

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

INGRID BEATRIZ DE MELO MORAIS

AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR E CARDIOTÓXICO DO EXTRATO
AQUOSO LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* Mart.

UBERLÂNDIA

2017

INGRID BEATRIZ DE MELO MORAIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR E CARDIOTÓXICO DO EXTRATO
AQUOSO LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção
do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827a Morais, Ingrid Beatriz de Melo, 1991
2017 Avaliação do efeito hipotensor e cardiotoxico do extrato aquoso
 liolifizado das folhas de *Annona crassiflora* Mart. / Ingrid Beatriz de
 Melo Morais. - 2017.
 70 p. : il.

Orientador: Luiz Borges Bispo da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.14>
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Hipertensão - Teses. 3. Pressão arterial -
Teses. 4. Sistema cardiovascular - Teses. I. Silva, Luiz Borges Bispo da.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

INGRID BEATRIZ DE MELO MORAIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR E CARDIOTÓXICO DO EXTRATO
AQUOSO LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção
do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Disney Oliver Sivieri Junior

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Profa. Dra. Erica Carolina Campos Pulici

Instituto de Ciências Biomédicas (FAEFI) - UFU

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) - UFU

UBERLÂNDIA

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por ter me concedido a vida. Agradeço por ter me dado sabedoria para chegar até aqui e principalmente, agradeço a Ele por ter colocado pessoas indescritíveis em meu caminho.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Flávio e Cida, minha irmã Isabela e aos meus avós Floripes e Sebastião, pelo incentivo, apoio e amor incondicional. Tudo o que eu fiz, faço e farei, é por vocês.

Ao meu namorado Lucas, por todo o carinho e por se fazer presente todos os dias, mesmo estando a centenas de quilômetros de distância.

A todos meus queridos amigos, por trazerem tanta luz e alegria à minha vida.

Aos meus companheiros de laboratório (tanto de Farmacologia quanto dos laboratórios agregados), por todo auxílio e por tornar meus dias, mesmo os mais difíceis, tão divertidos. Rafaella, Natália, Gustavo, Fernanda, Rayssa, Victor, Maria Vitória, Juliana, Danielle, muito obrigada!

Ao professor Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto, que além de oferecer seu laboratório e material para realização desse projeto, disponibilizou também seu tempo para me ajudar sempre que foi preciso. Ao professor Dr. Hudson Canabrava, pela aquisição do material vegetal. A professora Dra. Denise Brentan da Silva por realizar a caracterização fitoquímica do extrato utilizado no presente estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu querido professor, Luiz Borges Bispo-da-Silva, pela oportunidade e pelo voto de confiança para mais uma vez desenvolver um projeto de tamanha importância. Muito obrigada pela paciência, por todo conhecimento que me transmitiu com tamanha dedicação e por todos os momentos de companheirismo. Além de um excelente orientador, hoje tenho o privilégio de poder chamá-lo de amigo.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo atualmente o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No Brasil, considerável parte da população faz uso de plantas medicinais para tratamento de diversas doenças, dentre elas, a HAS. Espécies vegetais, como a *Annona muricata* Linn (Annonaceae), a qual é utilizada por comunidades para o controle da pressão arterial, já foram alvo de estudos que confirmaram as suas propriedades hipotensivas. A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), conhecida popularmente como araticum, também é amplamente utilizada para o tratamento de feridas, doenças venéreas, câncer, entre outras. Apesar de seu uso extensivo na medicina popular, não há informações disponíveis na literatura reportando que a *A. crassiflora* apresente um possível efeito sobre o sistema cardiovascular. Considerando que plantas do mesmo gênero possam apresentar perfis fitoquímicos semelhantes e conseqüentemente, atividades fisiológicas semelhantes, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos Wistar normotensos, bem como determinar os possíveis mecanismos envolvidos no processo, através da administração de antagonistas e inibidores específicos (metilatropina para avaliação da participação de receptores muscarínicos; hexametônio, para avaliação da participação de gânglios autonômicos; indometacina para avaliação da participação de prostaglandinas; L-NAME para avaliação da participação da síntese e/ou liberação de óxido nítrico; glibenclamida para avaliar a participação de canais de K^+ ATP-dependentes; nifedipina para avaliar a participação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes). A administração do extrato aquoso evocou significativo efeito hipotensivo dose-dependente, o qual parece estar relacionado principalmente a mecanismos vasodilatadores. Ainda, observou-se que o extrato apresenta cardiotoxicidade em altas doses. A investigação dos mecanismos relacionados aos efeitos observados revelou que a vasodilatação não parece envolver a atividade de receptores muscarínicos, síntese e/ou liberação de NO e efluxos autonômicos periféricos; que o extrato parece estimular substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras dependentes da ação das ciclooxigenases; que a administração de glibenclamida potencializa a cardiotoxicidade induzida pelo extrato; que o bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagens dependentes é parcialmente responsável pelo efeito vasodilatador do extrato.

Palavras-chave: Sistema cardiovascular. Pressão arterial. Frequência cardíaca. Cardiotoxicidade. *Annona crassiflora*.

