



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
“PROF. PAULO HUMBERTO MOREIRA NUNES”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE
***Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae)**
EM ARTÉRIA MESENTÉRICA ISOLADA DE RATO

DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO

TERESINA – PI

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE
Sida santaremnensis H. Monteiro (Malvaceae)
EM ARTÉRIA MESENTÉRICA ISOLADA DE RATO

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

ORIENTADORA: PROFa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA

CO-ORIENTADORA: PROFa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

TERESINA – PI

2009

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

A668a Arcanjo, Daniel Dias Rufino.

Avaliação do efeito vasorrelaxante do extrato etanólico das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) em artéria mesentérica isolada de rato / Daniel Dias Rufino Arcanjo. – Teresina, 2009.
96 f.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, 2009.

Orientadora: “Prof. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira”.
Co-orientadora: “Prof. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira”.

1. Artéria mesentérica. 2. *Sida santaremnensis*. 3. Vasorrelaxante I. Título.

CDD: 615.1

DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DO EXTRATO ETANÓLICO
DAS PARTES AÉREAS DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae)
EM ARTÉRIA MESENTÉRICA ISOLADA DE RATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde / Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM FARMACOLOGIA, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central desta IES.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Data da aprovação: _____ de _____ de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
(Orientadora)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges
(Membro externo)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho
(Membro interno)
Universidade Federal do Piauí

Dedicatória



A meus pais João Batista e Emília por acreditar em meu potencial e pelo constante incentivo.

A minhas irmãs Patrícia, Daniella e Priscilla pela amizade e companheirismo.

A minha esposa Giani por todo amor, dedicação e paciência em todos os dias de minha vida.

Agradecimientos



À Consciência Cósmica, sendo antiga e sempre presente fonte de inspiração, por toda a criação e manutenção do equilíbrio.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira e Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira pela orientação e constante presença, ensinamentos, paciência, amizade e carinho dispensados.

Aos alunos de Iniciação Científica Nelma Neylanne Pinho Muniz Oliveira, Edson Santos Ferreira Filho e Arthur Anderson Rodrigues Alves pela amizade e colaboração nos trabalhos experimentais.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, frente à Coordenação do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da UFPI, por dar todo o suporte para a execução dos experimentos através do bom funcionamento dos biotérios e laboratórios.

Aos Profs. Dr. Antônio Carlos Romão Borges e Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, pela acolhida em seu laboratório, amizade e colaboração com os trabalhos experimentais.

Aos Profs. Dra. Maria do Carmo Carvalho e Martins, Dr. Rozeverter Moreno Fernandes e Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pelas consideráveis contribuições à execução do trabalho.

Aos Profs. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida e Dr. Francisco de Assis Oliveira pelo excelente trabalho frente à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPI.

Às Profas. Dra. Danielly Albuquerque da Costa e Dra. Mariana Helena Chaves pelo fornecimento do Ssan-EtOH.

Aos professores da pós-graduação: Fernanda Regina Almeida, Paulo Cavalcanti, Francisco Oliveira, Rozeverter Moreno Fernandes, Rita de Cássia Oliveira, Aldeídia Oliveira, Amilton Costa, Salete Brito, Suzana Galvão,

Luiz Felipe Coelho, Maria José Soares , Fernando Aécio Carvalho, José Moita Neto e Antônia Edna Brito, pela formação, participação e constante incentivo.

Ao Sr. Carlos Alberto de Deus, pelo exímio cuidado dispensado ao biotério, de extrema importância para o êxito dos trabalhos experimentais.

A todos os amigos e colegas do NPPM, em especial: Arthur, Bernardo, Celyane, Edson, Felipe Augusto, Fernanda, Hélio, Lorena, Luciane, Nelma e Sérgio, pela amizade e constante presença.

À Gleyce Lima (Secretaria da Pós-graduação) por seu trabalho desempenhado com dedicação junto à secretaria.

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

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

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

RESUMO

Sida santaremnensis H. Monteiro (Malvaceae) é conhecida popularmente por “guanxuma” no nordeste do Brasil. Estudos anteriores demonstraram para espécies do gênero *Sida* atividades hipotensora, bradicárdica e vasorrelaxante em ratos. O extrato etanólico das partes aéreas de *Sida santaremnensis* (SSan-EtOH) promoveu efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos de maneira dependente de concentração em preparações com endotélio vascular ($CE_{50} = 18,84 \pm 4,11 \mu\text{g/ml}$), este efeito foi atenuado após a remoção do endotélio ($CE_{50} = 71,06 \pm 4,70 \mu\text{g/ml}^{***}$), sem alteração no efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 100,0 \pm 0,0 \%$). Resposta semelhante foi observada em preparações com endotélio vascular na presença do inibidor da NO-sintase, L-NAME $100 \mu\text{M}$ ($CE_{50} = 124,98 \pm 15,33 \mu\text{g/ml}^{***}$), ou do inibidor da ciclooxigenase, indometacina $10 \mu\text{M}$ ($CE_{50} = 247,02 \pm 35,50 \mu\text{g/ml}$) ou do inibidor não seletivo dos receptores muscarínicos, atropina 1 nM ($CE_{50} = 97,29 \pm 17,84 \mu\text{g/ml}^{**}$). Em preparações com endotélio intacto, a participação dos canais para K^+ foi avaliada com pré-tratamento com KCl 20 mM e TEA 3 mM ($CE_{50} = 55,38 \pm 4,11^{***}$ e $CE_{50} = 45,87 \pm 4,96^{**}$, respectivamente). A influência do EDHF foi avaliada na presença de L-NAME $100 \mu\text{M}$ + Indo $10 \mu\text{M}$ + TEA 3 mM em preparações com endotélio vascular, e a resposta vasorrelaxante foi atenuada ($CE_{50} = 31,26 \pm 2,56^*$). Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, a pré-incubação de concentrações de SSan-EtOH ($9, 27, 81, 243$ e $500 \mu\text{g/mL}$) foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente as contrações induzidas por fenilefrina ($10^{-9} - 10^{-5} \text{ M}$), havendo ainda um deslocamento da curva para direita com inibição do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 98,0 \pm 1,59; 91,04 \pm 5,42; 45,82 \pm 1,88^{***}; 11,15 \pm 2,45^{***}$ e $5,59 \pm 1,05 \%^{***}$, respectivamente). Em anéis sem endotélio pré-contraídos com KCl 80 mM , a adição cumulativa de SSan-EtOH promoveu efeito vasorelaxante concentração-dependente ($CE_{50} = 49,37 \pm 6,46 \mu\text{g/ml}$). Em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, SSan-EtOH ($27, 81, 243$ e $500 \mu\text{g/ml}$) inibiu de maneira concentração-dependente as contrações cumulativas induzidas pela adição de CaCl_2 ($10^{-6} - 3 \times 10^{-2} \text{ M}$); ($E_{m\acute{a}x} = 97,53 \pm 3,78; 43,53 \pm 5,41^{***}; 52,89 \pm 4,80^{***}$ e $26,68 \pm 3,82 \%^{***}$, respectivamente). O efeito vasorelaxante promovido por SSan-EtOH em preparações com endotélio vascular envolve provavelmente a participação da enzima NO-sintase e dos metabólitos da ciclooxigenase, bem como a participação dos receptores muscarínicos e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. O efeito independente do endotélio ocorre provavelmente pela inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem.

Palavras chave: artéria mesentérica, *Sida santaremnensis*, vasorrelaxamento.

Avaliação do efeito vasorrelaxante do extrato etanólico das partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) em artéria mesentérica isolada de rato
Arcanjo, D. D. R.

Pós-Graduação em Farmacologia
Dissertação de Mestrado, NPPM/CCS/UFPI (2009)

ABSTRACT

Sida santaremnensis H. Monteiro (Malvaceae) is popularly known as “guanxuma” in Brazilian Northeast. Previous studies have demonstrated hypotensive, bradycardic and vasorelaxant activities in rats for plants from the genus *Sida* species. The etanolic extract obtained from aerial parts of *Sida santaremnensis* (SSan-EtOH) promoted a concentration-dependent vasorelaxant effect in rat mesenteric artery rings with intact endothelium ($EC_{50} = 18.84 \pm 4.11 \mu\text{g/mL}$), which was attenuated after endothelium remotion ($EC_{50} = 71.06 \pm 4.70 \mu\text{g/mL}^{**}$), without changing the maximum effect ($E_{m\acute{a}x} = 100.0 \pm 0.0 \%$). Similar results were observed in preparations with intact endothelium in the presence of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME $100 \mu\text{M}$ ($EC_{50} = 124.98 \pm 15.33 \mu\text{g/mL}^{***}$), or of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin $10 \mu\text{M}$ ($EC_{50} = 247.02 \pm 35.50 \mu\text{g/mL}$), or of the non-selective muscarinic antagonist atropine 1 nM ($EC_{50} = 97.29 \pm 17.84 \mu\text{g/mL}^{**}$). In preparations with endothelium, K^+ channels involvement was analyzed in the presence of KCl 20 mM and TEA 3 mM ($EC_{50} = 55.38 \pm 4.11^{***}$ and $EC_{50} = 45.87 \pm 4.96^{**}$, respectively). The endothelium-derived hyperpolarizant factor (EDHF) involvement was verified in presence of L-NAME $100 \mu\text{M}$ + Indo $10 \mu\text{M}$ + TEA 3 mM in preparations with intact endothelium, and relaxant effect was decreased ($EC_{50} = 31.26 \pm 2.56^*$). In rings of superior mesenteric artery without functional endothelium, the preincubation with different concentrations of SSan-EtOH ($9, 27, 81, 243$ e $500 \mu\text{g/mL}$) was able to inhibit phenylephrine-induced contractions ($10^{-9} - 10^{-5} \text{ M}$) in a concentration-dependent way, and also shifting the concentration-response curve to the right with inhibition of the maximum effect ($E_{m\acute{a}x} = 98.0 \pm 1.59; 91.04 \pm 5.42; 45.82 \pm 1.88^{***}; 11.15 \pm 2.45^{***}$ e $5.59 \pm 1.05^{***}$, respectively). In rat mesenteric artery rings without endothelium and precontracted with KCl 80 mM , the cumulative addition of SSan-EtOH promoted a concentration-dependent vasorelaxant effect ($CE_{50} = 49.37 \pm 6.46 \mu\text{g/mL}$). In a nominally calcium-free depolarizing medium, SSan-EtOH ($27, 81, 243$ e $500 \mu\text{g/mL}$) inhibited the contractions induced by cumulative addition of CaCl_2 ($10^{-6} - 3 \times 10^{-2} \text{ M}$) in a concentration-dependent way ($E_{m\acute{a}x} = 97.53 \pm 3.78; 43.53 \pm 5.41^{***}; 52.89 \pm 4.80^{***}$ e $26.68 \pm 3.82 \%^{***}$, respectively). The endothelium-dependent vasorelaxant effect promoted by SSan-EtOH probably involves not only the participation of the enzyme nitric oxide synthase but also the cyclooxygenase metabolites as well as the muscarinic receptors and the endothelium-derived hyperpolarizant factor (EDHF). The endothelium-independent effect probably occurs through the inhibition of calcium influx through voltage-dependent calcium channels.

Keywords: mesenteric artery, *Sida santaremnensis*, vasorelaxant effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Sida santaremnensis</i> H. Monteiro.....	27
Figura 2 – <i>Rattus norvegicus</i>	31
Figura 3 – Artéria mesentérica superior isolada de rato.....	36
Figura 4 – Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução de Tyrode.....	36
Figura 5 – Aparato utilizado para registros de tensões isométricas.....	37
Figura 6 – Representação esquemática dos protocolos experimentais para estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) e na ausência (B) do endotélio vascular.....	38
Figura 7 – Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito de Ssan-EtOH na presença de algumas ferramentas farmacológicas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular.....	38
Figura 8 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre contrações induzidas adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular...	42
Figura 9 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre contrações induzidas adição cumulativa de CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.....	43
Figura 10 – Registros originais da resposta relaxante de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de Tyrode.....	32
Tabela 2 – Composição da solução de Tyrode despolarizante (KCl 20 mM).....	32
Tabela 3 – Composição da solução de Tyrode despolarizante (KCl 80 mM).....	33
Tabela 4 – Composição da solução de Tyrode despolarizante KCl (60 mM).....	33
Tabela 5 – Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio	33
Tabela 6 – Composição da solução de Tyrode despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio.....	34
Tabela 7 – Avaliação da atividade comportamental de Ssan-EtOH nas doses de 1000 ou 2000 mg/kg (v.o.) em camundongos Swiss de ambos os sexos.....	46
Tabela 8 – Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de EC ₅₀ e efeito máximo (E _{máx}) para Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com fenilefrina.....	53
Tabela 9. Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de EC ₅₀ e efeito máximo (E _{máx}) para Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com fenilefrina para avaliar a participação de canais para potássio.....	59
Tabela 10 – Valores numéricos expressos em Média \pm e.p.m dos valores de pD ₂ e efeito máximo (E _{max}) das contrações induzidas por fenilefrina na presença de Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular.....	61
Tabela 11 – Valores numéricos expressos em Média \pm e.p.m dos valores de pD ₂ e efeito máximo (E _{max}) das contrações induzidas por CaCl ₂ na presença de Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito hemolítico em eritrócitos de rato incubados com Ssan-EtOH (1 - 1000 µg/mL)..... 45
- Gráfico 2** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (▲) ou na ausência (■) do endotélio vascular..... 48
- Gráfico 3** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (■) de L-NAME..... 49
- Gráfico 4** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (⊕) de hidroxocobalamina..... 50
- Gráfico 5** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (⊕) de indometacina... 51
- Gráfico 6** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (★) de atropina..... 52
- Gráfico 7** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (◇) de KCl 20 mM..... 54
- Gráfico 8** – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional, na ausência (■) ou na presença (◇) de KCl 20 mM.. 55

Gráfico 9 Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (◆) de TEA 3 mM...	56
Gráfico 10 Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (▽) de L-NAME 100 µM + Indometacina 10 µM	57
Gráfico 11 Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (◆) de L-NAME 100 µM + Indometacina 10 µM + TEA 3 mM.....	58
Gráfico 12 – Curvas cumulativa para Fenilefrina na presença de concentrações isoladas de Ssan-EtOH (9,0 – 500 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido.....	60
Gráfico 13 – Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido, pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) (■) ou KCl 80 mM (×).....	62
Gráfico 14 – Curvas cumulativa para CaCl ₂ na presença de concentrações isoladas de Ssan-EtOH (27,0 – 500 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
Ca_vL	Canais para cálcio sensível à voltagem tipo L
[Ca²⁺]_i	Concentração de cálcio intracelular
EC₅₀	Concentração que promove 50% do efeito máximo de uma substância
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DL₅₀	Dose de uma substância que promove 50% de morte
E_{max}	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
eNOS	Enzima sintase de NO endotelial
FEN	Fenilefrina
GC	Guanilil ciclase
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
Indo	Indometacina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
iNOS	Enzima sintase de NO indutiva
K⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KCl 60 mM	
0-Ca²⁺	Solução despolarizante KCl 60 mM nominalmente sem cálcio
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina metil ester
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
n	Número de experimentos realizados
nNOS	Enzima sintase de NO neuronal
NO	Óxido nítrico
PIP₂	4,5 – difosfato de inositol
PGI₂	Prostaciclina
pD₂	Logaritmo negativo do valor de CE ₅₀
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
RS	Retículo sarcoplasmático
ROCC's	Canais de cálcio operados por receptores
RPT	Resistência periférica total
RYR	Receptor de rianodina
SSan-EtOH	Extrato etanólico das partes aéreas de <i>Sida santaremnensis</i>
TEA	Tetraetilamônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Considerações gerais sobre contração e relaxamento no músculo liso vascular.....	19
1.2. Plantas medicinais X Etnofarmacologia.....	22
1.3. A família Malvaceae.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Gerais	29
2.2. Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	31
3.2. Drogas.....	31
3.3. Soluções Nutritivas.....	32
3.4. Coleta, identificação do material botânico e preparação de extratos.....	34
3.5. Avaliação do potencial toxicológico agudo e citotóxico.....	34
3.5.1. Determinação da DL50	34
3.5.2. Atividade hemolítica.....	35
3.6. Ensaio Farmacológicos.....	35
3.6.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular.....	35
3.6.2. Protocolo experimental para verificação do efeito de Ssan-EtOH frente às contrações induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isoladas de rato.....	37
3.6.3. Verificação da participação da enzima NO-sintase na resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	39
3.6.4. Verificação da participação de NO na resposta induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	39
3.6.5. Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido	

araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.	39
3.6.6. Verificação da participação dos receptores muscarínicos no vasorelaxamento arterial induzido por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	40
3.6.7. Verificação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	40
3.6.8. Avaliação da resposta contrátil da fenilefrina na presença de concentrações individuais de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular.....	41
3.6.9. Efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato...	41
3.6.10. Efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato.....	42
3.7. Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Avaliação do potencial agudo e citotóxico.....	45
4.2. Estudos farmacológicos	47
4.2.1. Efeito de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	47
4.2.2. Verificação do efeito de L-NAME na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	49
4.2.3. Verificação do efeito de hidroxocobalamina na resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	50
4.2.4. Verificação do efeito de indometacina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	51
4.2.5. Verificação do efeito de atropina na resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica	

superior isolada de ratos.....	52
4.2.6. Verificação do efeito de KCl 20 mM na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com e sem endotélio funcional.....	54
4.2.7. Verificação do efeito de TEA 3 mM na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional.....	56
4.2.8. Verificação do efeito de L-NAME e Indometacina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional..	57
4.2.9. Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	60
4.2.10. Efeito do agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	62
4.2.11. Verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS.....	78

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. *Considerações gerais sobre contração e relaxamento no músculo liso vascular*

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla e regula o funcionamento da maioria dos órgãos do corpo, e representa uma ferramenta útil para a investigação de atividades biológicas de substâncias de qualquer fonte, seja natural ou sintética (WATTERSON et al., 2005). A contração do músculo liso é dependente do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular através do influxo extracelular e liberação de cálcio dos estoques intracelulares (SOMLYO; SOMLYO, 1994)

Os canais iônicos desempenham um papel central neste processo. Como em todas as células musculares, a musculatura lisa vascular utiliza íons Ca^{2+} como um mecanismo de acionamento do processo de contração. O influxo de cálcio através de canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_vL) na membrana plasmática e liberação de cálcio dos estoques intracelulares são as principais fontes para a ativação do mecanismo da contração (JACKSON, 2000).

