LIMBRIND,L.E. GOODMAN & GILMANN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9 ed.USA; McGraw-Hill,33:781,1996.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura/IBDF**, v.6, 1984.

QIU, Y.; QUILLEY, J. Apamin/charybdotoxin-sensitive endothelial K<sup>+</sup> channels contribute to acetylcholine-induced, NO-dependent vasorelaxation of rat aorta. **Medical Science Monitor**, v.7, p.1129-1136, 2001.

PANZA, J.A.; QUYYUMI, A. A.; BRUSH, J.E.; EPSTEIN, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **New England Journal of Medicine**, v.323, p.22–27. 1990.

RALF, P.; BRANDES, D. K.; FRIEDRICH-HUBERTUS, S.W.; MOJGAN, A.; AXEL, G.; ALEXANDER, M.; RUDI, B. Increased Nitrovasodilator Sensitivity in Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice-Role of Soluble Guanylyl Cyclase. **Hypertension**.v.35, p.231-236, 2000.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; RIECK, M. I. L. , MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E. da. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p. 328–335, 2006.

RENAUD, J.P.; BOUCHER, J. L.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D. Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. **Biochem Biophys Res Commun**. v.192, p.53-60. 1993.

RYU, C.K.; SHIN, K.H.; SEO, J.H.; KIM, H.J. 6-Arylamino-5,8-quinazolinones as potent inhibitors of endothelium-dependent vasorelaxation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.77-82, 2002.

SHIEH C.; COGHLAN M.; SULLIVAN J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium Channels: Molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. **Pharmacol Reviews**. v. 52, p.557-593, 2000.

SACAU, E.P.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; FERRO, E.A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory Effects of Lapachol Derivatives on Epstein-Barr Virus Activation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.11, p.483-488, 2003.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on beta-lapachone and derivatives. **Quimica Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; BARBOSA, T.P.; SOARES, A.Z.; CUNHA, L.C.; PINTO, A.C.; VARGAS, M.D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino- and hydrogenated-derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2004.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.S. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na lapachona e derivados. **Quimica Nova**, v.26, p. 407-416, 2003.

SHIRAKI, H.; KAWASAKI, H.; TEZUKA, S.; NAKATSUMA, A.; NAWA, H.; ARAKI, H.; GOMITA, Y.; KUROSAKI, Y.; Adrenergic nerves mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in the rat mesenteric resistance artery. **European Journal of pharmacology**, v. 419, p.231-242, 2001.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.37, p.339–359, 1997.

STUEHR, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; & WISEMAN, J.  $N^0$ -hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **Journal of Biological Chemistry**. v.266, p.6259–6263, 1991.

STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1411, p.217-230, 1999.

SHIEH C.; COGHLAN M.; SULLIVAN J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium Channels: Molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. **Pharmacology Reviews**. v. 52, p.557-593, 2000.

SHIRAKI, H.; KAWASAKI, H.; TEZUKA, S.; NAKATSUMA, A.; NAWA, H.; ARAKI, H.; GOMITA, Y.; KUROSAKI, Y.; Adrenergic nerves mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in the rat mesenteric resistance artery. **European Journal of pharmacology**, v.419, p.231-242, 2001.

TAMMARO P.; SMITH A. L.; HUTCHINGS S. R.; SMIRNOV, S. V. **British Journal of Pharmacology**.v.143, p.303–317. 2004.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; COSTAC, F. B.; COUTINHO, S.T.; OLIVEIRA, D. C. R.; OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**. v.492, p.233–241, 2004.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Significant Role of Neuronal Non-N-Type Calcium Channels in the Sympatic Neurogenic Contraction of Rat Mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v.128, p.1602-1608. 1999.

THOMSON, R. H. Em Naturally Occurring Quinones; Academic Press: New York, 1971;

THOMPSON, R. H. Em Naturally Occuring Quinones IV: Recents Advances; **Chapman & Hall: London**, 1997.

VETROVSKY, P; BOUCHER, J. L.; SCHOTT, C.; BERANOVA, P; CHALUPSKY, K.;CALLIZOT, N.L.; MULLER, B., ENTLICHER, G. ;MANSUY, D. ; STOCLET J.C. Involvement of NO in the Endothelium-Independent Relaxing Effects of *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginine and Other Compounds Bearing a C=NOH Function in the Rat Aorta. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v.303, p.823–830, 2002.

VOSS, J. J.; SIBBESSEN, O.; ZHANG, Z.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Substrate docking algorithms and prediction of the substrate specificity of cytochrome P450cam and its L244 Amutant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 5489–5498, 1997.

ZIEGLER, D.M. Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavincontaining monooxygenases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33; p.179–99, 1993.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; Wu, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. WENDEL, W. B. Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chemical Reviews.**, 102, 1091-1134, 2002.

WHITE K.A.; MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, v. 31, p. 6627-31, 1992.

**Trabalhos publicados em anais de congressos**

MAGALHÃES, N. M.; ASSIS, V. L.; MEDEIROS, I. A.; CÂMARA, C. A.; ALENCAR, J. L. **Efeito vasorelaxante da oxima derivada do Lapachol em aorta isolada de rato.** Anais do I Congresso Regional das Faculdades de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança. ISBN 85-99789-01-5, 2006.

MAGALHÃES, N. M.; ASSIS, V. L.; DANTAS, B. P. V.; MOREIRA, A. C. P.; ARAUJO, I. G. A.; MEDEIROS, I. A.; CÂMARA, C. A. ; ALENCAR, J. L. **Vasorelaxation induced by oxime derivative of lapachol in isolated rat aorta.** Trabalho científico apresentado na forma de painel no 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 18 a 21 de outubro de 2006, Ribeirão Preto-SP.

MAGALHÃES, N. M.; ASSIS, V. L.; DANTAS, B. P. V.; MOREIRA, A. C. P.; SILVEIRA, A. L.; MEDEIROS, I. A.; CÂMARA, C. A.; ALENCAR, J. L. **Efeito vasorelaxante independente do endotélio de uma oxima derivada do lapachol em aorta isolada de rato.** Trabalho científico apresentado na forma de painel no XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 19 a 22 de setembro de 2006, Salvador - BA.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)