ABSTRACT

Hypertension is one of the main causes of morbidity and mortality in the world and is currently the most important risk factor for the development of cardiovascular diseases. A considerable part of the Brazilian population uses medicinal plants for the treatment of several diseases, like hypertension. Plant species such as *Annona muricata* Linn (Annonaceae), which is used by some communities to control blood pressure, have been the subject of studies that confirmed their hypotensive properties. The species *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), popularly known as araticum, is also used by folk medicine for the treatment of wounds, venereal diseases, cancer, among others. Despite its extensive use in folk medicine, there is no information available reporting that *A. crassiflora* has a possible effect on the cardiovascular system. Considering that plants of the same genus may present similar phytochemical profiles and consequently, similar physiological activities, the aim of the present study was to evaluate the effect of the lyophilized aqueous extract of *A. crassiflora* leaves on blood pressure and heart rate of normotensive Wistar rats, as well as to determine the possible mechanisms involved in these effects through the administration of specific antagonists and inhibitors (methylatropin for the evaluation of muscarinic receptors; hexamethonium for the evaluation of autonomic ganglia; indomethacin for the evaluation of prostaglandins; L-NAME to evaluate the synthesis and/or release of nitric oxide (NO), glibenclamide to evaluate K⁺ ATP-dependent channels, nifedipine to evaluate voltage-gated Ca²⁺ channels). The administration of the extract evoked a significant dose-dependent hypotensive effect, which seems to be mainly related to vasodilatory mechanisms. It has also been observed that the extract has a high dose cardiotoxicity. Investigation of mechanisms related to observed effects revealed that the vasodilation activity of the extract does not seem to involve muscarinic receptor activity, synthesis and/or NO release and peripheral autonomic efflux; that the extract seems to stimulate vasoconstricting and vasodilatory substances that dependent on the activity of cyclooxygenases; that the administration of glibenclamide potentiates the cardiotoxicity induced by the extract; that the blockade of voltage-gated Ca²⁺ channels is partially responsible for the vasodilator effect of the extract.

Keywords: Cardiovascular system. Blood pressure. Heart rate. Cardiotoxicity. *Annona crassiflora*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Metabolismo secundário de plantas	9
1.1.1 Compostos fenólicos	11
1.1.2 Alcaloides.....	14
1.2 Pesquisas com produtos naturais.....	16
1.3 <i>Annona crassiflora</i> Mart.	17
1.4 Mecanismos de controle da pressão arterial (PA) e Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	19
1.4.1 Algumas Considerações sobre Canais de cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) e o Sistema Cardiovascular.....	20
1.4.2 Fatores Endoteliais	26
1.4.3 Regulação da PA pelo sistema nervoso autônomo.....	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material vegetal.....	33
4.2 Obtenção do extrato aquoso	33
4.3 Identificação dos constituintes do extrato da <i>A. crassiflora</i> por CLAE-DAD-EM/EM.....	33
4.4 Animais e grupos experimentais	34
4.5 Avaliação da PAM e da FC.....	35
4.6 Eletrocardiograma (ECG)	35
4.7 Construção da curva dose-efeito	36
4.8 Avaliação da participação de receptores muscarínicos na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.....	36
4.9 Avaliação das alterações nos efluxos autonômicos periféricos na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato	36
4.10 Avaliação da participação de prostaglandinas e do NO na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.....	37
4.11 Avaliação da participação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.....	37
4.12 Avaliação da participação de canais de K^+ ATP-dependentes na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.	37
4.13 Veículos empregados no presente estudo.....	37
4.14 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Curva dose-efeito	39

5.2 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i> antes e depois da administração de metilatropina.	42
5.3 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i> antes e depois do tratamento com hexametônio.	43
5.4 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i> antes e depois do tratamento com indometacina.	46
5.5 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i> antes e depois do tratamento com L-NAME.	47
5.6 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i> antes e depois do tratamento com nifedipina.	48
5.7 Avaliação do efeito hipotensor do extrato antes e depois do tratamento com glibenclamida.	49
5.8 Efeitos dos diferentes antagonistas e inibidores sobre o componente hipertensor da reposta evocada pela administração do extrato.	51
5.9 Caracterização fitoquímica do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>A. crassiflora</i>	52
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo secundário de plantas

O conjunto de reações bioquímicas que ocorre em todas as células de animais, vegetais e microrganismos é definido como metabolismo. As substâncias químicas formadas, degradadas ou transformadas por essas reações bioquímicas são denominadas de metabólitos (SIMÕES et al., 2007). De maneira geral, as reações bioquímicas podem ser classificadas em anabólicas (síntese de metabólitos a partir de precursores) e catabólicas (degradação de constituintes celulares e nutrientes). Embora grupos distintos de organismos vivos tenham características próprias que os diferenciam, os processos metabólicos básicos dos seres vivos são bastante similares. Assim, como os processos bioquímicos básicos são fundamentais à manutenção da viabilidade celular e, conseqüentemente, à vida, os mesmos são apropriadamente denominados de *metabolismo primário* (SIMÕES et al., 2007; LEITE, 2009).