Os estudos iniciais sobre a regulação da contração no músculo liso mostraram que o íon Ca^{2+} , semelhante ao que ocorre no músculo estriado, é o mensageiro secundário do processo de contração. Todavia, as troponinas, entre elas a troponina C, conhecido alvo intracelular para o Ca^{2+} no músculo estriado, não existem no músculo liso, e os filamentos de actina e miosina não interagem entre si da mesma forma que no músculo estriado (EBASHI 1960; MURPHY, 1976). Com a descoberta da calmodulina (CaM) (CHEUNG, 1970; KAKIUCHI; YAMAZAKY, 1970), uma proteína ligante de Ca^{2+} no músculo liso, foi demonstrada a correlação existente entre a fosforilação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e o início da contração. Um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induzido por um estímulo qualquer promove a ligação do Ca^{2+} à CaM, formando assim o complexo $(\text{Ca}^{2+})/\text{CaM}$, que sofre uma alteração conformacional e ativa a MLCK, enzima, que através da transferência

de um grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP), fosforila o sítio regulatório (LC20) da cadeia leve da miosina (MLC). A MLC fosforilada desencadeia o mecanismo de ciclagem das pontes entre os filamentos de actina e miosina, ocorrendo o deslizamento destes filamentos com conseqüente desenvolvimento de força ou contração do músculo (JOHNSON; SNYDER, 1995). A diminuição dos níveis de Ca^{2+} para os níveis basais desativa a MLCK. O relaxamento do músculo liso ocorre através da ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que defosforila a LC20. Esta reação é relativamente lenta, por isso as contrações do músculo liso são tipicamente mais sustentadas e dissipam-se mais lentamente que as do músculo estriado (GARRET; GRISHAM, 1995).

Um dos mecanismos envolvidos no relaxamento muscular é a hiperpolarização de membrana que pode ocorrer em função da liberação do óxido nítrico (NO), que ativa diretamente a guanilil ciclase (GC); ou no caso dos agonistas que induzem relaxamento, ao ligarem-se aos seus receptores promovendo ativação direta da GC ou da adenilil ciclase (AC), resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e monofostato cíclico de adenosina (AMPc), respectivamente. O aumento na [GMPc] ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento da [AMPc]_i ativa tanto a proteína cinase A (PKA) como a PKG, que resulta na ativação de canais para K^+ na membrana plasmática e conseqüente hiperpolarização. A hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através dos canais Ca_v do tipo L, diminuindo portanto a $[Ca^{2+}]_i$, a fosforilação da miosina e por conseguinte a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento farmacomecânico incluem: (1) Aumento na atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase (bomba de Ca^{2+}) tanto do retículo sarcoplasmático (RS) como da membrana plasmática através da PKG, levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_i$; (2) Diminuição da formação do 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e conseqüente diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; (3) Redução da $[Ca^{2+}]_i$ pelo AMPc por diminuir o influxo de Ca^{2+} , indiretamente por hiperpolarização ou por agir diretamente nos Ca_v do tipo L (REMBOLD, 1996).

O endotélio vascular é uma monocamada de células que reveste os vasos sanguíneos e separa a corrente circulatória do músculo liso vascular. Não constitui simplesmente uma membrana de diálise, mas possui intensa atividade metabólica, estando envolvido na síntese e/ou no metabolismo de diversos mediadores endógenos tais como o NO, as prostaglandinas e as endotelinas.

Diversas substâncias derivadas do endotélio parecem estar envolvidas na modulação fisiológica do controle local do tônus e do fluxo vascular: a) substâncias vasodilatadoras – NO e a prostaciclina (PGI₂); b) substâncias vasoconstritoras – endotelinas e tromboxano A₂, por exemplo. Estas substâncias, que são em alguns casos produzidas continuamente pelas células endoteliais em pequenas quantidades, podem ser liberadas em quantidades bem maiores por estímulos mecânicos e humorais (BEVAN; HENRION, 1994).

A descoberta de fatores endógenos derivados do endotélio, em especial o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), iniciou um novo capítulo na compreensão dos mecanismos das doenças cardiovasculares e dos métodos de prevenção e tratamento, o qual foi originalmente identificado como um fator endotelial relaxante do músculo liso vascular, sendo um importante mediador da sinalização intracelular em vários tecidos (SOUZA et al., 2007).

O óxido nítrico é um mediador generalizado produzido em diversos tecidos biológicos por uma das três isoformas de NO-sintase (NOS) (GUIX et al. 2005; ŠIMKO et al., 2007). Três isoformas de NOS foram descritas até hoje, sendo as isoformas endotelial (NOS₁) e neuronal (NOS₃) denominadas constitutivas (cNOS), ao passo que a NOS₂ é conhecida com NOS indutiva (iNOS). A cNOS produz NO em quantidades pico-nanomolares por curtos períodos, por mecanismo dependente de cálcio, enquanto a iNOS produz NO em grande quantidade e por longo tempo, uma vez que ocorra ativação celular por estímulos inflamatórios como citocinas e lipopolissacarídeo. A produção de NO via cNOS está relacionada à homeostase, enquanto a produção de NO via ativação da iNOS está ligada a fenômenos fisiopatológicos (ROCHA et al., 2003).

A sintase do NO endotelial ou tipo-III (eNOS ou NOS-III) foi originalmente identificada no endotélio vascular, e sua ativação regula a resistência vascular, sendo Ca^{2+} /calmodulina dependente. No sistema nervoso central (SNC) está predominantemente presente no endotélio dos vasos cerebrais, em algumas populações de neurônios (DINERMAN et al., 1994) e em células da glia (WIENCKEN; CASAGRANDE, 1999).

O NO, além de sua potente ação vasodilatadora, promove outros importantes efeitos vasculares, renais e cardíacos, incluindo a ação antiagregante plaquetária, a modulação do ritmo de filtração glomerular e o efeito sobre os remodelamentos vascular e cardíaco (BARTUNEK et al., 2000; HU et al., 2005). Por sua vez, a diminuição endógena da produção do NO pode estar relacionada à redução da vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, diabete ou arteriosclerose (MONCADA; HIGGS, 1993).

1.2. Plantas medicinais X Etnofarmacologia

Desde a origem dos tempos, o homem faz uso de produtos naturais para curar suas enfermidades, sejam eles de origem vegetal, animal ou mineral. Durante tempos, indígenas, curandeiros e religiosos detiveram o conhecimento do uso das plantas medicinais; conhecimento este que chegou às mãos dos boticários, que foram preparando fórmulas cada vez mais especializadas (SIMÕES et al., 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (LÓPEZ, 2006).

A definição mais aceita da Etnofarmacologia é "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem" (SIMÕES et al., 2003). Como estratégia para investigação de plantas medicinais, a abordagem

etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal, com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados (SIMÕES et al., 2003).

Portanto, o conhecimento necessário para se compreender que a razão pela qual as plantas curam está em substâncias presentes em sua composição, e não por magia ou outros aspectos sobrenaturais, teve de esperar o desenvolvimento científico, o qual gerou a metodologia necessária para o estudo da química e das atividades biológicas dos produtos naturais (FARNSWORTH; MORRIS, 1976).

Um exemplo de pesquisa etnofarmacológica é o raciocínio seguido por Dahanukar e Thatte (1997) quanto aos *rasayana* usados na medicina ayurveda. *Rasayana* é um tipo de terapia com a qual se obtém longevidade, recupera-se a juventude, melhora-se a memória e o desempenho intelectual, e livra-se de doenças. Formulou-se a hipótese de que as plantas consideradas como *rasayanas* estariam modulando um sistema endógeno no organismo, e concluíram que é possível que os *rasayanas* ativem principalmente células do sistema imune, levando à secreção de citocinas que, por sua vez, atuam em múltiplos alvos celulares produzindo o conjunto de efeitos descritos para estes tratamentos.

Mesmo entre os produtos farmacêuticos industrializados, grande parte dos produtos tem sua origem a partir de produtos naturais. Muitas das substâncias utilizadas para fins medicamentosos, especialmente as de origem vegetal, encontram uso em diversas áreas aplicadas à saúde e também à alimentação (MATOS, 1997). Contudo, devido ao grande desenvolvimento da indústria farmacêutica no final da Segunda Guerra Mundial, com o avanço da Química Fina e o desenvolvimento de novos sais a partir da síntese química, houve quase um esquecimento do uso de plantas medicinais nos grandes centros urbanos. Porém, hoje, por explicações de natureza econômica e mercadológica, o interesse, em todo o mundo, em torno do emprego dos vegetais está redobrado. Contudo, em centros urbanos menos desenvolvidos houve sempre forte dependência em relação às plantas medicinais (GALVÃO, 1997; LANDINI, 1998).

1.3. A família Malvaceae

A família Malvaceae, pertence à ordem Malvales e está constituída por 243 gêneros e 4225 espécies (STEVENS, 2003), que se apresentam como ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores (BARACHO, 1998). Espécies desta família são amplamente distribuídas em quase todo o mundo, com exceção de regiões muito frias, ocorrendo predominantemente nas regiões tropicais, principalmente na América do Sul (HEYWOOD, 1993). No Brasil, a família Malvaceae está representada por cerca de 35 gêneros e 400 espécies, disseminadas por todas as regiões do país (BARROSO et al., 1991).

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

A literatura científica relata o uso de espécies do genero *Sida* na medicina popular para uma infinidade de enfermidades, dentre elas: febres (HANSEN et al., 1995; BORK et al., 1997; FREI et al., 1998; SHINWARI; KHAN, 2000; SCARPA, 2004), malária (BANZOUZI et al., 2004; IGNACIMUTHU et al., 2006), furúnculos (HARSHA et al., 2003), asma (KRISHNARAJU et al., 2006; MEDEIROS et al., 2006), afecções do trato respiratório (PEIXOTO, 2007), congestão nasal (MEDEIROS et al., 2006), abscessos (HANSEN et al., 1995; NOVY, 1997), dores de dente (BORK et al., 1997; ALBUQUERQUE et al., 2007), ferimentos (TAYLOR et al., 1996a; TAYLOR et al., 1996b; MANANDHAR, 1998; KATEWA et al., 2004; SOUZA et al., 2004; MUTHU et al., 2006; GIDAY et al., 2007; LEHMAN et al., 2007), picadas de cobra (OTERO et al., 2000a; OTERO et al., 2000b; OTERO et al., 2000c; COE; ANDERSON, 2005), leucorréia (JADHAV; BHUTANI, 2005), dismenorréia (NOUMI et al., 1999; JADHAV; BHUTANI, 2005),

anorexia (BALACHANDRAN; GOVINDARAJAN, 2005), aftas (SCARPA, 2004), infecções do trato urinário (SCARPA, 2004; SOUZA et al., 2004), pitiríase (SOUZA et al., 2004; SAIKIA et al., 2006), úlcera péptica (NOUMI; DIBAKTO, 2000), disenterias (ALI, 1999; NOUMI; YOMI, 2001; PEIXOTO, 2007), mal de Parkinson (NAGASHAYANA et al., 2000), micoses (HAMILL et al., 2003), reumatismo (DI STASI et al., 2002), hipertensão (NOUMI et al., 1999), e dificuldade no trabalho de parto, devido propriedade abortiva (ONG; NORZALINA, 1999; KAMATENESI-MUGISHA; ORYEM-ORIGA, 2007; TEKLEHAYMANOT et al., 2007). Possui ainda propriedades tônica (HANSEN et al., 1995), estomáquica (HANSEN et al., 1995; SCARPA, 2004), adstringente (HANSEN et al., 1995; SHINWARI; KHAN, 2000), anti-inflamatória (KRISHNARAJU et al., 2006; MEDEIROS et al., 2006; PEIXOTO, 2007), hipoglicêmica (MEDEIROS et al., 2006), diurética (HANSEN et al., 1995; SHINWARI; KHAN, 2000; SCARPA, 2004; MEDEIROS et al., 2006), e demulcente (HANSEN et al., 1995; SHINWARI; KHAN, 2000).

As seguintes atividades farmacológicas foram relatadas na literatura para o gênero *Sida*: anti-inflamatória (DUNSTAN et al., 1997; VENKATESH et al., 1999; FRANZOTTI et al., 2000), analgésica (BORK et al., 1997; VENKATESH et al., 1999; FRANZOTTI et al., 2000; MALAIRAJAN et al., 2006), anti-malárica (BANZOUZI et al., 2004; IGNACIMUTHU et al., 2006), antimicrobiana (TAYLOR et al., 1996a; TAYLOR et al., 1996b; VALSARAJ et al., 1997; SHINWARI; KHAN, 2000; VUUREN; VILJOEN, 2006), anti-fúngica (MEDEIROS et al., 2006; RUNYORO et al., 2006), antiviral (MEDEIROS et al., 2006), citotóxica (ISLAM et al., 2003), inibidora *in vitro* da enzima conversora de angiotensina (HANSEN et al., 1995), hipotensora e bradicárdica (SILVEIRA et al., 2003; SANTOS, 2005; MEDEIROS et al., 2006), antioxidante (AUDDY et al., 2003; SILVA et al., 2006), vasorrelaxante (SANTOS et al., 2006), depressora do SNC (FRANCO et al., 2005), atividade ocitócica em útero de ratas (LUTTERODT, 1988a; LUTTERODT et al., 1995) e atividade muscarínica em íleo de cobaia e duodeno de coelho (LUTTERODT, 1988b).

Estudos de toxicidade realizados para a espécie *Sida cordifolia* L. apontam para uma toxicidade muito baixa em camundongos (FRANZOTTI et al.,

2000) e em *Artemia salina* (KRISHNARAJU et al., 2006). A ingestão da espécie *Sida carpinifolia* L.f. (= *Sida acuta* Burm.) por ovinos, caprinos e equinos causa intoxicação por doença de armazenamento lisossomal, por ação do alcalóide swainsonina (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al. 2002; LORETTI et al., 2003), além de desordens neurológicas (TOKARNIA et al., 2002; LORETTI et al., 2003). Contudo, muitos dos usos medicinais e atividades farmacológicas relacionadas são atribuídos a esta espécie.

Estudos fitoquímicos do gênero *Sida* relatam a presença de alcalóides (DUNSTAN et al., 1997; MEDEIROS et al., 2006), dentre eles a criptolepina, em *Sida acuta* Burm., com potente atividade antimalárica (BANZOUZI et al., 2004); a sidaverina, em *Sida veronicaefolia* Lam., com atividade contrátil em útero isolado de ratas (LUTTERODT et al., 1995); a vasicina, em *Sida cordifolia* L., com atividade hipotensora e bradicárdica (SANTOS, 2005); e as substâncias efedrina, pseudo-efedrina, vasicinona, e vasicinol, com atividade broncodilatadora, além de esteróides, saponinas (MEDEIROS et al., 2006), flavonóides (LUTTERODT, 1988a; MEDEIROS et al., 2006; SILVA et al, 2006), fitoecdisteróides (DINAN et al. 2001; DARWISH; REINECKE, 2003), betaínas (GORHAM, 1996; BLUNDEN et al., 2001; BLUNDEN et al., 2005), e polifenóis (LUTTERODT, 1988a).

Em virtude do uso popular de algumas espécies do gênero *Sida* como anti-hipertensivo e das referidas atividades farmacológicas encontradas, frente à inexistência de estudos na literatura científica sobre a espécie *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Figura 1) e seus efeitos sobre o sistema cardiovascular, faz-se necessário caracterizá-los, a fim de verificar a participação e importância desta espécie no tratamento de enfermidades relacionadas.



Figura 1. *Sida santaremnensis* H. Monteiro (OLIVEIRA; ARCANJO, 2009).

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar e caracterizar o efeito vasorrelaxante produzido pelo extrato etanólico obtido de partes aéreas de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) (Ssan-EtOH) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar o potencial toxicológico do extrato Ssan-EtOH através da investigação da citotoxicidade em eritrócitos de ratos e do teste de toxicidade aguda em camundongos, para determinação da DL₅₀.

- Investigar o efeito relaxante de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, dando ênfase para a avaliação do papel do endotélio vascular e dos fatores relaxantes por ele liberados.

- Verificar a influência dos canais de cálcio sensíveis a voltagem no efeito vasorelaxante induzido por Ssan-EtOH.

Material e Métodos



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes” da Universidade Federal do Piauí (UFPI), mantidos sob condições controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água.

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFPI, parecer número 04/2008.



Figura 2. *Rattus norvegicus*.

3.2. Drogas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L (-) fenilefrina, sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina, N^{G} -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), indometacina, hidroxocobalamina e tetraetilamônio (TEA) (todas da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para a preparação das soluções estoques, a indometacina foi dissolvida juntamente com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 5% em água destilada e as demais drogas foram dissolvidas somente em água destilada. Todas as soluções foram armazenadas a 0°C .

3.3. Soluções Nutritivas

Para a preparação das soluções nutritivas baseou-se na metodologia desenvolvida por Tanaka et al. (1999). Foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). No preparo das soluções despolarizantes de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM ou 80 mM, a concentração de Na^+ foi isosmoticamente alterada. Nas soluções nominalmente sem cálcio apenas omitiu-se o CaCl_2 . Após o preparo das soluções mediu-se o pH e ajustou-se para 7,4, quando necessário.

As tabelas a seguir mostram as composições das mesmas:

TABELA 1: Composição da solução de Tyrode.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

TABELA 2: Composição da solução de Tyrode despolarizante - KCl (20 mM).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

TABELA 3: Composição da solução de Tyrode despolarizante - KCl (80 mM).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	60,5
KCl	80,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

TABELA 4: Composição da solução de Tyrode despolarizante - KCl (60 mM).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	80,2
KCl	60,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

TABELA 5: Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	--
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

TABELA 6: Composição da solução de Tyrode despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	80,2
KCl	60,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	--
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

3.4. Coleta, identificação do material botânico e preparação de extratos

A coleta do material botânico foi realizada no Parque da Cidade, em Teresina-PI, e a espécie identificada e depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob exsicata n.º 21.867. O extrato etanólico bruto de *Sida santaremnensis* (Ssan-EtOH) foi preparado a partir das partes aéreas (caule, folhas e flores) por maceração em etanol, e fornecido por colaboradores do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

3.5. Avaliação do potencial toxicológico agudo e citotóxico de Ssan-EtOH

3.5.1. Determinação da Toxicidade Aguda

Para a determinação da DL₅₀, foram administradas doses orais de Ssan-EtOH a camundongos, até no máximo 2 g/kg (Resolução-RE Nº 90, de 16/03/2004 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Ministério da Saúde, Brasil), e foram feitas observações para a avaliação da atividade autônoma, atividade motora e reflexos a cada 30 min., durante 4 h consecutivas. A ocorrência de morte em cada grupo foi verificada após 24, 48 e

72 h para a determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

3.5.2. Atividade hemolítica

Esse procedimento seguiu a metodologia descrita por Rangel et al. (1997). Para a obtenção do sangue, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, decapitados e o sangue coletado imediatamente em um béquer com 30 mL de solução de salina 0,9% com CaCl₂ 10 mM sob agitação. As hemácias foram lavadas duas vezes por centrifugação a 5000 rpm/3 min. O sedimento da última centrifugação foi ressuspensão a 0,5% em salina e borbilhada com mistura carbogênica por 30 min. A atividade hemolítica foi avaliada para as concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL de Ssan-EtOH. A montagem dos tubos foi feita em triplicata para todos os produtos testes nas concentrações desejadas e o volume foi completado para 0,5 mL com solução salina. Para o controle positivo, foi adicionado 100 µL de Triton X-100 1% (100% de hemólise). A cada tubo foi adicionado 100 µL de suspensão de eritrócitos e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Centrifugou-se as amostras a 5.000 rpm durante 3 min., sendo a hemólise medida pela absorbância do sobrenadante a 540 nm.