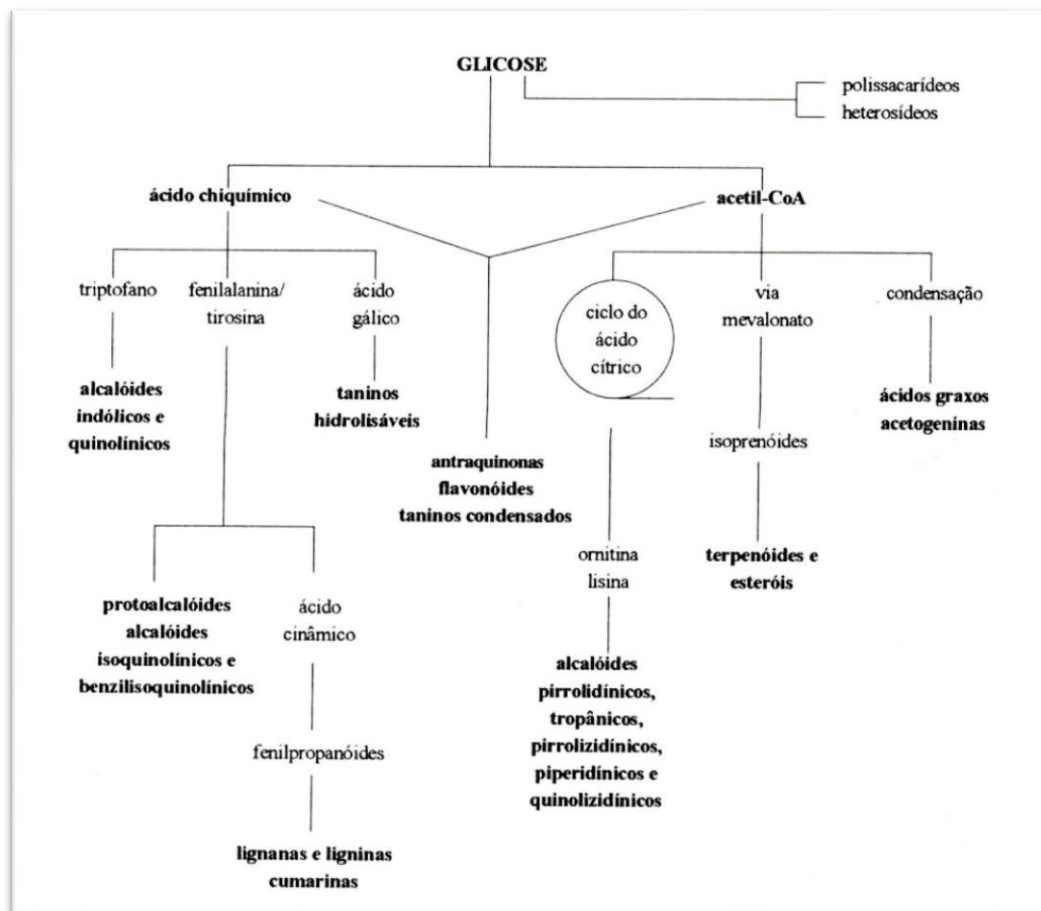
Além de possuírem metabolismo primário, alguns organismos, como os vegetais, apresentam a capacidade de sintetizar e armazenar, também, uma grande variedade de outros compostos orgânicos, que, de forma geral, não parecem tomar parte nos processos de crescimento e desenvolvimento dos organismos que os sintetizam (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; FERREIRA; PINTO, 2010). Essas substâncias, denominadas de *metabólitos secundários*, desempenham papel importante na sobrevivência das plantas em seu meio ambiente, permitindo a interação desses organismos com o ecossistema ao seu redor (BOURGAUD et al., 2001; DAAYF; LATTANZIO, 2008; WINK, 2010).

A capacidade de sintetizar metabólitos secundários se desenvolveu ao longo do processo evolutivo de diferentes linhagens de plantas, de acordo com a necessidade específica da espécie em seu *habitat* natural (PICHERSKY; GANG, 2000). Assim, a produção de metabólitos secundários tem papel fundamental: (i) na atração de insetos polinizadores e animais dispersores de semente, através da síntese de substâncias voláteis e aromáticas, bem como de pigmentos por flores e frutos (PICHERSKY; GANG, 2000; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006); (ii) na proteção contra inimigos potenciais (como bactérias, fungos, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros) ou para suprimir o crescimento de plantas vizinhas (efeito conhecido como *alelopatia*) através da síntese de produtos tóxicos (PICHERSKY; GANG, 2000; BOURGAUD et al., 2001; LEITE, 2009); (iii) na proteção das

folhas expostas à luz solar, por meio da síntese de compostos que absorvem a radiação ultravioleta (BOURGAUD et al., 2001).

Do ponto de vista bioquímico, os metabólitos secundários são sintetizados nas células vegetais a partir dos metabólitos primários como lipídeos, carboidratos e aminoácidos, através de diversas reações enzimáticas (LEITE, 2009). A síntese ocorre a partir do metabolismo da glicose e requer dois intermediários biossintéticos, o acetato e o ácido chiquímico, ou ainda, uma combinação de ambos, como pode ser visto na Fig. 1 (SIMÕES et al., 2007). Os metabólitos secundários são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas, em três grandes grupos: compostos fenólicos (estruturas aromáticas que possuem um ou mais grupos hidroxílicos: OH), terpenos e esteroides (gerados a partir de unidades isoprênicas, as quais possuem 5 átomos de carbono: metil-buta-1,3 dieno); e os alcaloides (bases orgânicas que possuem um átomo de nitrogênio geralmente associado a uma estrutura cíclica constituída de 5-6 átomos de carbono) (BOURGAUD et al., 2001; SIMÕES et al., 2007; LEITE, 2009; AHARONI; GALILI, 2011).

Figura 1. Rotas biossintéticas gerais comprometidas com a síntese de metabólitos secundários.



Fonte: SIMÕES et al, 2007

Dada sua importância para o presente estudo, passamos a uma descrição sobre compostos fenólicos e alcaloides.

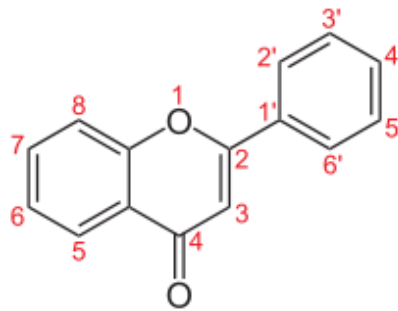
1.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam uma classe de metabólitos de grande diversidade estrutural, que possuem ao menos um anel aromático, no qual ao menos um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila livre ou envolvido em outra função: éter, éster ou glicosídeo (BRUNETON, 1999; SIMÕES et al., 2007). Os compostos fenólicos podem ser agrupados em diversas classes, cabendo ressaltar, devido sua importância, frequência de aparecimento e abundância, os flavonoides e os taninos (HARBORNE; BEXTER; MOSS, 1999).

Os flavonoides representam uma das mais importantes classes dos compostos fenólicos, com mais 4500 estruturas já descritas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Essas substâncias são altamente distribuídas por todo reino vegetal, com maior abundância em angiospermas (plantas espermatófitas cujas sementes são protegidas por frutos). Presentes na maioria dos tecidos vegetais, os flavonoides, de uma forma geral, representam os pigmentos das plantas. Eles são responsáveis pelas cores de flores, frutos e até folhas (BRUNETON, 1999; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Contudo, essa não é sua única função nos vegetais. Alguns flavonoides específicos estão envolvidos com: (i) a proteção da planta contra radiação ultravioleta; (ii) a atração insetos polinizadores; e (iii) a proteção contra herbívoros, bactérias, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SIMÕES et al., 2007; HASSANPOUR et al., 2011)

Os flavonoides possuem um esqueleto básico constituído por 15 átomos de carbono, disposto em C₆-C₃-C₆, geralmente arranjados na forma de três anéis, denominados de A, B e C (Fig. 2). Assim, podemos definir a unidade fundamental 2-fenilcromona (flavona) como a estrutura básica de um flavonoide (Fig. 2). Pequenas alterações nessa estrutura originam diferentes subclasses de flavonoides, como flavanonas, flavonas, flavonóis, flavan-3-ol, flavan-3,4-diol, antocianidinas, etc. (Fig. 3) (LEITE, 2009).

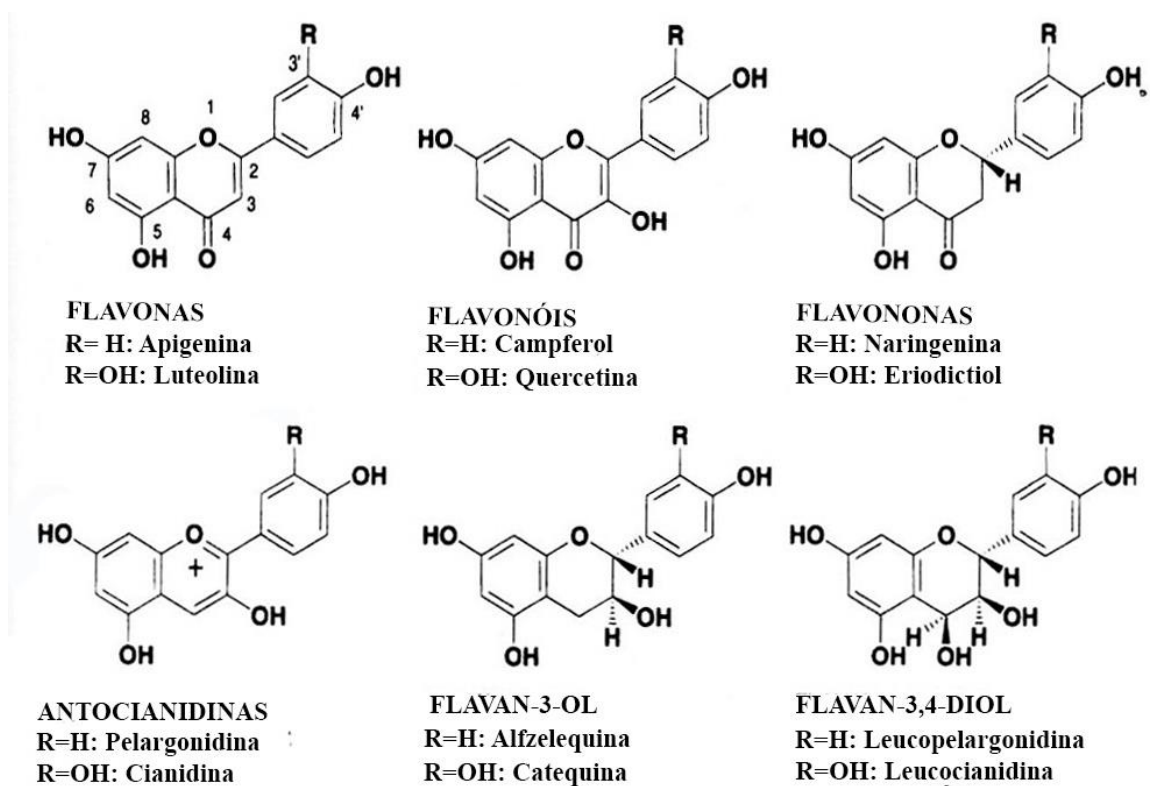
Figura 2. Estrutura da flavona (2-fenilcromona).



Fonte: Pubchem.

Estrutura da molécula 2-fenilcromona, com destaque para os anéis A, C e B, definidos da esquerda para a direita.

Figura 3. Exemplos de subclasses de flavonoides.



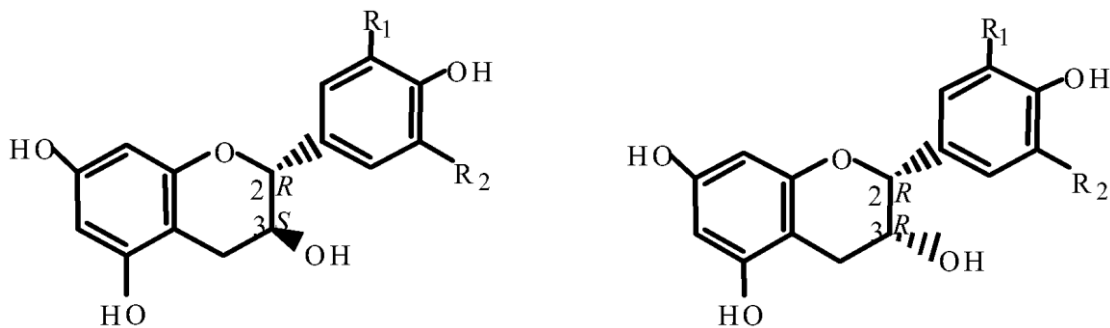
Fonte: BRUNETON, 1999.

Estruturas de diferentes subclasses de flavonoides, com destaque para as modificações de radicais (R) e as diferentes moléculas formadas.

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água e de alto peso molecular (500 a 3000 Dalton) capazes de formar complexos insolúveis com proteínas em soluções aquosas (HASSANPOUR et al., 2011). Eles são encontrados em praticamente todas as partes da plantas e estão associados ao mecanismo de defesa das mesmas contra herbívoros, pássaros e insetos, uma vez que essas substâncias conferem adstringência aos frutos e produtos vegetais (SIMÕES et al., 2007; HASSANPOUR et al., 2011). Os taninos são classificados em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2012).