3.6. Ensaios Farmacológicos

Foram utilizadas abordagens com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando órgãos isolados.

3.6.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. Após uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo, e mantidos em cubas

contendo 6 mL de solução de Tyrode, a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio). Os anéis foram acoplados a alças de aço inoxidável e suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (AECAD 1604, AQCAD 1.4.6., AVS Projetos, SP) para o registro das tensões isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

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



Figura 3. Artéria mesentérica superior isolada de rato.



Figura 4. Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução de Tyrode.



Figura 5. Aparato utilizado para registros de tensões isométricas.

3.6.2. Protocolo experimental para verificação do efeito de Ssan-EtOH frente às contrações induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isoladas de rato

Após um período de estabilização de 60 minutos, foram induzidas duas contrações similares com fenilefrina ($10 \mu\text{M}$) e após a estabilização da segunda contração (30 min), concentrações cumulativas de Ssan-EtOH ($0,1 \mu\text{g/mL}$ – $500 \mu\text{g/mL}$) foram adicionadas às cubas na fase tônica da segunda contração para obtenção de uma curva concentração-resposta, na presença e na ausência de endotélio (Figura 6 A e B). A resposta vasorrelaxante de Ssan-EtOH foi avaliada através dos valores de EC_{50} e $E_{\text{máx}}$ na presença ou na ausência do endotélio vascular. Após a obtenção dos registros controle, foram realizadas curvas para a verificação do efeito vasorrelaxante na presença de algumas ferramentas farmacológicas, descritas a seguir (Figura 7). Para cada tratamento farmacológico, diferentes preparações foram utilizadas.

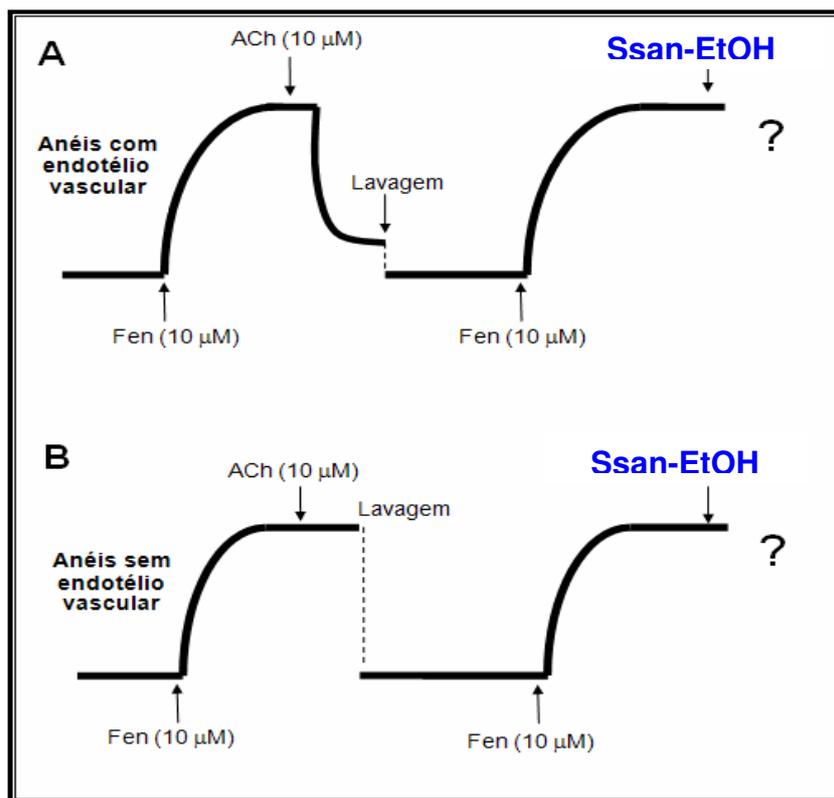


Figura 6. Representação esquemática dos protocolos experimentais para estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) e na ausência (B) do endotélio vascular.

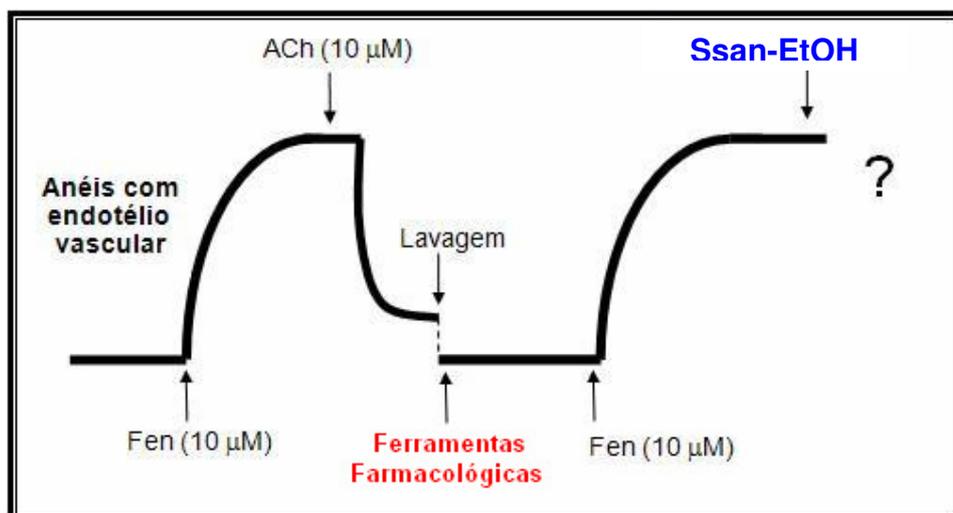


Figura 7. Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito de Ssan-EtOH na presença de algumas ferramentas farmacológicas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular.

3.6.3. Verificação da participação da enzima NO-sintase na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a confirmação da presença de endotélio vascular funcional, as preparações foram pré-incubadas separadamente com L-NAME (100 μ M), um inibidor competitivo da enzima NO-sintase (MONCADA; HIGGS, 1993). Após trinta minutos de incubação, induziu-se uma contração com fenilefrina (10 μ M), e na fase tônica e sustentada desta contração adicionou-se cumulativamente Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) para obtenção de uma curva concentração-resposta. As respostas obtidas foram comparadas com a curva controle, ou seja, na ausência de L-NAME (Figura 6 A). A potência vasorrelaxante do extrato foi avaliada através dos valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ na presença e na ausência de L-NAME.

3.6.4. Verificação da participação de NO na resposta induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a confirmação da presença de endotélio vascular funcional, as preparações foram previamente incubadas com hidroxocobalamina (30 μ M), um sequestrador exógeno de NO (KRUSZYNA et al., 1998). Após 30 minutos induziu-se uma contração cumulativa com fenilefrina (10 μ M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba Ssan-EtOH cumulativamente (Figura 7). A potência vasorrelaxante do extrato foi avaliada através de comparação dos valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ na presença e na ausência de hidroxocobalamina.

3.6.5. Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a confirmação da presença de endotélio vascular funcional, as preparações foram previamente incubadas com indometacina (10 μ M), um inibidor não seletivo da enzima cicloxigenase (COX) (CLARK; FUCHS, 1997).

Após 30 minutos induziu-se uma contração com fenilefrina (10 μ M) e na fase tônica desta contração adicionou-se a cuba Ssan-EtOH cumulativamente (Figura 7). A potência vasorrelaxante do extrato foi avaliada através de comparação dos valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ na presença e na ausência de indometacina (Figura 6 A).

3.6.6. Verificação da participação dos receptores muscarínicos no vasorrelaxamento arterial induzido por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a confirmação da presença de endotélio vascular funcional, as preparações foram previamente incubadas com atropina (1 nM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWYER et al., 1999). Após 30 minutos induziu-se uma contração cumulativa com fenilefrina (10 μ M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba Ssan-EtOH cumulativamente (Figura 7). A potência vasorrelaxante do extrato foi avaliada através de comparação dos valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ na presença e na ausência de atropina.

3.6.7. Avaliação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após confirmação da presença ou da ausência do endotélio vascular a solução de Tyrode da cuba foi substituída por uma solução de KCl 20 mM que permanecia durante todo o experimento. Nesta concentração de potássio externo ocorre uma modulação do efluxo deste íon ocasionando assim uma atenuação do relaxamento induzido por ativadores de canais para potássio (CAMPBELL et al, 1996, CLARK; FUCHS, 1997). Após 20 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M), em seguida adicionou-se cumulativamente Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) na fase tônica desta contração.

Para verificar a atuação direta sobre os canais para potássio, incubou-se em outras preparações TEA 3 mM, que nesta concentração é um bloqueador não-seletivo para estes canais (WANG et al., 2008). A resposta vasorrelaxante do extrato foi avaliada através de comparação dos valores de EC_{50} e E_{max} na presença e na ausência de KCl 20 mM.

3.6.8. Avaliação da resposta contrátil da fenilefrina na presença de concentrações individuais de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular

Após a obtenção de uma curva controle com a fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) a partir de adições cumulativas, as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores ao tônus basal, incubou-se por 30 minutos, separadamente concentrações de Ssan-EtOH (9, 27, 81, 243 e 500 μ g/mL). Após esse processo as preparações foram submetidas novamente a adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de uma segunda curva concentração-resposta (Figura 8). Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença de Ssan-EtOH com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do extrato).

3.6.9. Efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência de endotélio vascular, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 80 mM), que promove uma despolarização da membrana plasmática gerando a ativação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_vL), promovendo o influxo de Ca^{2+} gerando uma contração tônica (REMBOLD, 1996). Este processo foi então repetido com o objetivo de se obter duas contrações com magnitude similar para o KCl 80 mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração com um tempo médio de 30 minutos para a estabilização, foi adicionado à cuba concentrações crescentes de Ssan-

EtOH de maneira cumulativa. A potência vasorrelaxante do extrato foi avaliada através de comparação dos valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ obtidos para KCl 80 mM.

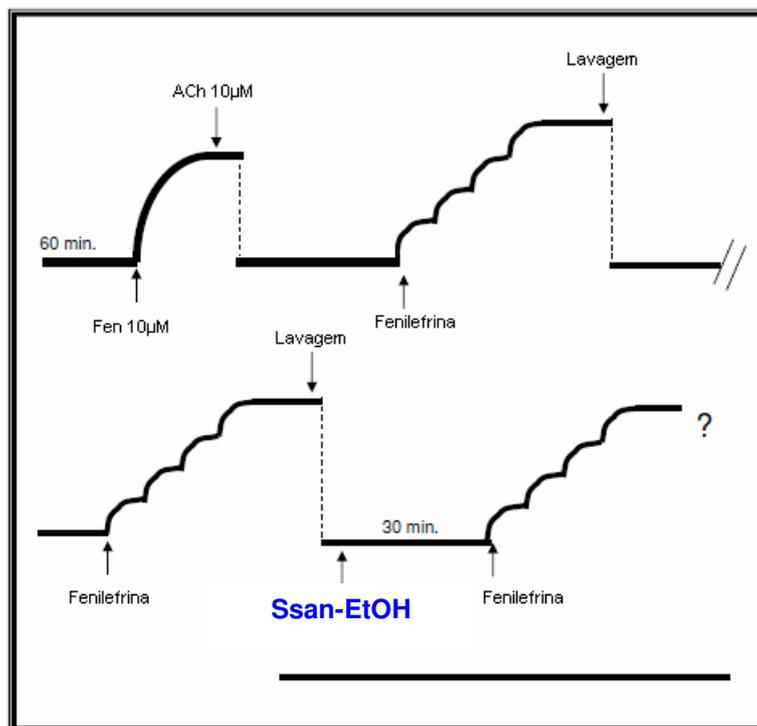


Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre contrações induzidas adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

3.6.10. Efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato

Após verificação da ausência do endotélio vascular, a solução de Tyrode da cuba foi substituída por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 60 mM), para obtenção de duas contrações com magnitude similar. As preparações foram lavadas por uma solução de Tyrode nominalmente sem cálcio e permaneceram nesta solução por 15 minutos. Após este período, as preparações foram lavadas novamente com uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio por mais 15 minutos, e em seguida induziu-se uma curva cumulativa para $CaCl_2$ (10^{-6} – 3×10^{-2} M). Este procedimento foi repetido para construção de uma segunda curva para o $CaCl_2$. Após esse processo foram adicionadas às cubas concentrações isoladas de Ssan-EtOH (9, 27, 81, 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$) por um período de incubação de 30 minutos, decorrido este

tempo induzia-se novamente uma curva cumulativa de CaCl_2 (Figura 9). Os resultados foram avaliados comparando-se a resposta contrátil na presença de Ssan-EtOH com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do extrato).

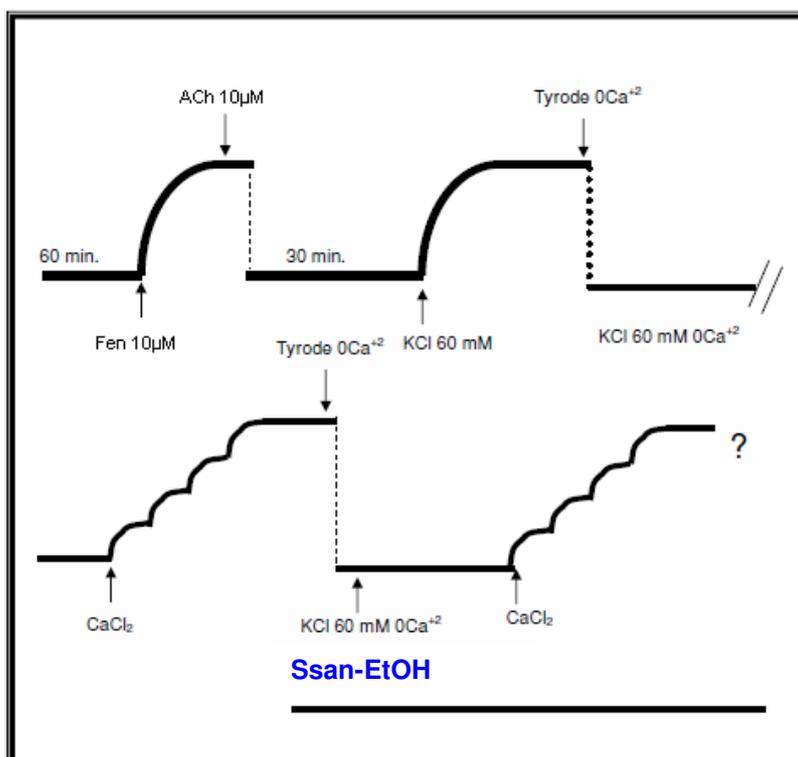


Figura 9. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre contrações induzidas adição cumulativa de CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

3.7. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de EC_{50} foram obtidos através de regressão não-linear das curvas separadamente. As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do Teste t de "Student" para amostras não-pareadas, seguida de Bonferroni, para análise de significância entre as médias. As curvas foram obtidas através de regressão não-linear sigmoidal concentração-resposta com "slope" variado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0,05$. Para todas as análises estatísticas, cálculos de pD_2 , EC_{50} e plotagem das curvas utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do potencial citotóxico e toxicológico agudo

Na avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de ratos, não foi evidenciado atividade lítica até a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1). Nos estudos de toxicidade aguda realizados em camundongos, foi observado que até a dose de 2 g/kg v.o., Ssan-EtOH não induziu morte, nem tampouco modificou os parâmetros comportamentais dos animais, como mostrado na Tabela 6, avaliados separadamente para cada grupo experimental e em diferentes doses. Portanto, não foi possível determinar a DL_{50} .

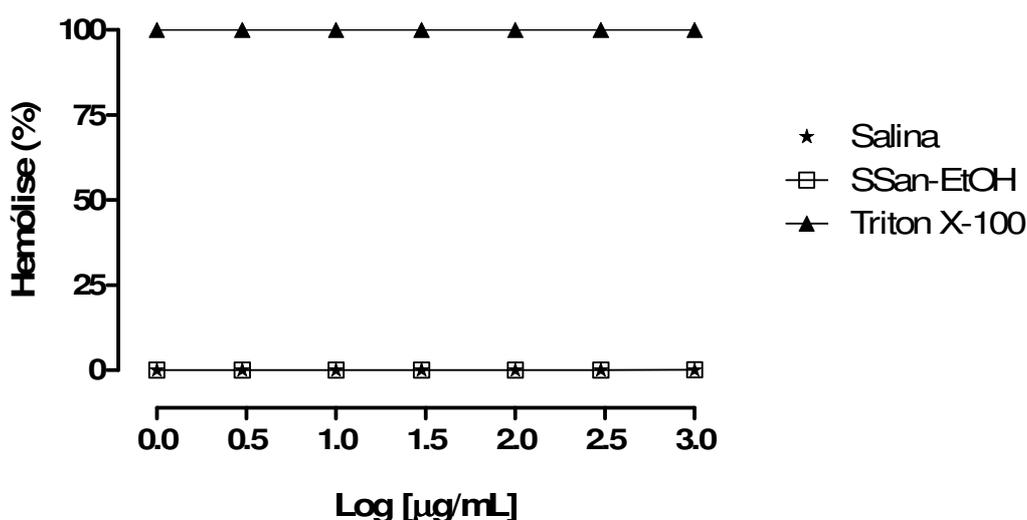


Gráfico 1. Efeito hemolítico em eritrócitos de rato incubados com Ssan-EtOH (1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$), Triton X-100 1% ou Salina.

Tabela 7. Avaliação da atividade comportamental de Ssan-EtOH nas doses de 1000 ou 2000 mg/kg (v.o.) em camundongos Swiss de ambos os sexos.