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados como compostos que possuem um carboidrato como núcleo central (normalmente a glicose) e os grupos hidrolisáveis desses açúcares são esterificados com moléculas de ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos podem ser o ácido gálico, formando os taninos gálicos ou galotaninos, ou o ácido hexahidroxi-difênico, dando origem aos taninos elágicos ou elagitaninos (MONTEIRO et al., 2005; HASSANPOUR et al., 2011). Já os taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavonoides (flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol) (MONTEIRO et al., 2005). Dependendo da presença ou ausência de substituições hidroxílicas em determinadas regiões das unidades básicas de flavonoides, bem como do tipo de isômero óptico considerado, diferentes compostos são originados, como afzelequina, catequina, galocatequina, epi-afzelequina, epi-catequina e epi-galocatequina (Fig. 4) (LEITE, 2009). As proantocianidinas são denominadas de acordo com a natureza das unidades monoméricas de antocianidinas geradas após hidrólise ácida; assim, os termos procianidinas e prodelfinidinas, por exemplo, referem-se às proantocianidinas cujos produtos de hidrólise ácida são cianidina e delfinidina, respectivamente (LEITE, 2009).

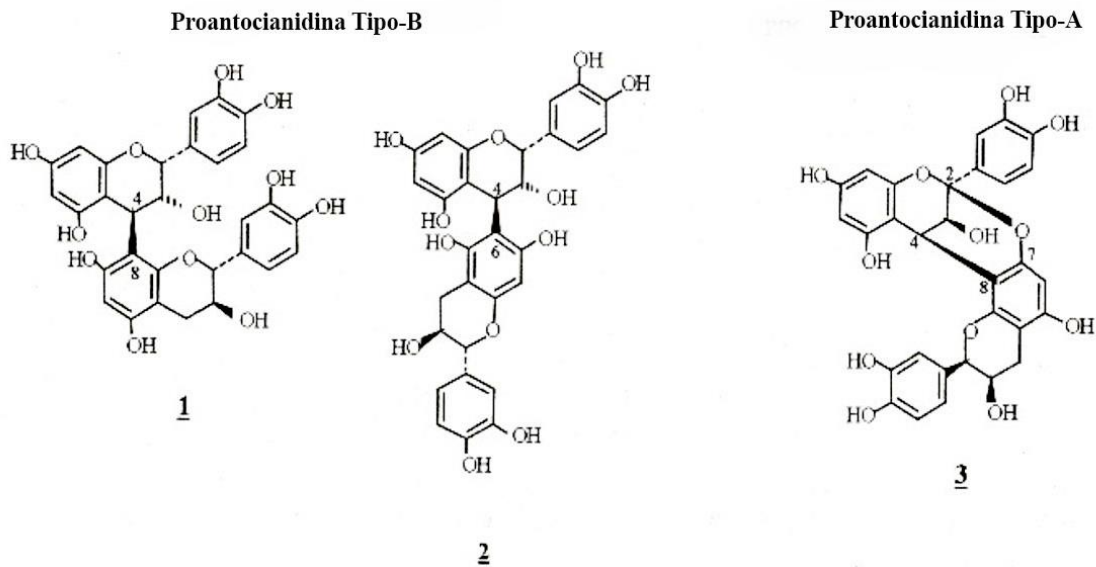
Figura 4. Unidades básicas formadoras das proantocianidinas.



Fonte: Google patentes. (+)-Afzelequina [H, H; R, S]; (+)-catequina [H, OH; R, S]; (+)-Galocatequina [OH, OH; R, S]; (-)-Epi-afzelequina [H, H; R, R]; (-)-Epicatequina [H, OH; R, R]; (-)-epigalocatequina [OH, OH; R, R]. Entre colchetes estão representados os radicais presentes em R1, R2 e a forma enantiomérica da molécula (de acordo com o sistema R-S), respectivamente.

De acordo com as ligações estabelecidas pelos seus monômeros, as proantocianidinas podem ser classificadas como em tipo A e B. Nas proantocianidinas do tipo A, os carbonos de posição 2 e 4 de um monômero, se unem ao outro através da hidroxila na posição 7 e do carbono de posição 6 ou 8, respectivamente. Já as proantocianidinas do tipo B, as ligações acontecem entre o carbono 4 de um monômero e o carbono de posição 6 ou 8 de outro (Fig. 5) (SIMÕES et al., 2007).

Figura 5. Proantocianidinas diméricas do tipo A e tipo B.



Fonte: SIMÕES et al., 2007

Exemplos de estruturas de moléculas de proantocinidinas diméricas. 1: epicatequina-(4 β →8)-catequina; 2: epicatequina-(4 β →6)-catequina; 3: robinetinidol-(2 β →7; 4 β →8) –epicatequina.

1.1.2 Alcaloides

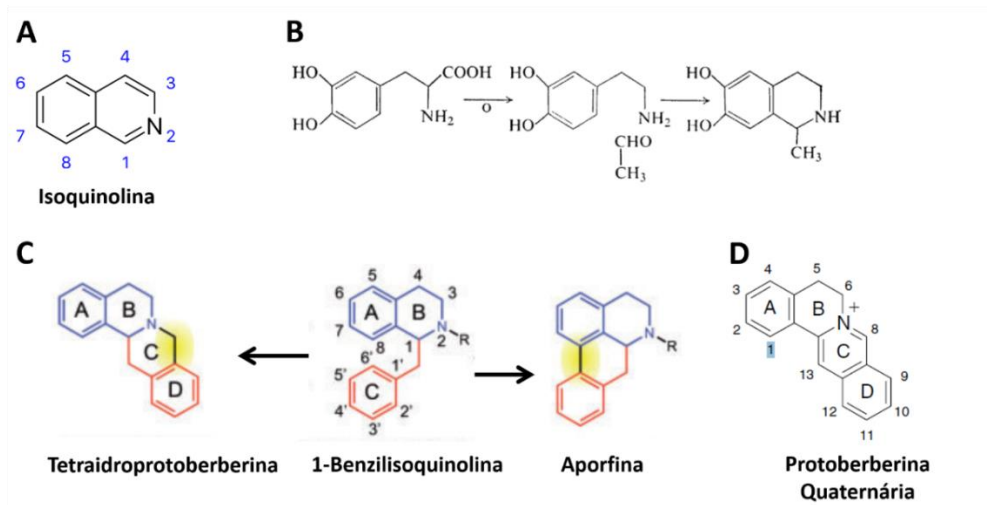
O termo alcaloide foi introduzido pelo químico alemão Wilhelm Meissner em 1818, para designar substâncias básicas de origem natural. Atualmente, os alcaloides são definidos como um grupo diverso de compostos químicos nitrogenados de origem natural e farmacologicamente ativos. Esses metabólitos são encontrados principalmente em plantas (especialmente em angiospermas), insetos, anfíbios e fungos, sendo menos comuns em mamíferos (LEITE, 2009).

Os alcaloides que contém um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico e que são derivados de aminoácidos, são denominados como *alcaloides verdadeiros* (SIMÕES et al., 2007). Os alcaloides verdadeiros são encontrados como sais, possuem grande atividade farmacológica e supõe-se que estejam presentes apenas no reino vegetal (BRUNETON, 1999). Já os compostos que possuem um átomo de nitrogênio que não pertence a um sistema heterocíclico, mas que também derivam de aminoácidos, são chamados de *protoalcaloides*. Finalmente, as substâncias que possuem átomo de nitrogênio com ou sem anéis heterocíclicos, mas que não tem como precursores os aminoácidos, mas sim terpenos e esteroides, são denominados como *pseudoalcaloides* (BRUNETON, 1999; SIMÕES et al., 2007)

Poucos aminoácidos estão relacionados com a biossíntese dos alcaloides, sendo eles: lisina, ornitina, histidina, tirosina, fenilalanina, triptofano, ácido antranílico e ácido nicotínico. Nesse sentido, os alcaloides podem ser classificados de acordo com o aminoácido precursor em questão (LEITE, 2009). Diferentes classes de alcaloides podem ser encontradas em cerca de 20% de todas espécies vegetais (FACCHINI, 2001). Eles podem estar presentes em todas os tecidos de um vegetal, sendo o local de estoque frequentemente diferente daquele no qual foram sintetizados (SIMÕES et al., 2007).

Devido à importância para o entendimento do presente estudo, citamos as classes de alcaloides isoquinolínicos. As isoquinolinas representam um dos maiores grupos de alcaloides e o núcleo isoquinolínico (Fig. 6A) é o bloco básico utilizado na biossíntese de uma série de alcaloides dessa classe, os quais são subdivididos em famílias, tais como: isoquinolinas simples, protoberberinas, aporfinas e muitas outras (GRYCOVÁ; DOSTÁL; MAREK et al., 2007; HAGEL; FACCHINI et al., 2013; BENTLEY, 2014). As isoquinolinas simples são sintetizadas a partir da condensação de β -feniletilaminas (basicamente diidroxifenilalanina) com formaldeído ou acetaldeído (ou equivalentes) (Fig. 6B); por outro lado, várias famílias de isoquinolinas são derivadas do intermediário (S)-norcoclaurina, a qual é formada pela condensação de dois derivados da tirosina, a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído (HAGEL; FACCHINI et al., 2013; BENTLEY, 2014). A (S)-norcoclaurina possui uma estrutura 1-benzilisoquinolina, núcleo básico do qual derivam protoberberinas, aporfinas, benzilisoquinolinas propriamente ditas, etc (Fig. 6C). Cabe ressaltar que alguns autores classificam todos os derivados da 1-benzilisoquinolina como benzilisoquinolinas (HAGEL; FACCHINI et al., 2013), enquanto outros fazem clara distinção entre as diversas classes derivadas (BENTLEY, 2014). Os alcaloides identificados até o presente momento em anonáceas são todos derivados da 1-benzilisoquinolina (BENTLEY, 2014), sendo que duas classes merecem destaque devido à importância para a compreensão do presente trabalho, as protoberberinas/tetraidroprotoberberinas e as aporfinas. A maioria dos alcalóides protoberberina presentes nas plantas são tetraidroprotoberberinas (i.e., possuem o anel que contém o nitrogênio totalmente reduzido; Fig. 6C) ou como sais de protoberberina quaternária (Fig. 6D), embora alguns exemplos de diidroprotoberberinas tenham sido descritos (GRYCOVÁ; DOSTÁL; MAREK et al., 2007). Por sua vez, as aporfinas são alcaloides que possuem uma estrutura tetracíclica que incorpora uma subestrutura tetraidroisoquinolínica, como evidenciado na figura 5 C (KAPADIA; HARDING, 2016).

Figura 6. Características estruturais de alcaloides isoquinolínicos.



Fonte: (A) Pubchem; (B) BENTLEY, 2014 (modificado); (C) HAGEL; FACCHINI et al., 2013 (modificado); (D) GRYCOVÁ; DOSTÁL; MAREK et al., 2007.

Estrutura básica de um alcaloide isoquinólico (A); Síntese de alcaloides isoquinolínicos simples (B); Estrutura do núcleo básico 1-benzilisoquinolina, o qual origina diferentes subclasses de alcaloides, como as protoberberinas/tetraidroprotoberberinas e aporfinas (C); Sal de protoberberina quaternária, uma das formas de protoberberinas encontradas em plantas (D).