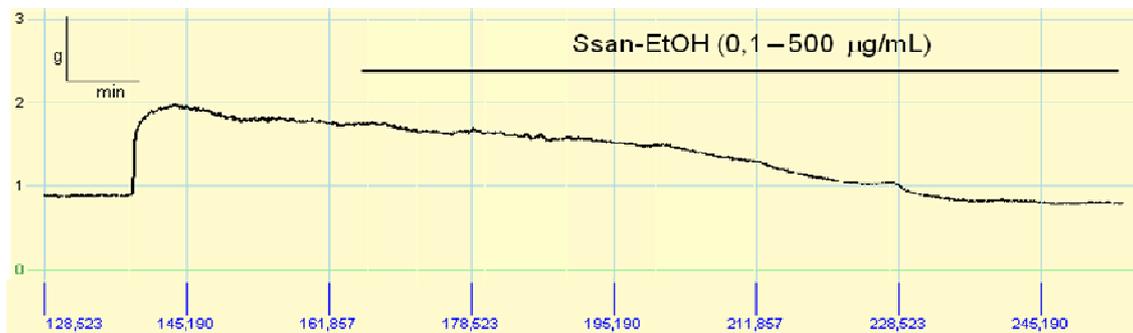
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA NO SNC					
(0) Sem efeito (-) efeito diminuído; (+) efeito aumentado					
ESTIMULANTE	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	0	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
OUTROS					
COMPORTEAMENTOS	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0	0
Contorções Abdominais	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO					
AUTÔNOMO	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
Diaréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0	0
Tônus muscular	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
Força de agarrar	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0

4.2. Estudos farmacológicos

4.2.1. Efeito de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina

O extrato Ssan-EtOH induziu um vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração em preparações de artéria mesentérica com endotélio funcional (Figura 10-A), e nas preparações desprovidas de endotélio (Figura 10-B), a curva concentração-resposta para Ssan-EtOH foi deslocada para a direita de maneira significativa, com aumento significativo na EC_{50} , porém sem alteração no efeito máximo (Gráfico 2; Tabela 7). Após o experimento controle, as preparações foram lavadas por 3 horas e induziu-se então uma contração com fenilefrina para verificação da reversão do relaxamento induzido por Ssan-EtOH, e em todas as preparações houve uma reversão de 100% da resposta.

A



B

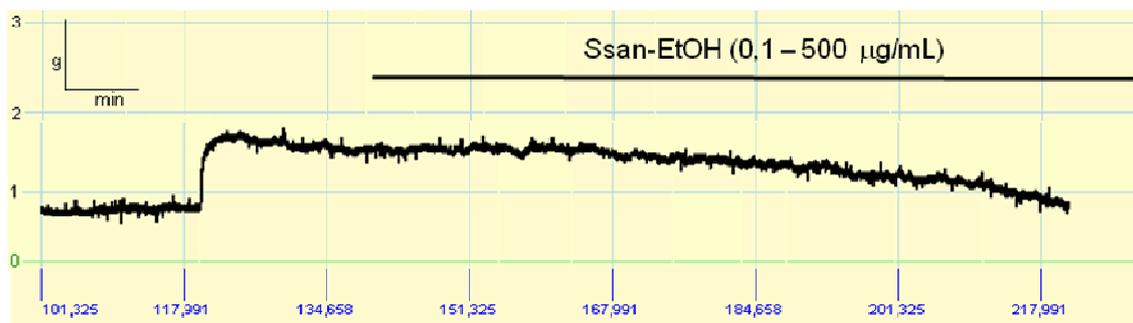


Figura 10. Registros originais da resposta relaxante de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.

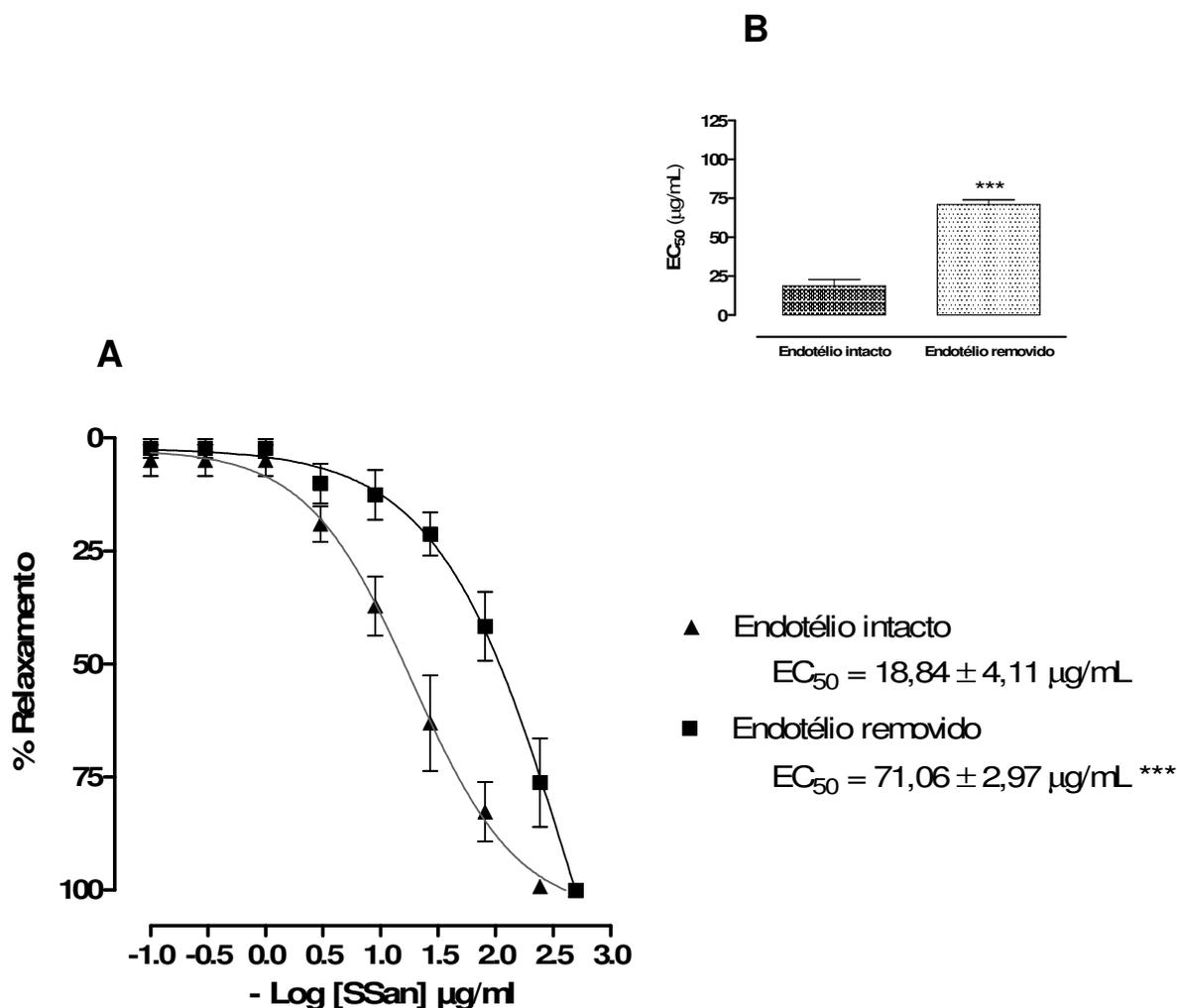


Gráfico 2. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídas com fenilefrina, na presença (▲) ou na ausência (■) do endotélio vascular (A), e respectivos valores de EC₅₀ (B). Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos. ***p<0,001 versus endotélio intacto.

4.2.2. Verificação do efeito de L-NAME na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após a confirmação da presença de endotélio vascular, as preparações foram pré-tratadas com L-NAME (100 μ M) por 30 minutos. Após este período induziu-se uma contração com fenilefrina (10 μ M), na fase tônica e sustentada desta contração administrou-se cumulativamente Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL). Na presença de L-NAME as curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH foram deslocadas para a direita de maneira significativa, com aumento na EC_{50} , porém sem alteração no efeito máximo (Gráfico 3; Tabela 7).

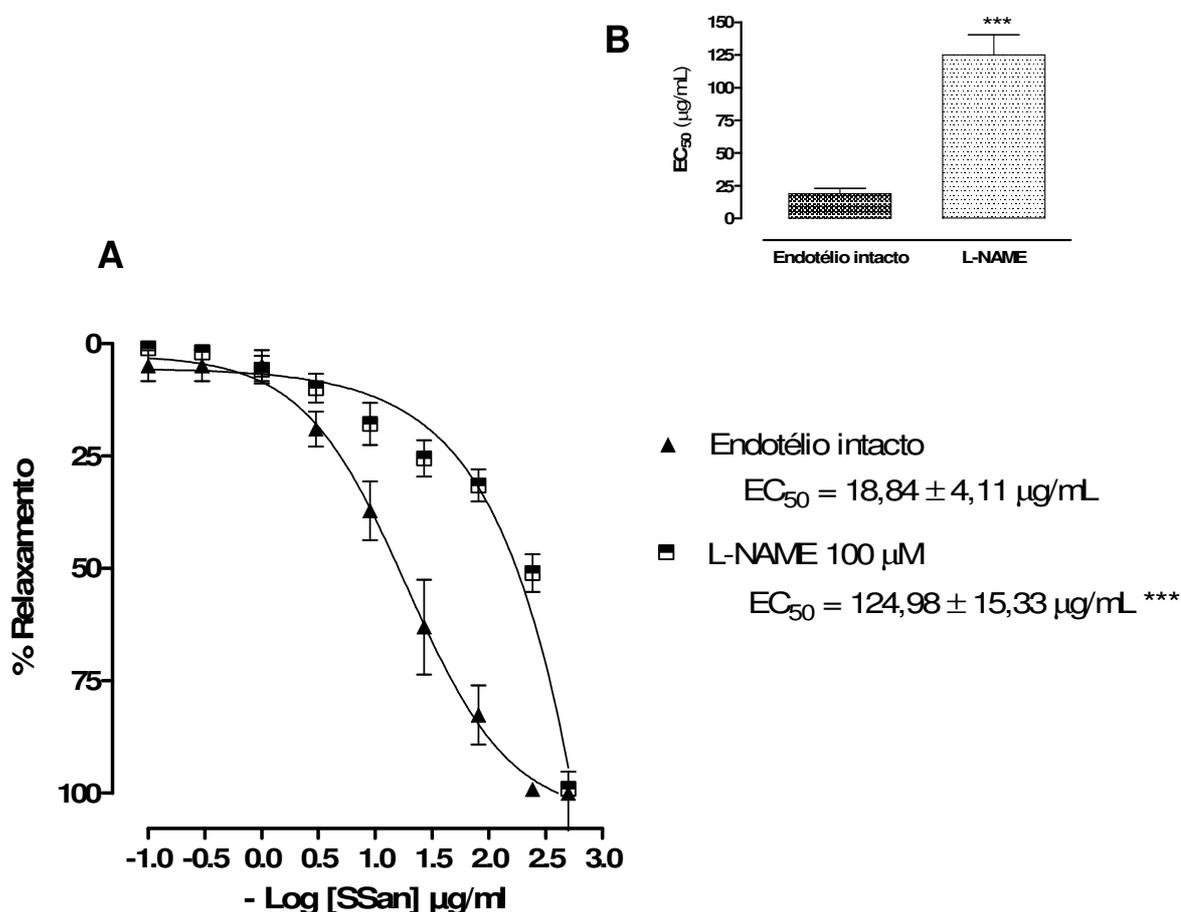


Gráfico 3. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto e pré-contraídas com fenilefrina, na ausência (▲) ou na presença (■) de L-NAME (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 9 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio intacto.

4.2.3. Verificação do efeito de hidroxocobalamina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contraindidos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento por 30 minutos com hidroxocobalamina (30 μ M) não promoveu deslocamento da curva concentração-resposta, não havendo portanto, diferença significativa entre o relaxamento induzido por Ssan-EtOH na presença e na ausência de hidroxocobalamina (Gráfico 4; Tabela 7).

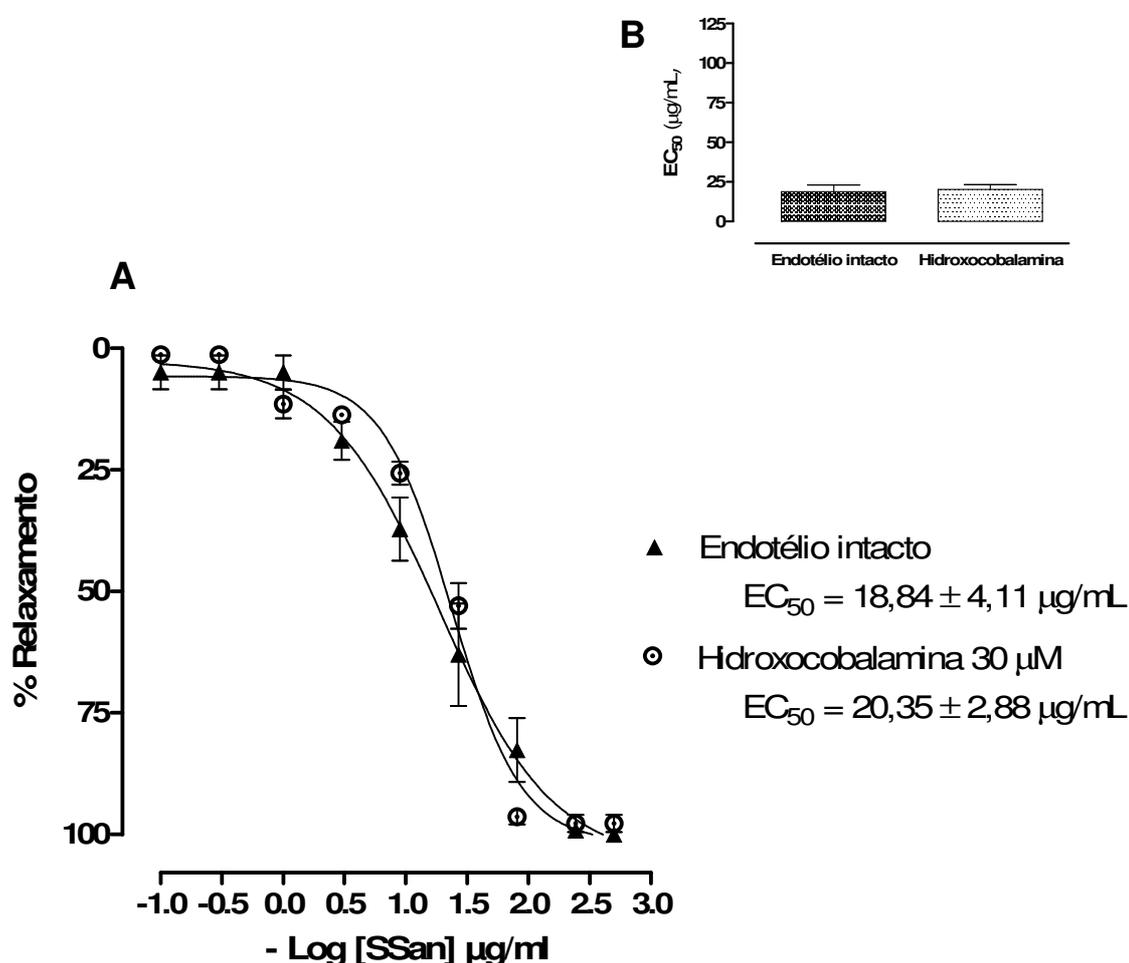


Gráfico 4. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (\blacktriangle) ou na presença (\odot) de hidroxocobalamina (**A**), e respectivos valores de EC_{50} (**B**). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos.

4.2.4. Verificação do efeito de indometacina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento com indometacina (10 μ M) por 30 minutos, promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita caracterizando assim uma atenuação do relaxamento induzido por Ssan-EtOH, com alteração significativa nos valores de $E_{m\acute{a}x}$ (Gráfico 5; Tabela 7).

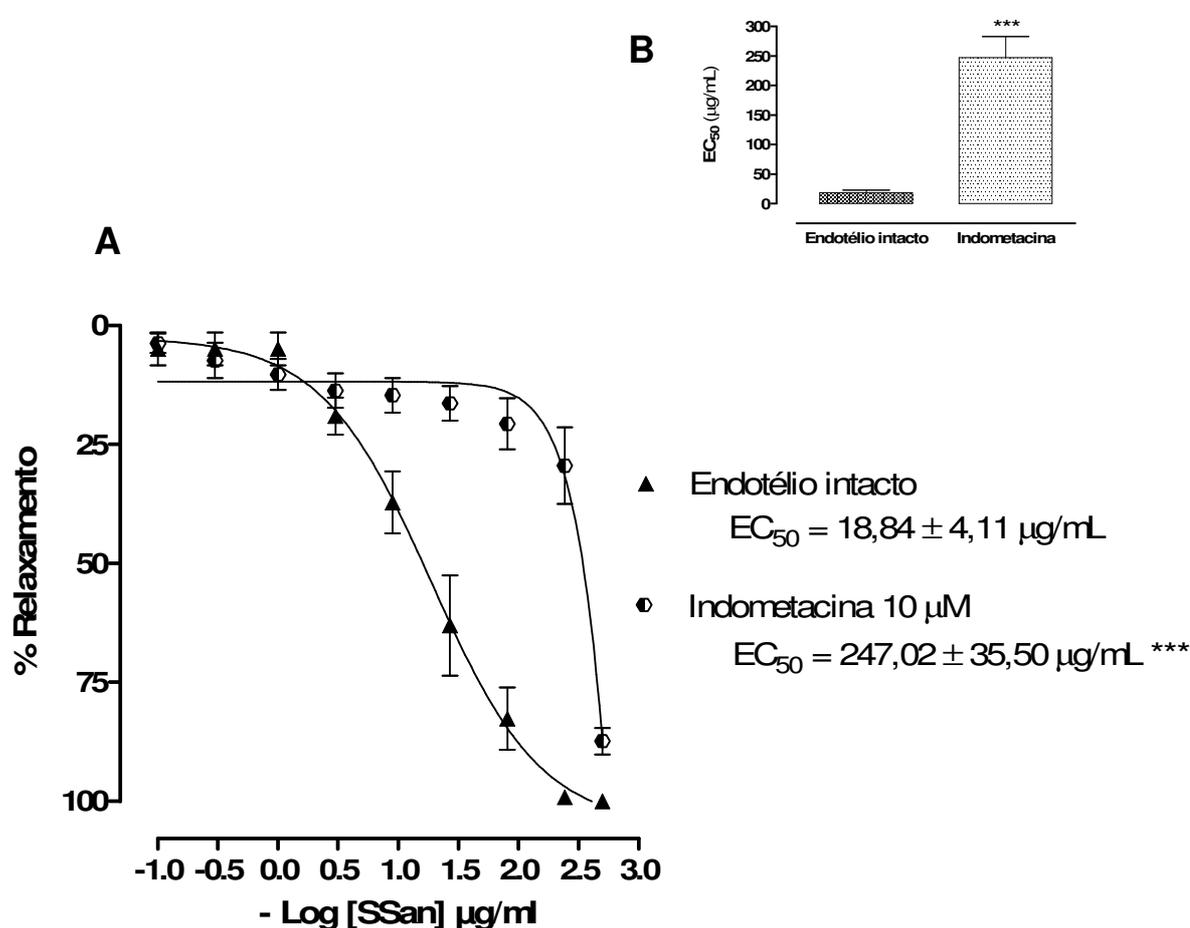


Gráfico 5. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (●) de indometacina (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 7 experimentos. $^{***}p < 0,001$ versus endotélio intacto.

4.2.5. Verificação do efeito de atropina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contráidos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento por 30 minutos com atropina (1 nM) promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita caracterizando uma atenuação do relaxamento induzido por Ssan-EtOH, porém sem alteração no efeito máximo (Gráfico 6; Tabela 7).

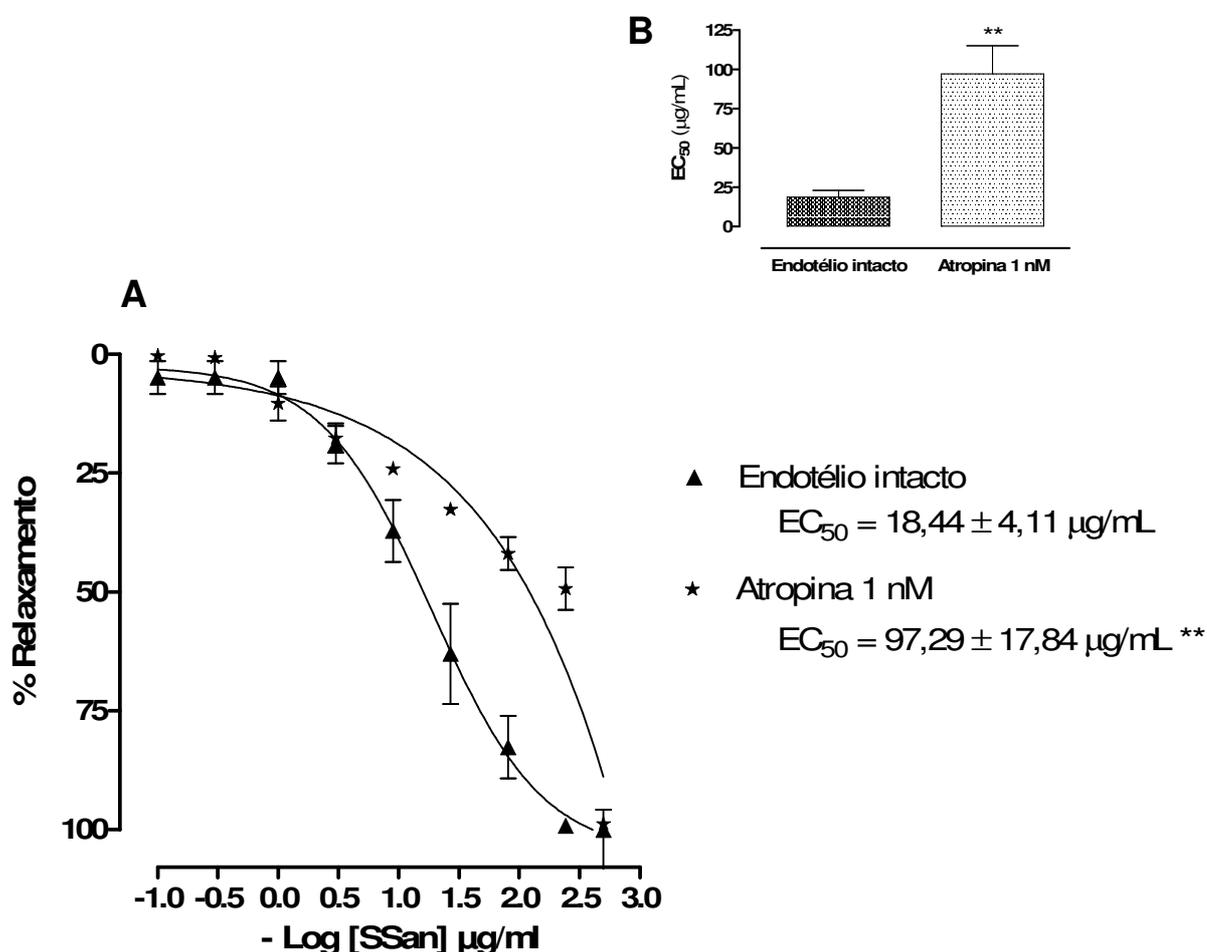


Gráfico 6. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (★) de atropina (A), e respectivos valores de EC₅₀ (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. **p<0,01 versus endotélio intacto.

Tabela 8. Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de EC₅₀ e efeito máximo (E_{máx}) para Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com fenilefrina.

Condição experimental	Valores de EC ₅₀ (μ g/mL)	E _{máx} (% de relaxamento)	n
Controle E+	18,84 \pm 4,11	100,0 \pm 0,0	06
Controle E-	71,06 \pm 2,97 ***	100,0 \pm 0,0	06
L-NAME 100 μ M	124,98 \pm 15,33 ***	99,07 \pm 3,85	09
Hidroxocobalamina 30 μ M	20,35 \pm 2,88	97,75 \pm 1,74	05
Indometacina 10 μ M	247,02 \pm 35,50 ***	87,41 \pm 2,77 *	07
Atropina 1 nM	97,29 \pm 17,84 **	98,8 \pm 3,02	05

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *versus* Controle E+.

4.2.6. Verificação do efeito de KCl 20 mM na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com e sem endotélio funcional

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento por 30 minutos com KCl (20 mM) promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita caracterizando assim uma atenuação do relaxamento induzido por Ssan-EtOH, porém sem alteração no efeito máximo (Gráfico 7; Tabela 8). Entretanto, em preparações com endotélio removido, observou-se uma potencialização da resposta vasorrelaxante em concentrações mais altas de Ssan-EtOH. (Gráfico 8; Tabela 8).

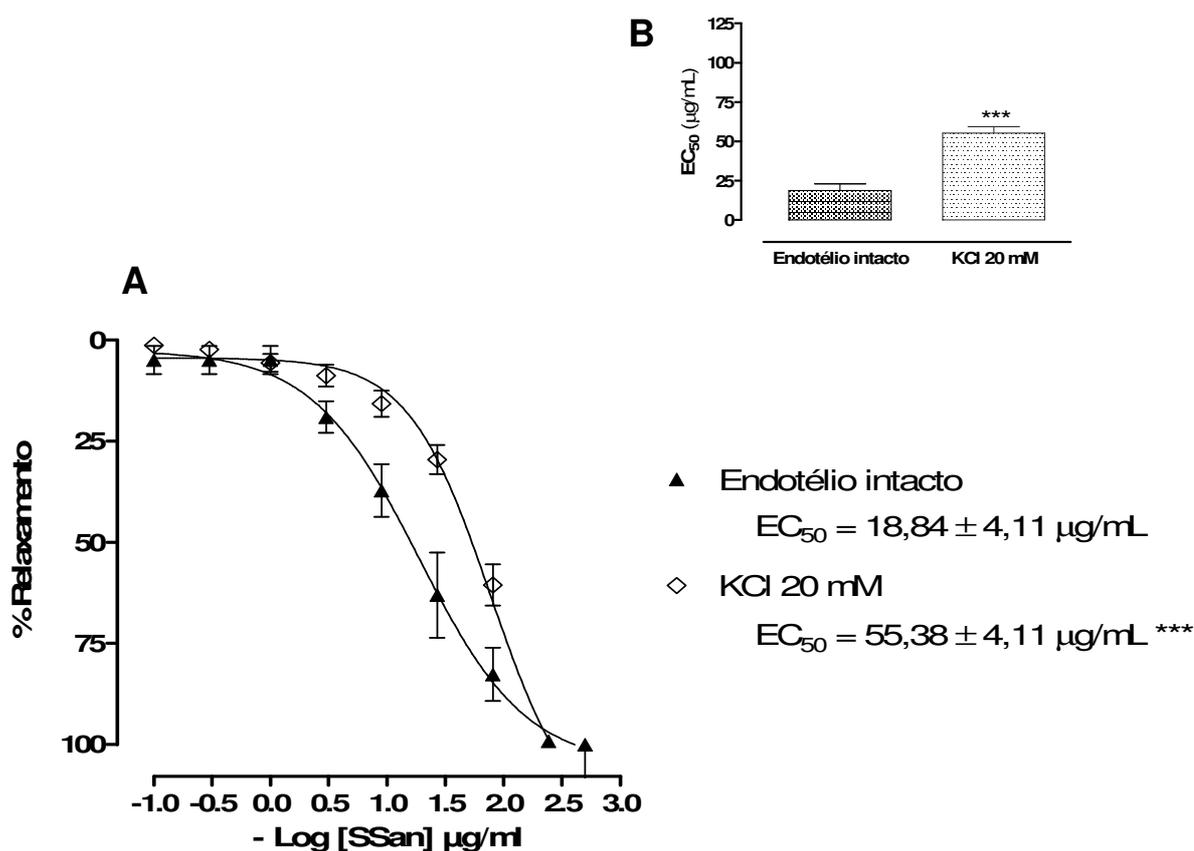


Gráfico 7. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, na ausência (▲) ou na presença (◇) de KCl 20 mM (A), e respectivos valores de EC₅₀ (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 7 experimentos. ***p<0,001 versus endotélio intacto.

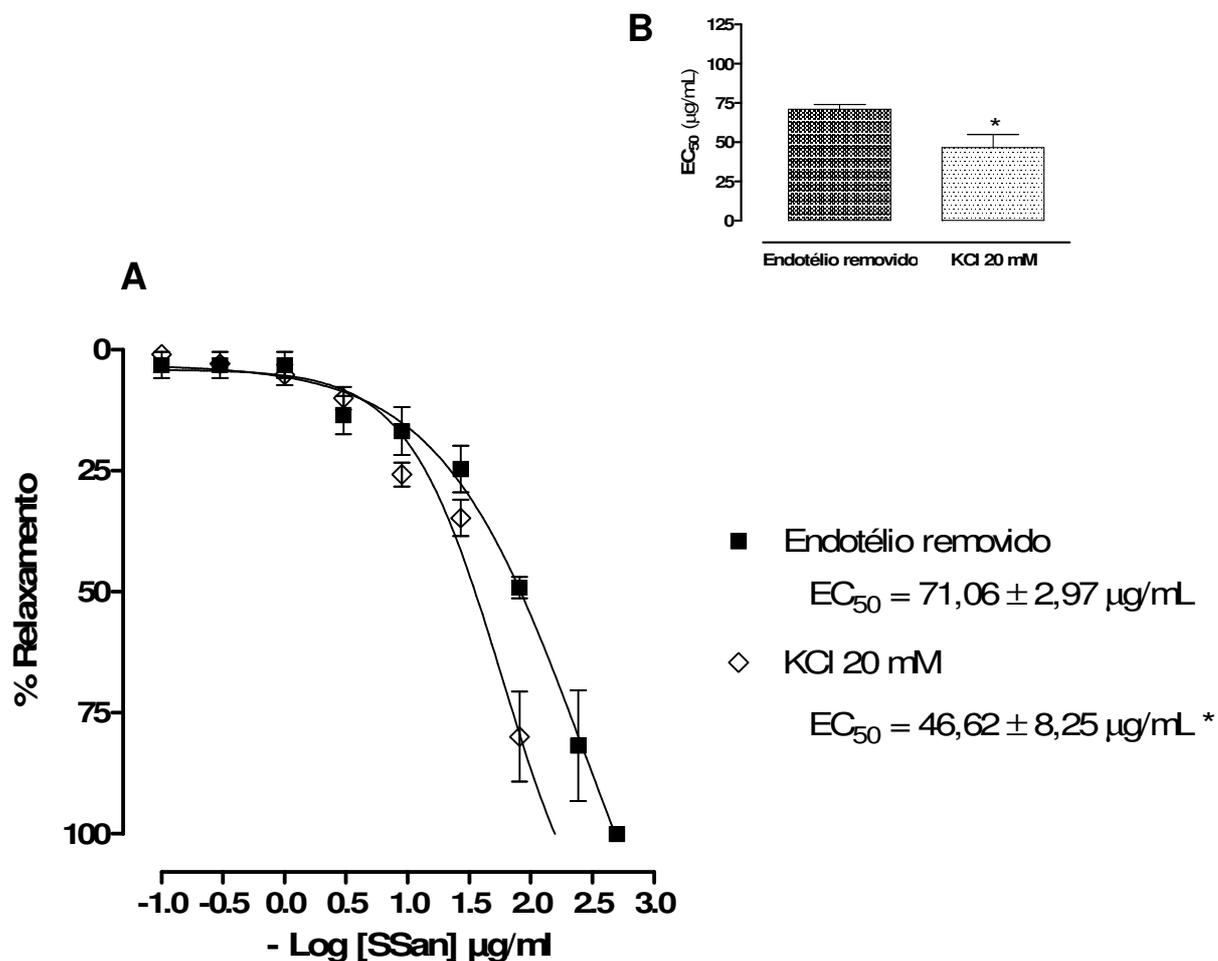


Gráfico 8. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional, na ausência (■) ou na presença (◇) de KCl 20 mM (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 7 experimentos. * $p < 0,05$ versus endotélio removido.

4.2.7. Verificação do efeito de TEA 3 mM na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contraindidos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento por 30 minutos com TEA (3 mM) promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita, similar ao promovido por KCl 20 mM, caracterizando assim uma atenuação do relaxamento induzido por Ssan-EtOH, porém sem alteração no efeito máximo (Gráfico 9; Tabela 8).

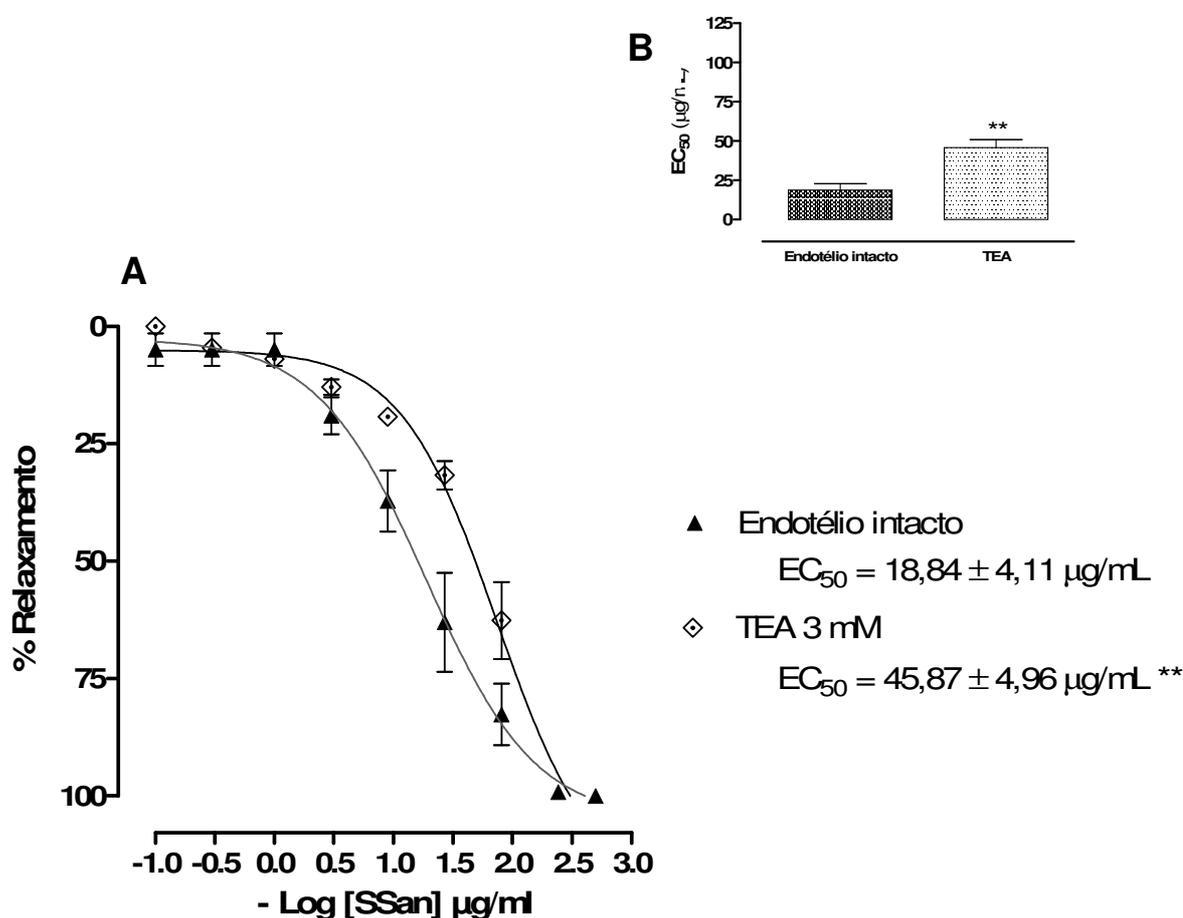


Gráfico 9. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (◇) de TEA 3 mM (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. ** $p < 0,01$ versus endotélio intacto.

4.2.8. Verificação do efeito de L-NAME + Indometacina na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com e sem endotélio funcional

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contráidos com fenilefrina (10 μ M), o pré-tratamento por 30 minutos com L-NAME (100 μ M) e Indometacina (10 μ M) não promoveu deslocamento significativo da curva concentração-resposta para direita (Gráfico 10; Tabela 8), em contraste com o observado com cada um dos bloqueadores separadamente (Gráficos 3 e 5). A adição de TEA 3 mM neste pré-tratamento promove atenuação da resposta vasorrelaxante, porém sem alteração significativa no efeito máximo e na EC_{50} (Gráfico 11; Tabela 8).