Extratos de plantas contendo alcaloides são utilizados pela humanidade há milhares de anos como medicamentos, estimulantes, drogas, narcóticos e venenos refletindo, assim, seu amplo espectro de atividades biológicas (HASHIMOTO; YAMADA, 1994; SIMÕES et al., 2007). As pesquisas com alcaloides se iniciaram com o isolamento da morfina em 1806. Desde então, milhares de alcaloides foram identificados e descritos. Diversos alcaloides ainda são utilizados de forma terapêutica, puros ou em associação, assim como na forma de derivados. Além disso, muitos alcaloides serviram como modelos para a elaboração de diversas drogas sintéticas utilizadas atualmente (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SIMÕES et al., 2007).

1.2 Pesquisas com produtos naturais

Como citado anteriormente, o homem utiliza vegetais para sua sobrevivência desde tempos remotos, seja para alimentação, seja também como forma de tratamento de doenças. De fato, um dos primeiros relatos sobre o emprego de plantas como instrumento de tratamento data de aproximadamente 2600 a.C. (LEITE, 2009). A utilização das plantas se iniciou de forma empírica, através do conhecimento intuitivo de diferentes civilizações, que aprenderam a diferenciar espécies úteis daquelas prejudiciais ou tóxicas à saúde. As informações sobre o uso terapêutico de plantas medicinais foram transmitidas entre as gerações auxiliando, assim,

na seleção das espécies vegetais de maior relevância quanto às suas atividades farmacológicas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso terapêutico de plantas é a ferramenta mais utilizada na medicina alternativa e na medicina complementar em países em desenvolvimento. Considerando a abundância de espécies empregadas e o grande número de indicações populares, está claro que as caracterizações farmacológicas de produtos vegetais representam um nicho de pesquisa bastante amplo e promissor. Os estudos da farmacologia de produtos naturais possibilitam não apenas validar cientificamente o uso popular, mas também contribuem sobremaneira para o desenvolvimento de novos fármacos (FABRICANT; FANSWORTH, 2001).

A investigação de plantas medicinais requer inicialmente a seleção de uma espécie alvo. Para tanto, várias abordagens podem ser utilizadas. Dentre elas, três se destacam: (i) empírica, (ii) etnofarmacológica e (iii) quimiotaxonômica (MACIEL et al., 2002). A seleção empírica, como o próprio nome sugere, compreende a coleta ao acaso de espécies vegetais para triagens fitoquímicas e farmacológicas, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta (MACIEL, 2002; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). A abordagem etnofarmacológica, por sua vez, consiste na seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico. As informações fornecidas por essas populações permitem a elaboração de hipóteses quanto aos possíveis efeitos farmacológicos, bem quanto aos mecanismos de ação neles envolvidos (MACIEL et al., 2002; ELISABETSKY, 2003). Finalmente, a abordagem quimiotaxonômica consiste na seleção de espécies de uma família ou gênero para as quais se tenha algum conhecimento fitoquímico de ao menos uma espécie do grupo (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Obviamente, o conhecimento da(s) atividade(s) farmacológica(s) em questão direciona a seleção na abordagem quimiotaxonômica (CORDEL, 2000).

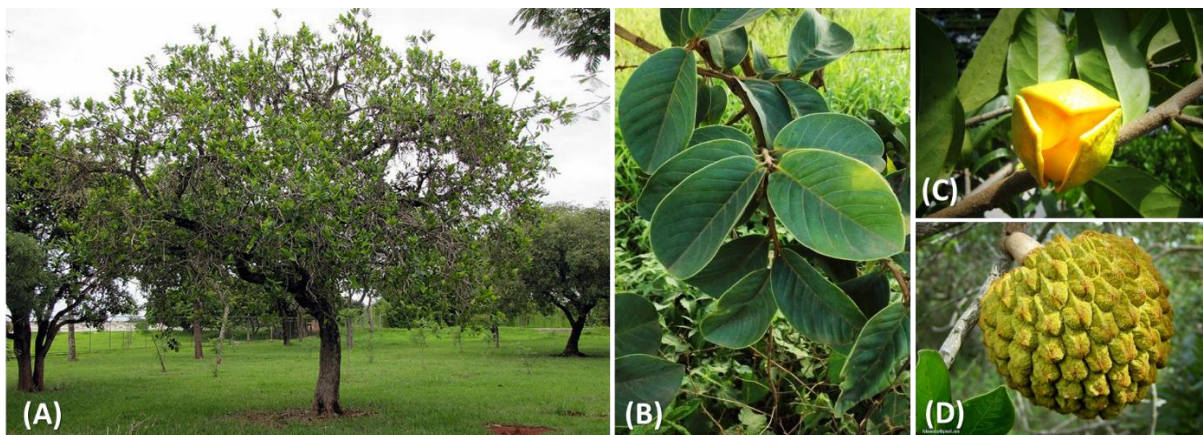
1.3 *Annona crassiflora* Mart.

A *A. crassiflora* Mart. é uma árvore frutífera pertencente à família Annonaceae, conhecida popularmente como “marolo, araticum, araticum-do-cerrado, araticum-do-campo, pinha-do-cerrado” (Fig. 7). A família compreende aproximadamente mais de 130 gêneros e 2300 espécies vegetais. A *A. crassiflora* é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, sendo uma das 25 espécies mais frequentes nesse bioma (ALMEIDA, 1998; VILAR et al., 2008; SOARES et al., 2009; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Assim como várias outras espécies

de Annonaceae, a *A. crassiflora* é bastante empregada pela medicina tradicional. Suas folhas, frutas, sementes e tronco são utilizados para o tratamento de feridas, doenças venéreas, picada de cobra, diarreia, reumatismo, neoplasias malignas, pediculose, indução de menstruação e também como antimicrobiano (ALMEIDA, 1998; VILAR et al., 2008; SOARES et al., 2009; VILAR et al., 2011).