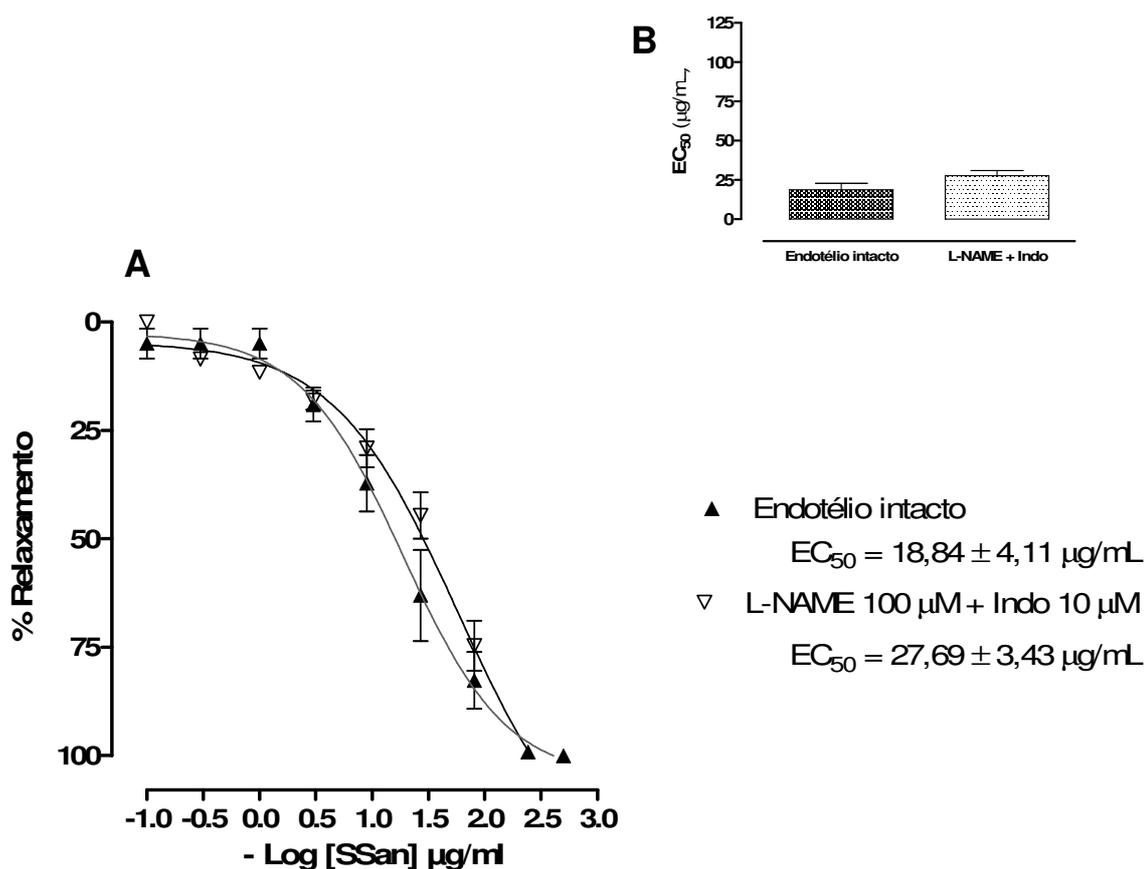


Gráfico 10. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (▽) de L-NAME 100 μ M + Indometacina 10 μ M (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos.

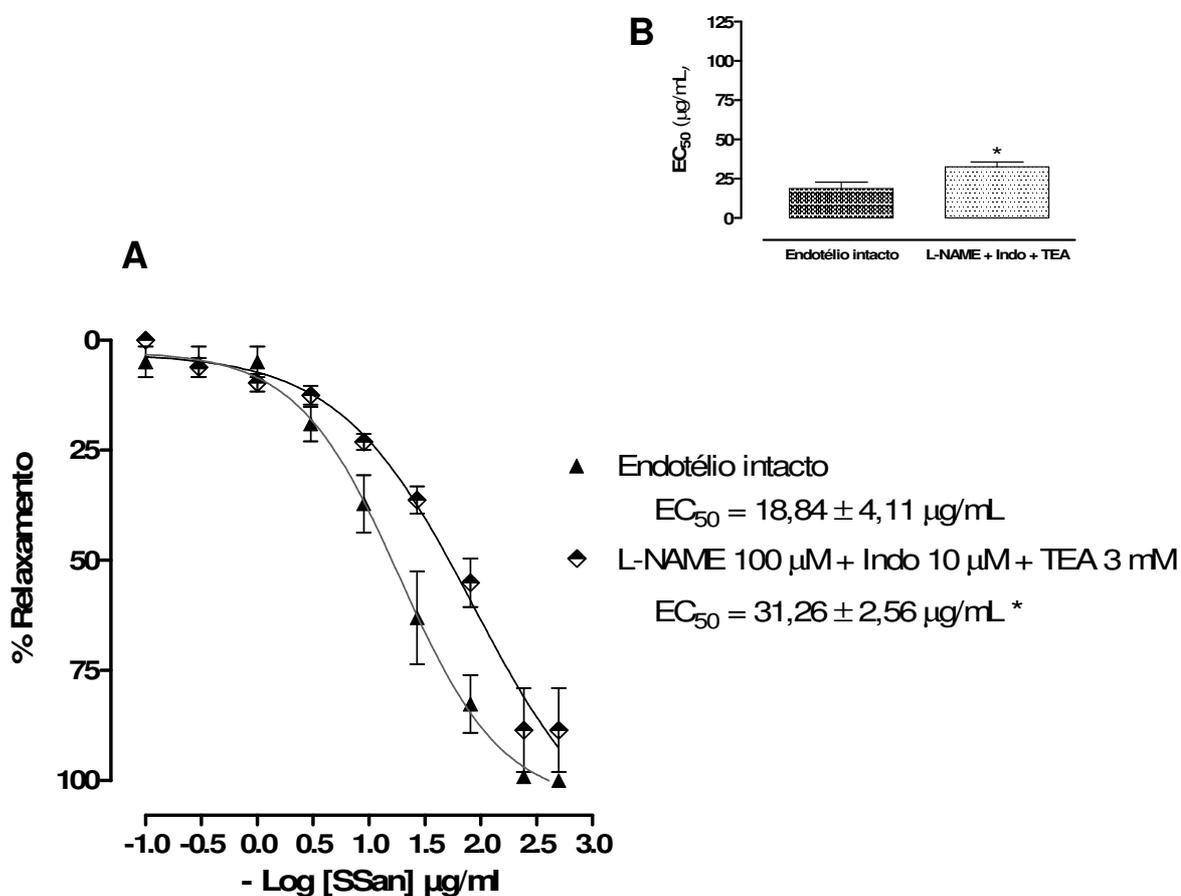


Gráfico 11. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio funcional, na ausência (▲) ou na presença (◆) de L-NAME 100 µM + Indometacina 10 µM + TEA 3 mM (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. * $p < 0,05$ versus controle (endotélio intacto).

Tabela 9. Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de EC₅₀ e efeito máximo (E_{máx}) para Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com fenilefrina para avaliar a participação de canais para potássio.

Condição experimental	Valores de EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	E _{máx} (% de relaxamento)	n
Controle E+	18,84 \pm 4,11	100,0 \pm 0,0	06
Controle E-	71,06 \pm 2,97 ***	100,0 \pm 0,0	06
KCl 20 mM E+	55,38 \pm 4,11 ***	106,32 \pm 5,52	07
KCl 20 mM E-	46,62 \pm 8,25 †	115,97 \pm 3,60	07
TEA 3 mM E+	45,87 \pm 4,96 **	104,99 \pm 5,39	06
L-NAME 100 μM + Indo 10 μM E+	27,69 \pm 3,43	105,50 \pm 8,22	05
L-NAME 100 μM + Indo 10 μM + TEA 3 mM E+	31,26 \pm 2,56 *	88,61 \pm 9,55 *	05

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus Controle E+; † p<0,05 versus Controle E-.

4.2.9. Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, a pré-incubação com Ssan-EtOH (9, 27, 81, 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), havendo ainda um deslocamento da curva para direita com inibição do efeito máximo (Gráfico 12; Tabela 9).

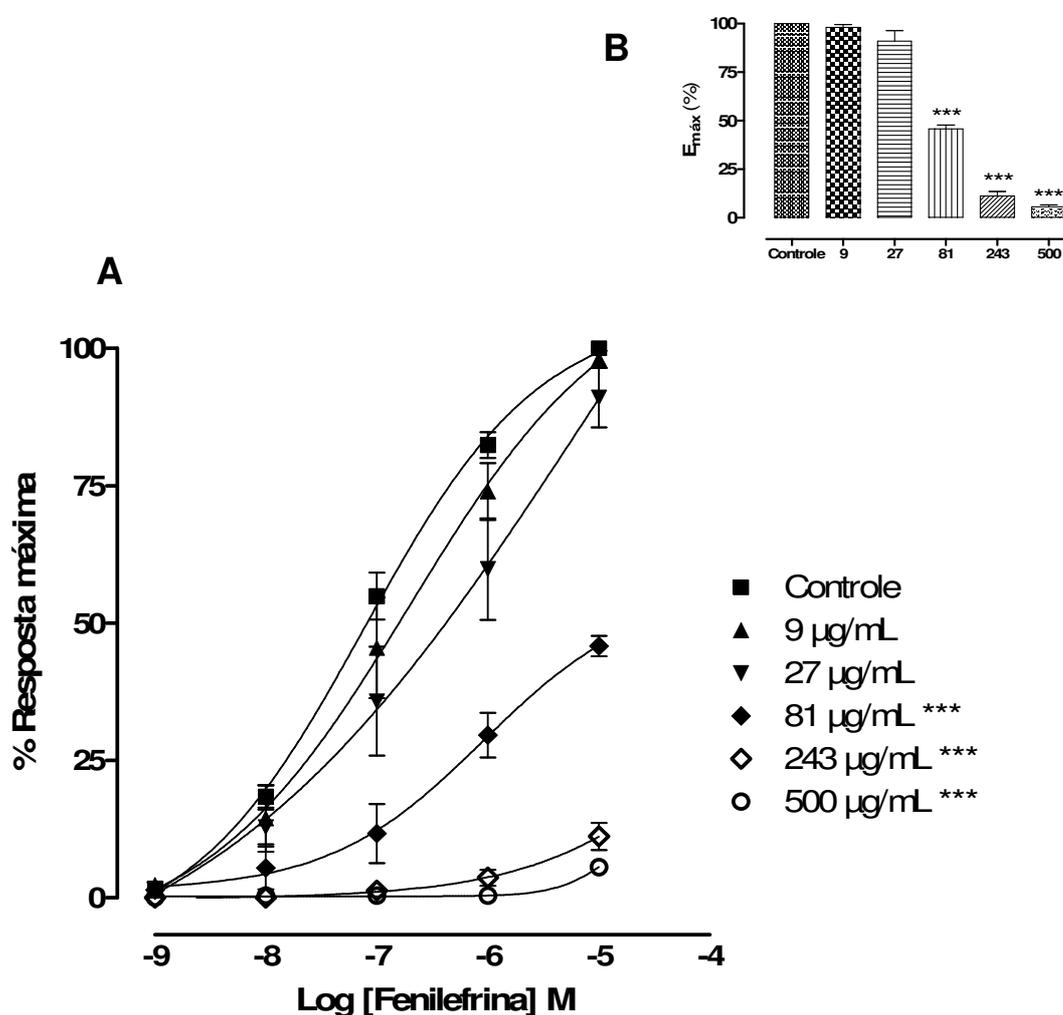


Gráfico 12. Curvas cumulativas para Fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas de Ssan-EtOH (9,0 – 500 $\mu\text{g/mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio (A), e respectivos valores de $E_{\text{máx}}$ (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos por concentração. *** $p < 0,001$ versus controle.

Tabela 10. Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) das contrações induzidas por fenilefrina na presença de Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular.

Ssan-EtOH ($\mu\text{g/mL}$)	Valores de pD_2	E_{max} (%)	n
Controle	$7,03 \pm 0,08$	$100,0 \pm 0,0$	11
9	$6,81 \pm 0,16$	$98,0 \pm 1,59$	05
27	$6,46 \pm 0,25$	$91,04 \pm 5,42$	08
81	$6,44 \pm 0,23$	$45,82 \pm 1,88$ ***	05
243	$6,02 \pm 0,32$ **	$11,15 \pm 2,45$ ***	06
500	$5,62 \pm 0,12$ **	$5,59 \pm 1,05$ ***	05

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus *Controle*.

4.2.10. Efeito do agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio vascular, pré-contraídos com o agente despolarizante KCl 80 mM, a adição cumulativa do Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) promoveu um potente efeito vasorrelaxante dependente de concentração, com relaxamento máximo semelhante ao obtido com contrações induzidas por fenilefrina em preparações com endotélio removido, sem deslocamento da curva ou diferenças nos valores de EC_{50} e $\text{E}_{\text{máx}}$ (Gráfico 13; Tabela 8).

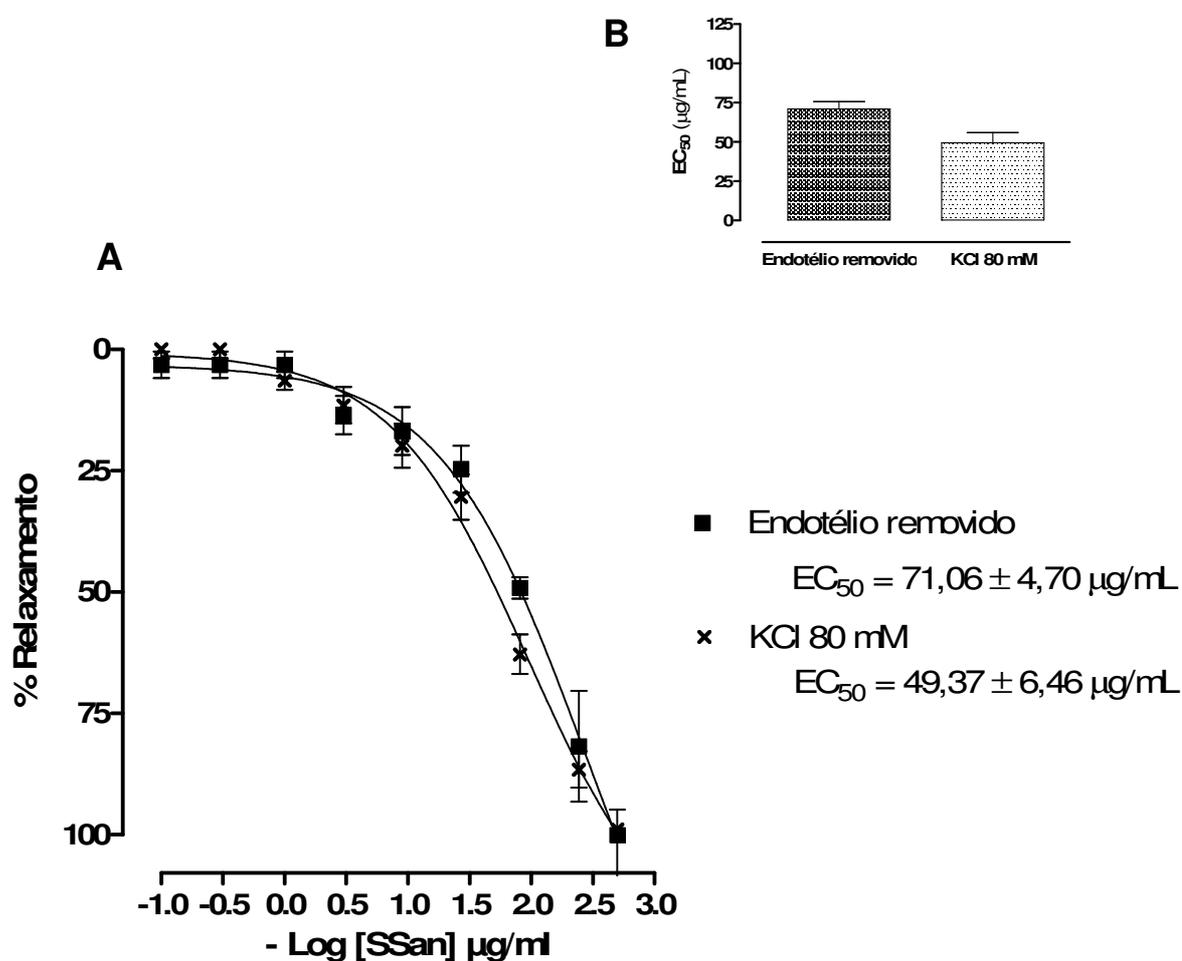


Gráfico 13. Curvas concentração-resposta de Ssan-EtOH (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido, pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) (■) ou KCl 80 mM (×) (A), e respectivos valores de EC_{50} (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos.

4.2.11. Verificação do efeito de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

O gráfico 14 mostra que as curvas concentração-resposta para o CaCl_2 foram deslocadas para direita com redução do efeito máximo na presença de diferentes concentrações de Ssan-EtOH (27, 81, 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis mesentéricos sem endotélio, de modo dependente de concentração. Os níveis percentuais máximo de contração induzida por CaCl_2 na presença das concentrações utilizadas de Ssan-EtOH em ratos estão listados na Tabela 10.

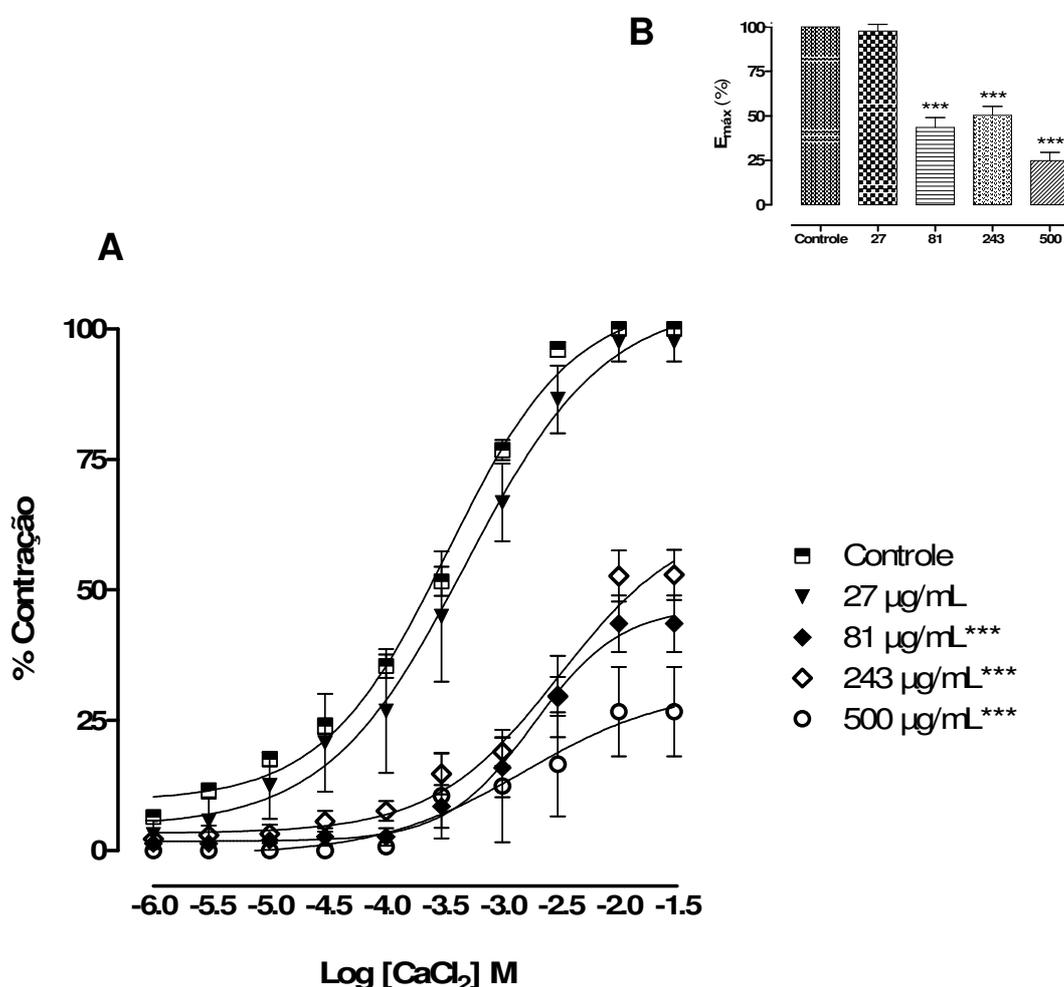


Gráfico 14. Curvas cumulativas para CaCl_2 na presença de concentrações isoladas de Ssan-EtOH (27,0 – 500 $\mu\text{g/mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido (**A**), e respectivos valores de $E_{\text{máx}}$ (**B**). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 - 8 experimentos por concentração.

Tabela 11. Valores numéricos expresso em Média \pm e.p.m dos valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) das contrações induzidas por $CaCl_2$ na presença de Ssan-EtOH em estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência de endotélio vascular.

Ssan-EtOH ($\mu\text{g/mL}$)	Valores de pD_2	E_{max} (%)	n
Controle	$3,61 \pm 0,06$	$100,0 \pm 0,0$	07
27	$3,52 \pm 0,30$	$97,53 \pm 3,78$	05
81	$2,83 \pm 0,23$ *	$43,53 \pm 5,41$ ***	05
243	$2,78 \pm 0,08$ ***	$52,89 \pm 4,80$ ***	06
500	$2,69 \pm 0,24$ ***	$26,68 \pm 3,82$ ***	05

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus *Controle*.

Discussão



5. DISCUSSÃO

Neste estudo realizado em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, observou-se que o extrato etanólico das partes aéreas de *S. santaremnensis*, promoveu um potente efeito vasodilatador. Os vasos de pequeno calibre, como a artéria mesentérica superior, oferecem maior resistência ao fluxo sanguíneo e estão mais amplamente implicados na regulação da pressão capilar, refletindo as evoluções da resistência periférica global (FOLKOW, 1979, 1987; MULVANY; AALKJAER, 1990).

A atividade contrátil de células musculares lisas de artérias e arteríolas é o principal determinante da resistência ao fluxo sanguíneo através da circulação. Assim, o tônus vascular desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e da distribuição do fluxo sanguíneo entre e dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células musculares lisas na circulação sistêmica é dependente de uma complexa interação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, estímulos de hormônios circulantes, neurotransmissores e de fatores derivados do endotélio que regulam a pressão arterial (JACKSON, 2000).

Na avaliação do potencial toxicológico, Ssan-EtOH não apresentou toxicidade quando administrado por via oral (Tabela 6), nem citotoxicidade em eritrócitos de ratos (Gráfico 1), conferindo uma boa margem de segurança para o extrato nas doses testadas.

Em estudos para a avaliação do efeito de Ssan-EtOH sobre a musculatura lisa vascular, observou-se que o extrato induziu vasorrelaxamento dependente e independente de endotélio, de maneira dependente de concentração, verificado com o deslocamento da curva para a direita após a remoção mecânica do endotélio vascular, porém sem alteração no efeito máximo, indicando que há participação de fatores relaxantes derivados do endotélio (Gráfico 2).

O endotélio tem uma função importante na manutenção da homeostasia vascular pela síntese e liberação de vários fatores vasodilatadores incluindo: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fatores

hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF), além de fatores contracturantes como endotelina (MATOBA et al., 2002; KOZA et al., 2007).

Com o objetivo de identificar qual fator derivado do endotélio vascular estaria sendo responsável pela ação vasodilatadora de Ssan-EtOH, foram desenvolvidos experimentos utilizando individualmente as ferramentas L-NAME 100 μ M, hidroxocobalamina 30 μ M, atropina 1 nM e indometacina 10 μ M.

Para avaliar a influência da NO-sintase (NOS) no efeito relaxante induzido por Ssan-EtOH, utilizou-se L-NAME (100 μ M), um inibidor competitivo da NO-sintase (MONCADA e HIGGS, 1993). Nestas condições experimentais o relaxamento da musculatura lisa vascular induzida por Ssan-EtOH foi significativamente atenuado, mas não abolido completamente, sugerindo a participação da enzima NOS, no entanto, outros mediadores derivados do endotélio vascular no efeito vasorrelaxante induzido por Ssan-EtOH não devem ser descartados (Gráfico 3).

NO é uma molécula gasosa que está na maioria dos tecidos do corpo. É formado pela oxidação da L-arginina, resultando na formação de NO e L-citrulina. Este processo é catalisado por três diferentes isoformas da NO-sintase, denominadas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS), e envolve vários cofatores, como Ca^{2+} -calmodulina, NADPH e O_2 . Uma vez formado, o NO difunde-se livremente através das membranas e liga-se à guanilil ciclase solúvel (sGC), ativa a enzima e estimula a produção de guanosina monofosfato cíclica (cGMP). Este segundo mensageiro fosforila a proteína cinase G (PKG), que possui inúmeras funções, incluindo a fosforilação de canais iônicos, resultando na redução dos níveis intracelulares de cálcio. No músculo liso vascular, este estímulo promove relaxamento e vasodilatação. O NO possui um elétron livre (NO^{\bullet}), mas apesar de ser um radical livre, não é tóxico (MARSH; MARSH, 2000; MONCADA; HIGGS, 2006).

A participação do NO foi avaliada pelo pré-tratamento das preparações com hidroxocobalamina (30 μ M), um sequestrador exógeno de NO (KRUSZYNA et al., 1998). Nestas condições o relaxamento induzido pelo extrato não foi significativamente atenuado (Gráfico 4), em contraste com os resultados encontrados com o bloqueio por L-NAME. A hidroxocobalamina

apresenta em sua estrutura uma cobalamina oxidada (Cbl(III)) que captura o NO assim que ele sai da célula endotelial formando o complexo Cbl(III)NO (KRUSZYNA et al. 1998), inativando-o, ou seja, a hidroxocobalamina atua somente sobre o NO extracelular.

A maioria dos efeitos biológicos do NO tem sido atribuída a sua forma NO[•], até a descoberta de uma forma reduzida, o íon nitroxila (NO⁻ ou HNO), com evidências que apontam uma possível produção endógena. O NO[•] e o HNO parecem similares e apresentam potente efeito vasorrelaxante. Contudo, HNO apresenta interações distintas com muitas biomoléculas, interagindo diretamente com tióis, elevando os níveis plasmáticos do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), além de ativar receptores de rianodina (RyR), e participa do efeito relaxante de muitos leitos vasculares. Estudos relatam que HNO pode ser produzido diretamente via NO-sintase (HOBBS et al., 1994; SCHMIDT et al., 1996; ADAK et al., 2000), e seu papel nas ações vasculares pode ser confirmado frente a sua sensibilidade a tióis e a sua resistência, na maioria das vezes, a sequestradores de NO[•] (IRVINE et al., 2008).

Os resultados sugerem, além de possível participação de outra espécie reativa de NO no efeito vasorrelaxante de Ssan-EtOH, um efeito sequestrador incompleto do NO pela hidroxocobalamina (ANDREWS et al., 2009).

Outra via muito importante para o vasorrelaxamento e conseqüente regulação do tônus vascular é a que envolve a produção e liberação de metabólitos da via da enzima cicloxigenase (OLIVEIRA et al., 2008). A cicloxigenase - COX é uma enzima que catalisa a reação de metabolismo do ácido araquidônico em metabólitos, dentre eles a prostaciclina que é um potente vasodilatador derivado do endotélio vascular importante para a regulação do tônus muscular (MONCADA; VANE, 1978; SCHULZ; TRIGGLE, 1994). A prostaciclina formada no endotélio vascular se difunde até as células musculares, onde promove a ativação de receptores IP que estão acoplados a proteína G_s (COLEMAN et al., 1994). Este acoplamento induz a ativação da enzima AC levando a um aumento dos níveis de AMPc no citosol. O aumento do AMPc gera a ativação de uma proteína cinase dependente de AMPc-PKA.

Esta proteína quando ativada promove fosforilações da bomba do retículo sarcoplasmático, aumentando a recaptação de cálcio do citosol para os estoques, promovendo a abertura de canais para potássio, o fechamento de canais para cálcio na membrana e a inibição da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Estas seqüências de fosforilações levam a uma diminuição das concentrações de cálcio na célula muscular acarretando em uma diminuição do tônus (SIEGEL, 1989; FROLICH, 1990).

Partindo dessas premissas, avaliou-se o efeito da indometacina, um inibidor não-seletivo da COX (CLARK; FUCHS, 1997), sobre a resposta vasorrelaxante de Ssan-EtOH. Nesta série de experimentos constatou-se que o vasorrelaxamento foi significativamente atenuado, indicando que os metabólitos formados a partir da via do ácido araquidônico podem estar participando do efeito vasodilatador produzido por Ssan-EtOH (Gráfico 5).

Um evento importante para a produção de fatores relaxantes derivados do endotélio é o aumento das concentrações de Ca^{2+} na célula endotelial, que pode ocorrer por ativação dos receptores muscarínicos (OLIVEIRA et. al., 2008). Os receptores muscarínicos são proteínas integrais de membrana acoplados a proteína-G que quando estimulados por um agonista induz o aumento de Ca^{2+} na célula endotelial e conseqüente liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio – FRDEs (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Em muitos leitos vasculares, a estimulação dos receptores muscarínicos (endoteliais) produz uma intensa dilatação, apesar desses receptores não receberem inervação colinérgica (BRUNING et. al., 1994). De fato, existem vários estudos mostrando que a estimulação dos receptores muscarínicos induz vasorrelaxamento em aorta de coelho e de rato (CHOO et al., 1986) via liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o óxido nítrico (CAULFIELD, 1993; EGLIN et al., 1996).

Para verificar a participação dos receptores muscarínicos no relaxamento induzido por Ssan-EtOH, realizou-se experimentos em anéis de artéria mesentérica superior isolado de rato pré-incubados com atropina (1 nM) um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWYER et al., 1999). Na presença de atropina, o efeito vasorrelaxante produzido foi atenuado significativamente. Estes resultados sugerem uma provável participação dos

receptores muscarínicos na resposta vasorrelaxante induzida por Ssan-EtOH (Gráfico 6).

Os canais para potássio parecem ter um papel crucial no controle do potencial de membrana e também são importantes para o controle do tônus vascular (JACKSON, 2000). A ativação de canais para K^+ levam ao efluxo de íons K^+ e hiperpolarização das células musculares lisas vasculares promovendo a inativação dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (Ca_vL) promovendo uma diminuição da concentração de cálcio intracelular e conseqüente vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995).

Os ativadores de canais de K^+ são eficazes em relaxar a musculatura lisa vascular em condições de aumento moderado da concentração externa de potássio enquanto que, em maiores concentrações extracelulares de potássio este efeito é bastante atenuado. A possível explicação para isso é que na presença de altas concentrações de potássio extracelular o potencial de equilíbrio do K^+ torna-se menos negativo que o limiar de abertura dos Ca_vL (GURNEY, 1994).

Para avaliar a participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por Ssan-EtOH, observou-se o efeito do KCl 20 mM sobre a resposta relaxante do extrato em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio vascular. Nestas condições, o extrato promoveu uma atenuação do efeito vasorrelaxante de Ssan-EtOH (Gráfico 7), indicando a modulação do efluxo de K^+ nestas preparações, e sugerindo a participação dos referidos canais na resposta relaxante do extrato. Em contraste, em anéis sem endotélio vascular, a resposta vasorelaxante induzida por Ssan-EtOH foi aumentada nas concentrações mais elevadas do extrato (Gráfico 8). Estes resultados, observando a resposta em preparações com endotélio intacto na presença de KCl 20 mM, sugerem a participação indireta dos canais para potássio, sendo provavelmente ativados por fatores derivados do endotélio.

Para comprovar a hipótese de que Ssan-EtOH estaria atuando sobre os canais para potássio no endotélio vascular, realizou-se protocolos experimentais na presença de tetraetilamônio (TEA) 3 mM, um bloqueador não-

seletivo dos canais para potássio (WANG et al., 2008). Nestas condições, observou-se uma atenuação significativa da resposta relaxante frente ao bloqueio com TEA 3 mM, sem alteração do efeito máximo (Gráfico 9), sugerindo a participação de canais para potássio no endotélio vascular no efeito vasorrelaxante de Ssan-EtOH.

São quatro os tipos de canais para potássio que parecem estar mais envolvidos na regulação do tônus vascular: os canais para potássio ativados por voltagem (K_V), os canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), canais para potássio de baixa condutância ativados pelo cálcio (SK_{Ca}) canais para potássio de grande condutância ativados pelo cálcio (BK_{Ca}) (ADEAGBO, 1999; JACKSON, 2000). Apesar do TEA 3 mM ser um bloqueador não-seletivo dos canais para potássio, possui uma afinidade maior para os BK_{Ca} (WALLERSTEDT; BODELSSON, 1997). Portanto, faz-se necessário avaliar a participação dos demais tipo de canais na resposta vasorrelaxante de Ssan-EtOH.

Como citado anteriormente, o endotélio regula o tônus vascular mediante a liberação de basicamente três fatores: NO, prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MATOBA et al, 2002; et al., 2007). A artéria mesentérica de rato contribui substancialmente para a regulação da resistência vascular periférica (MULVANY; AALKJAER, 1990), e o NO e principalmente o EDHF desempenham um papel crucial na resposta relaxante dependente de endotélio neste órgão (HWA et al, 1994).

Para avaliar a participação do EDHF, experimentos envolvendo pré-tratamento com L-NAME (100 μ M) + Indometacina (10 μ M) foram realizados em anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional (MA et al. 2008), e não se observou atenuação da resposta (Gráfico 10), em contraste com o observado separadamente para cada bloqueador (Gráficos 3 e 5). No entanto, relaxamento persistente ao bloqueio duplo da NOS e COX caracteriza-se como uma resposta atribuída ao EDHF (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999), similar ao que ocorre com a acetilcolina, bem como a substâncias potencialmente ativadoras de receptores muscarínicos (BOLTON et al., 1984; MA et al., 2008).

Para confirmar a participação dos EDHF, realizou-se experimentos envolvendo o pré-tratamento com L-NAME (100 μM) + Indometacina (10 μM), mais um bloqueador não-seletivo dos canais de potássio (TEA 3 mM). Nesta série de experimentos, observou-se uma atenuação significativa na resposta relaxante de Ssan-EtOH, com deslocamento da curva para direita, e aumento no valor de EC_{50} (Gráfico 11). No entanto, faz-se necessário a realização experimentos com um bloqueio clássico de EDHF com Apamina (100 nM) + Caribdotoxina (200 nM) bloqueadores seletivos de SKCa^{2+} e BKCa^{2+} , respectivamente (MA et al., 2008).

Em experimentos para verificação da influência de Ssan-EtOH sobre as contrações induzidas por fenilefrina, observou-se que o extrato foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração as contrações induzida por fenilefrina em preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos na ausência do endotélio vascular (Gráfico 12; Tabela 9). A fenilefrina promove o aumento do tônus vascular pela estimulação de receptores α_1 -adrenérgicos e pelo aumento do influxo de cálcio pelos canais para cálcio operados por receptor – ROCCs (KARAKI; WEISS, 1988). Portanto, estes resultados sugerem que Ssan-EtOH de algum modo influencia na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, supostamente pelo bloqueio dos canais para cálcio operados por receptor.

De acordo com a literatura o aumento da concentração de potássio extracelular induz contração no músculo liso através de uma despolarização de membrana com subseqüente ativação de canais para cálcio sensíveis a voltagem - Ca_vL e liberação de Ca^{+2} do reticulo sarcoplasmático (GURNEY, 1994; YOSHIHIMA et al., 1992), enquanto a vasoconstrição induzida por fenilefrina é resultante de um acoplamento misto, farmacomecânico e eletromecânico (LEUNG et al., 2008). Em ambos os casos, o principal efeito resultante é o aumento da concentração de cálcio intracelular levando a uma contração.

Para verificamos se Ssan-EtOH promoveria relaxamento frente a agentes contráteis diferentes, fez-se experimentos utilizando o agente despolarizante KCl 80 mM, que induz contração através da despolarização de membrana e abertura dos canais de cálcio sensíveis a voltagem, promovendo

o influxo de cálcio e conseqüente contração, mecanismo esse chamado de acoplamento eletromecânico (VOGALIS et al., 1991). Nestas condições experimentais, Ssan-EtOH foi capaz de relaxar de maneira dependente de concentração as contrações induzidas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, tanto por KCl 80 mM quanto por fenilefrina 10 μ M, mostrando que o extrato induz relaxamento tanto sobre contrações induzidas por um acoplamento eletromecânico como por um farmacomecânico, caracterizando-se assim um efeito vasorrelaxante inespecífico, e evidenciando ainda uma provável ação sobre os Ca_vL . (Gráfico 13, Tabela 8).

Para verificar a participação de Ssan-EtOH sobre o bloqueio dos canais para cálcio na membrana plasmática, realizou-se experimentos, através da adição cumulativa de $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio (KCl 60 mM 0- Ca^{2+}) antes e após a incubação de concentrações individuais de Ssan-EtOH. Nestas condições observou-se que, na presença de Ssan-EtOH as curvas concentração-resposta do $CaCl_2$ foram deslocadas para a direita e com redução do efeito máximo de maneira não paralela, sugerindo uma ação inibitória de Ssan-EtOH sobre o influxo de Ca^{2+} via canais para cálcio sensíveis a voltagem na membrana plasmática (Gráfico 14; Tabela 10).

Conclusões



6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que:

➤ O extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Sida santaremnensis* (Ssan-EtOH) não apresentou toxicidade aguda em camundongos, bem como citotoxicidade em eritrócitos de ratos.

➤ O efeito vasorrelaxante promovido por Ssan-EtOH em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ocorre de maneira dependente e independente do endotélio vascular.

➤ O efeito vasorrelaxante dependente do endotélio vascular parece envolver a participação da enzima NO-sintase e dos receptores muscarínicos, bem como os metabólitos da cicloxigenase, além de possível participação de canais para potássio e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio.

➤ O efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular parece ser decorrente de uma inibição do influxo de cálcio através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_vL). Porém outros mecanismos podem estar envolvidos nesta resposta.

Perspectivas



7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a participação da via NO/GMPc/PKG na resposta vasorrelaxante de Ssan-EtOH.
- Indentificar quais subtipos de canais de potássio estão envolvidos na resposta vasorrelaxante de Ssan-EtOH.
- Verificar os efeitos de Ssan-EtOH sobre a mobilização dos íons cálcio dos estoques intracelulares.
- Avaliar o efeito de Ssan-EtOH sobre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAK, S.; WANG, Q.; STUEHR, D. J. Arginine conversion of nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**. 275: 33554–33561, 2000.

ADEAGBO, A. S. O. 1-Ethyl-2-benzimidazoline stimulates endothelial K_{Ca}^{2+} channels and nitric oxide formation in rat mesenteric vessels. **European Journal Pharmacology**. 379: 151-159, 1999.

ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 110, 76–91, 2007.

ALI, Z.A. Folk veterinary medicine in Moradabad District (Uttar Pradesh), India. **Fitoterapia**. 70, 340-347, 1999.

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

ANDREWS, K. L.; IRVINE, J. C.; TARE, M.; APOSTOLOPOULOS, J.; FAVALORO, J. L.; TRIGGLE, C. R.; KEMP-HARPER, B. K. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries. **British Journal of Pharmacology**. 157, 540–550, 2009.

AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, F.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS, F.; TRIPATHI, P.C.; SEAL, T.; MUKHERJEE, B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. 84, 131- 138, 2003.

BALACHANDRAN, P.; GOVINDARAJAN, R. Cancer - an ayurvedic perspective. **Pharmacological Research**. 51, 19–30, 2005.

BANZOZI, J. T.; PRADO, R.; MENAN, H.; VALENTIN, A.; ROUMESTAN, C.; MALLIÉ, M.; PELISSIER, Y.; BLACHE, Y. Studies on medicinal plants of Ivory Coast: Investigation of *Sida acuta* for *in vitro* antiplasmodial activities and identification of an active constituent. **Phytomedicine**, 11: 338–341, 2004.

BARACHO, G. S. Taxonomia do gênero *Sida* L. seção *cordifoliae* (DC.) Fryxell (Malvaceae) no Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, 1998.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, A. C. **Sistemática de Angiospermas no Brasil 2**. Imprensa Universitária, 1991.

BARTUNEK, J.; WEINBERG, E.O.; TAJIMA, M.; ROHRBACH, S.; KATZ, S.E.; DOUGLAS, P. S. Chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. **Circulation**, 101: 423-9, 2000.

BEVAN, J. A; HENRION, D. Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. **Annual Review Pharmacology Toxicology**. 34: 173-90. 1994.

BLUNDEN, G.; A.V. PATEL; ARMSTRONG, N. J.; GORHAM, J. Betaine distribution in the Malvaceae. **Phytochemistry**. 58, 451–454, 2001.

BLUNDEN, G.; A.V. PATEL; ARMSTRONG, N.; ROMERO, M. A.; MELÉNDEZ, P. Betaine distribution in Angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**. 33, 904-920, 2005.

BOLTON, T. B.; LANG, R. J.; TAKEWAKI, T. Mechanism of action of noradrenaline and charbacol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. **Journal of Physiology**, 351: 549-572, 1984.

BORK, P.M.; SCHMITZ, M. L.; KUHNT, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kB. **FEBS Letters**, 402, 85-90, 1997.

BRASIL, 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE Nº 90, DE 16 DE março DE 2004. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=>. Acesso em 23 mai 2009.

BRUNING, T. A; HENDRIKS, M. G.; CHANG, P. C.; KUYPERS, E. A.; VAN ZWIETEN, P. A. In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans. **Circulation Research**. 74, 912-919, 1994.

CAMPBELL, W. B.; HARDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, 78: 415-423, 1996.

CAULFIELD, M. P.: Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**. 58: 319-379, 1993.

CHEUNG, W. Y. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 56 (3) 533-538, 1970.

CHOO; L. K.; MALTA, E.; MITCHELSON, F. The affinity of some selective muscarinic receptor antagonists for the muscarinic receptor mediating

endothelial-dependent relaxation of the rabbit and rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 38 (11) 843-845, 1986.

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

COE, F. G.; ANDERSON, G. J. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. **Journal of Ethnopharmacology**. 96, 303–323, 2005.

COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. Jr.; NORMAN, R. A. Jr.; DECHEE, J. The role of the kidney in spontaneous hypertension. **American Heart Journal**. 89: 94-98, 1994.

COLODEL, E. M.; GARDNER, D.; ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D. Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**. 44 (3) 177-178, 2002.

DAHANUKAR, S. A.; THATTE, U. M. Current status of Ayurveda in phytomedicine. **Phytomedicine**. 4 (4) 359-368, 1997.

DARWISH, F. M. M.; REINECKE, M. G. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. **Phytochemistry**. 62, 1179–1184, 2003.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. 73, 69-91, 2002.

DINAN, L.; BOURNE, P. WHITING, P. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida spp.* (Malvaceae). **Phytochemical Analysis**. 12 (2) 110-119, 2001.

DINERMAN, J. L.; DAWSON, T. M.; SCHELL, M. J.; SNOWMAN, A.; SNYDE, S. H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 91 (10) 4214–4218, 1994.

DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; GIMENO, E. J.; BARROS, S. S.. Lysosomal Storage Disease Caused by *Sida carpinifolia* Poisoning in Goats. **Veterinary Pathology**. 37:153–159, 2000.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat oedema assays. **Journal of Ethnopharmacology**. 57, 35-56, 1997.

EBASHI, S. Calcium binding and relaxation in actomyosin system. **Journal of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 150-151, 1960.

EGLIN, R. M.; HEGDE, S. S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacological Reviews**. 48 (4) 531-565, 1996.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, W. R. Higher plants, the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmacy**. 149, 46-52, 1976.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The alternative: EDHF. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 31, 15-22, 1999.

FOLKOW, B. Relationship between vessel design and hemodynamics along the precapillary resistance compartment in mono-and hypertension. **Blood vessels**. 16, 277-280, 1979.

FRANCO, C.I.F.; MORAIS, L.C.S.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; ANTONIOLLI, A.R. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic

extract of *Sida cordifolia* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. 98, 275–279, 2005.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.F.; RODRIGUES, H.M.S.L.; MOURÃO, R.H.V.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**. 72, 273–278, 2000.

FREI, B.; BALTISBERGER, M.; STICHER, O.; HEINRICH, M. Medical Ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous Uses. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 149–165, 1998.

FROLICH, J. D. Prostacyclin in hypertension. **Journal of Hypertension - Supplement**. 8: S73-S78, 1990.

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

GALVÃO, S. **Revista do Incor**. Ano 2, n.º 25, 40-46 (1997).

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Philadelphia: Saunders, p. 1156-1179. 1995.

GIDAY, M.; TEKLEHAYMANOT, T.; ANIMUT, A.; MEKONNEN, Y. Medicinal plants of the Shinasha, Agew-awi and Amhara peoples in northwest Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**. 110, 516–525, 2007.

GORHAM, J. Glycinebetaine is a major nitrogen-containing solute in the malvaceae. **Phytochemistry**. Vol. 43, No. 2, pp. 367-369, 1996.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Programe Neurobiologic**. 76: 126-152, 2005.

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

HAMILL, F.A.; APIO, S.; MUBIRU, N.K.; BUKENYA-ZIRABA, R.; MOSANGO, M.; MAGANYI, O.W.; SOEJARTO, D.D. Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. **Journal of Ethnopharmacology**. 84, 57- 78, 2003.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT, U. ADSERSEN, A.; GUDIENSEN, L.; RAJASEKHARAN, S.; PUSHANGADAN, P. In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). **Journal of Ethnopharmacology**, 48, 43-51, 1995.

HARSHA, V.H.; HEBBAR, S.S.; SHRIPATHI, V.; HEGDE; G.R. Ethnomedicobotany of Uttara Kannada District in Karnataka, India - plants in treatment of skin diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. 84, 37- 40, 2003.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants on the World**, Ed. B. T. Batsford Ltda., London, 1993.

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**. 91: 10992–10996, 1994.

HU, C.T.; CHANG, H.R.; HSU, Y. H.; LIU, C. J.; CHEN, H. I. Ventricular hypertrophy and arterial hemodynamics following deprivation of nitric oxide in rats. **Life Sciences**. 78:164-73, 2005.

HWA, J. J.; GHIBAUDI, L.; WILLIAMS, P.; CHATTERJEE, M. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. **American Journal of Physiology**. 266 (3 Pt 2), H959-H958, 1994.

IGNACIMUTHU, S.; AYYANAR, M.; SIVARAMAN K., S. Ethnobotanical investigations among tribes in Madurai District of Tamil Nadu (India). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2:25, 2006.

IRVINE, J. C.; RITCHIE, R. H.; FAVALORO, J. L.; ANDREWS, K. L.; WIDDOP, R. E.; KEMP-HARPER, B. K. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. **Trends in Pharmacological Sciences**. 29 (12) 601-608, 2008.

ISLAM, M. E.; HAQUE, M. E.; MOSADDIK, M. A. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Sida rhombifolia* (Malvaceae) grown in Bangladesh. **Phytotherapy research**. 17 (8) 973-975, 2003.

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

JADHAV, A. N.; BHUTANI, K.K. Ayurveda and gynecological disorders. **Journal of Ethnopharmacology**. 97, 151–159, 2005

JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. In: Lippincott-Raven Publ. **Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research**. Philadelphia, 30: 153-174, 1995.

KAKIUCHI, S.; YAMAZAKY, R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5' – nucleotide phosphodiesterase. **Biochemical And Biophysical Research communications**. 41 (5) 1104-1110, 1970.

KAMATENESI-MUGISHA, M.; ORYEM-ORIGA, H. Medicinal plants used to induce labour during childbirth in western Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**. 109, 1–9, 2007.

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

KATEWA, S.S.; CHAUDHARY, B.L.; JAIN, A. Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. **Journal of Ethnopharmacology**. 92, 41–46, 2004.

KOZA, O. H; BARANOWSKA, M; GROMOTOWICZ, A; MALINOWSKA, B; ZAKA, FIZJOLOGII DOA; WIADCZALNEJ A.M, BIAA; YSTOK. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): Potential involvement in the physiology and pathology of blood vessels. **Postepy Hig Med Dosw**. 12; 61:555-64, 2007.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H.; SUBBARAJU, G. V. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **International Journal of Applied Science and Engineering**. 4, 2: 115-125, 2006.

KRUSZYNA, H.; MAGYAR, J.S., ROCHELLE, L.G., RUSSEL, M.A., SMITH, R.P., WILCOX, D.E. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin (III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 285, 665–671, 1998.

LANDINI, D. **Revista do Incor**. Ano 3, n.º 35, 20-28 (1998).

LEHMAN, A. D.; DUNKEL, F. V.; KLEIN, R. A.; OUATTARA, S.; DIALLO, D.; GAMBY, K. T.; N'DIAYE, M. Insect management products from Malian traditional Medicine - Establishing systematic criteria for their identification. **Journal of Ethnopharmacology**. 110, 235–249, 2007.

LEUNG, F. P.; YUNG, L. M.; YAO, X.; LAHER, I.; HUANG, Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**. 153,846–857,2008.

LITCHFIELD, L. T. J. R., WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**. 19, 388-397, 1949.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. 1 (1) 19-27, 2006.

LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M.; GIMENO, E. J.; DRIEMEIER, D. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**. 35 (5) 434-438, 2003.

LUTTERODT, G. D. Abortifacient properties of an extract from *Sida veronicaefolia*. **Journal of Ethnopharmacology**. 23 (1) 27-37, 1988a.

LUTTERODT, G. D. Responses of gastrointestinal smooth muscle preparations to a muscarinic principle present in *Sida veronicaefolia*. **Journal of Ethnopharmacology**. 23 (2-3) 313-322, 1988b.

LUTTERODT, G. D. Interaction between oxytocin and 'sidaverin' on the gravid and non-gravid rat uterus. **Pharmacological Research**. 32 (1/2), 1995.

MA, X.; LI, Y.; GAO, Q.; YE, Z.; LU, X.; WANG, H.; JIANG, H.; BRUCE, I. C.; XIA, Q. Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. **Life Sciences**. 83, 110-117, 2008.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K. J. K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 106, 425–428, 2006.

MANANDHAR, N. P. Native phytotherapy among the Raute tribes of Dadeldhura district, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**. 60, 199–206, 1998.

MARSH, N.; MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 27, 313–319, 2000.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H.; KUBOTA, H.; MORIKAWA, K.; FUJIKI, T.; KUNIHITO, I.; MUKAI, Y.; HIRAKAWA, Y.; TAKESHITA, A. Hydrogen Peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 25:290(3):909-13, 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Editora da UFC, 1997.

MEDEIROS, I.A.; SANTOS, M.R.V.; NASCIMENTO, N.M.S.; DUARTE, J.C. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extract in rats. **Fitoterapia**. 77, 19– 27, 2006.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**. 30:293-331, 1978.

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

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. 147(Suppl 1), 193–201, 2006.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiology Research**. 70: 921-951, 1990.

MURPHY, R. A. Structural proteins in the myofilaments on regulation of the contraction in vertebrate smooth muscle. **Federation Proceedings**. 35 (6) 1302-1306, 1976.

MUTHU, C.; AYYANAR, M.; RAJA, N.; IGNACIMUTHU, S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 2:43, 2006.

NAGASHAYANA, N.; SANKARANKUTTY, P.; NAMPOOTHIRI, M.R.V.; MOHAN, P.K.; MOHANAKUMAR, K.P. Association of L-DOPA with recovery following *Ayurveda* medication in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. 176, 124–127, 2000.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. **American Journal of Physiology**. 268:C799-C822, 1995.

NOUMI, E.; HOUNGUE, F.; LONTSI, D. Traditional medicines in primary health care: plants used for the treatment of hypertension in Bafia, Cameroon. **Fitoterapia**. 70, 134-139, 1999.

NOUMI, E.; DIBAKTO, T.W. Medicinal plants used for peptic ulcer in the Bangangte region, western Cameroon. **Fitoterapia**. 71, 406-412, 2000.

NOUMI, E.; YOMI, A. Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. **Fitoterapia**. 72, 246-254, 2001.

NOVY, J. W. Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. **Journal of Ethnopharmacology**, 55, 119-126, 1997.

OLIVEIRA, A. P. Efeitos cardiovasculares do diterpeno labdano-302 - Estudo em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

ONG, H.C.; NORZALINA, J. Malay herbal medicine in Gemencheh, Negri Sembilan, Malaysia. **Fitoterapia**. 70, 10-14, 1999.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.P.; GARCÍA, M.E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R.G.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VÉLEZ, H.N. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 71, 493–504, 2000a.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**. 71, 505–511, 2000b.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**. 73, 233-241, 2000c.

PEIXOTO, A. M. **Enciclopédia Agrícola Brasileira: S-Z, Vol. 6**. Esalq - Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz, USP. EdUSP, 2007.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. 35 (2) 305-309, 1997

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

ROCHA, F. A. C., ROCHA, J. C. S., PEIXOTO, M. E. B., JANCAR, S., CUNHA F. Q, RIBEIRO, R. A. Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 43 (4) 206-17, 2003.

RUNYORO, D. K. B.; MATEE, M. I.N.; NGASSAPA, O. D.; JOSEPH, C. C.; MBWAMBO, Z. H. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:11, 2006.

SAIKIA, A. P.; RYAKALA, V. K.; SHARMA, P.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. **Journal of Ethnopharmacology**. 106, 149–157, 2006.

SANTOS, M. R. V. Atividade cardiovascular da vasicina, um alcalóide isolado das folhas de *Sida cordifolia* L. João Pessoa, 2005. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

SANTOS, M. R. V.; NASCIMENTO, N. M.; ANTONIOLLI, A. R.; MEDEIROS, I. A. Endothelium-derived factors and K⁺ channels are involved in the vasorelaxation induced by *Sida cordifolia* L. in the rat superior mesenteric artery. **Pharmazie**. 61 (5) 466-469, 2006.

SAWYER, D. B.; BYMASTER, P. F.; CALLIGARO, O. D.; FALCONE, J.; MITCH, H. C.; WARD, S. J.; WHITESITT, C.; SHANNON, E. H. Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. **General Pharmacology**. 32: 445-452, 1999.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, 91, 115–135, 2004.

SCHMIDT, H. H. W.; HOFMANN, H.; SCHINDLER, U.; SHUTENKO, Z. S.; CUNNINGHAM, D. D.; FEELISCH, M. No NO• from NO synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 93: 14492–14497, 1996.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacology Science**. 15: 255-259.1994.

SHINWARI, M. I.; KHAN, M. A. Folk use of medicinal herbs of Margalla Hills National Park, Islamabad. **Journal of Ethnopharmacology**. 69, 45–56, 2000.

SIEGEL, G.; SCHNALKE, F.; STOCK, G.; GROTE, J. Prostacyclin, endothelium-derived relaxing factor and vasodilatation. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res**. 19: 267-270, 1989.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (MALVACEAE). **Química Nova**. Vol. 29, No. 6, 1250-1254, 2006.

SILVEIRA, A.L.; GOMES, M.A.S.; SILVA FILHO, R.N.; SANTOS, M.R.V.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA FILHO, J.M. Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 13 (2) 37-39, 2003.

ŠIMKO, F.; POTÁCOVÁ, A.; PELOUCH, V.; PAULIS, L.; MATÚŠKOVÁ, J.; KRAJCÍROVICOVÁ, K.; PECHÁNOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M. Spontaneous, Larginine-induced and spironolactone induced regression of protein remodeling of the left ventricle in L-NAME-induced hypertension. **Physiology Research**. 56 (Suppl 2): S00-S00, 2007.

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

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

SOUZA, G. C.; HAAS, A.P.S.; POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 90, 135–143, 2004.

SOUZA, H. C. D.; PENTEADO, D. M. D.; PINGE, M. C. NETO, M.; BARBOSA, O.; TEIXEIRA, V. P. A.; BLANCO, J. H. D.; SILVA, V. J. D. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 89 (2), 2007.

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

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

TAYLOR, R.S.L.; EDEL, F.; MANANDHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 50, 97-102, 1996a.

TAYLOR, R.S.L.; HUDSON, J.B.; MANANDHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**. 53, 97-104, 1996b.

TEKLEHAYMANOT, T.; GIDAY, M.; MEDHIN, G.; MEKONNEN, Y. Knowledge and use of medicinal plants by people around Debre Libanos monastery in Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**. 111, 271–283, 2007.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**. 40, 1635–1660, 2002.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U.W.; ADSERSEN, A.; NYMAN, U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**. 58, 75-83, 1997.

VENKATESH, S.; REDDY, Y. S. R.; SURESH, B.; REDDY, B. M.; RAMESH. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sida rhomboidea* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. 67, 229–232, 1999.

VOGALIS, F.; PUBLICOVER, N. G.; HUME, J. R.; SANDERS, K. M. Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology**. 260 (1) C1012-C1018, 1991.

VUUREN, S. F.; VILJOEN; A. M. The in vitro antimicrobial activity of toothbrush sticks used in Ethiopia. **South African Journal of Botany**. 72, 646–648, 2006.

WALLERSTEDT, S. M.; BODELSSON, M. Endothelium-dependent relaxation by Substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. **British Journal of Pharmacology**. 120, 25-30, 1997.

WANG, S.; ZANG, W.; KONG, S.; YU, X.; SUN, L. ZHAO, X.; WANG, S. ZHENG, X. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**. 579, 283-288, 2008.

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

WIENCKEN, A. E.; CASAGRANDE, V. A. Endotelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. **Glia**. 26: 280-90, 1999.

YOSHIHIMA, N.; ICHIARA, K.; YOSHIDA, R.; ABIKO, Y. Positive inotropic and chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British Journal of Pharmacology**. 105: 696-702, 1992.

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](#)