Apesar do uso extensivo, existem poucos estudos na literatura que tenham caracterizado farmacologicamente essa espécie. Roesler e colaboradores (2006) avaliaram o efeito do extrato dos frutos de *A. crassiflora* (pele, poupa e sementes) e constataram a presença de substâncias com grande potencial antioxidante. Em 2008, Vilar e colaboradores verificaram que o extrato de folhas de *A. crassiflora* apresenta efeito antimutagênico, que pode contribuir para um possível potencial anticarcinogênico. Dados do nosso grupo de pesquisa (FERRAZ et al., 2017) evidenciaram o efeito antidiarreico do extrato aquoso liofilizado de folhas de *A. crassiflora*, bem como possibilitaram descrever seu perfil fitoquímico. O extrato possui diferentes metabólitos, como alcaloides (xilopina, isolaurelina, tetrahidroprotoberberinas), flavonoides (diversos glicosídeos de quercetina, rutina, catequina, epicatequina, campferol), bem como proantocianidinas (taninos condensados) (FERRAZ et al., 2017). Os efeitos hipotensor e/ou vasodilatador já foram relatados para muitos membros da maioria das classes de metabólitos identificados na *A. crassiflora* (DUARTE et al., 1993; HUANG et al., 1999). Ainda, atividade farmacológica condizente com a ação hipotensora foi relatada para o alcaloide xilopina, potente antagonista alfa-adrenérgico *in vitro* (LIU; HAN; WANG, 1989).

Figura 7. Imagem representativa da espécie vegetal *A. crassiflora* Mart.



Fonte: (A) Useful tropical plants; (B) Adilson Britto; (C) Ramon Lamar de Oliveira Junior; (D) Sob a sombra das árvores.

A *A. crassiflora* é uma espécie vegetal de porte arbóreo, a qual mede entre 4 a 8 metros de altura, com tronco geralmente tortuoso, com 20 a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa (A); as suas folhas são alternas simples (B); as suas são flores axilares, com pétalas grossas e carnosas (C); o seu fruto é arredondado,

externamente marrom claro com polpa de cor amarelada firme, medindo 15cm de diâmetro e pesando até 2 kg de peso (D) (LORENZI, 1998; VIERA; CAMILLO; CORADIN, 2016).

Outra espécie da família Annonaceae, a *Annona muricata* Linn, também conhecida como graviola, é uma árvore frutífera que está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais por todo mundo (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Do ponto de vista etnofarmacológico, as folhas dessa espécie são utilizadas para o tratamento de cistite, dor de cabeça, diabetes, insônia e hipertensão (BRUSSEL, 2004; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). A avaliação do perfil fitoquímico das folhas de *A. muricata* evidenciou a presença de substâncias como diferentes alcaloides (xilopina, isolaurelina, etc) e flavonoides (rutina, quercetina, campferol, dentre outros) de grande importância farmacológica (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Cabe salientar a semelhança entre os perfil fitoquímico da *A. muricata* com aquele da *A. crassiflora*. Além disso, o extrato de folhas da *A. muricata* já foi avaliado em diversos estudos, muitos dos quais confirmaram a presença de efeitos farmacológicos, como por exemplo, sua propriedade hipotensiva (ADEOLE; CAXTON-MARTINS, 2006; SOUSA et al., 2010; FOONG; HAMID, 2012; NWOKOCHA, 2012; MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

1.4 Mecanismos de controle da pressão arterial (PA) e Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

As Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VII da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016), considera a HAS como uma condição clínica de caráter multifatorial definida por níveis elevados e sustentados de PA, sendo considerados portadores de HAS indivíduos com PA igual ou superior a 140x90 mmHg (NOBRE et al., 2013). A HAS é considerado um problema de saúde pública no mundo todo, uma vez que é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares importantes, especialmente acidentes vasculares cerebrais (CHOW et al., 2013). No Brasil, a HAS é a doença que mais afeta a população e estimativas do Ministério da Saúde apontam que cerca de 17 milhões de pessoas sejam portadoras. Na maioria dos casos, a HAS decorre de disfunções em diferentes sistemas reguladores, o que dificulta o estabelecimento de fatores etiológicos; por esse motivo, tal condição também é denominada de hipertensão essencial (IRIGOYEN; KRIEGER; CONSOLIM-COLOMBO, 2005).

A PA é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. O controle desses dois parâmetros é de suma importância para a homeostasia do organismo, uma vez que

a perfusão tecidual adequada é garantida pela manutenção da PA em níveis adequados e constantes, quer o indivíduo esteja em repouso ou em atividade (GUYENET, 2006). A regulação da PA é uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo. Durante as 24 horas do dia, o fluxo sanguíneo de um indivíduo pode passar por modificações consideráveis em consequência de diferentes quadros comportamentais. Contudo, essas modificações não resultam em alterações relevantes na PA graças à integração dos sistemas fisiológicos que agem em conjunto para manter a pressão dentro de uma faixa relativamente estreita de variação (SANJULIANI, 2002; IRIGOYEN; KRIEGER, CONSOLIM-COLOMBO, 2005).

O débito cardíaco se trata da quantidade de sangue que o coração bombeia em um minuto. Esse parâmetro é determinado pela contratilidade miocárdica, frequência cardíaca (FC), e volumes de pré-carga e pós-carga. A contratilidade miocárdica e a FC são reguladas pela atividade de ambos os braços do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático. Já os volumes de pré-carga e pós-carga estão relacionados ao volume de sangue que entra e deixa o coração, sendo assim determinados principalmente pela PA e o tônus vascular (GUYENET, 2006). O tônus vascular (nível de contração das células musculares lisas das paredes dos vasos), por sua vez, é o principal fator que influencia a resistência ao fluxo sanguíneo, desempenhando dessa forma um papel importante na regulação da pressão sanguínea (JACKSON, 2000). A regulação dessa atividade contrátil é dependente de uma interação complexa de estímulos vasodilatadores e vasoconstritores mediados por hormônios, neurotransmissores e fatores derivados do endotélio (JACKSON, 2000). Cabe salientar que alterações nesses mecanismos de controle, alguns dos quais descreveremos abaixo, podem resultar no desenvolvimento de doenças como a hipertensão arterial (ZAGO; ZANESCO, 2006).

1.4.1 Algumas Considerações sobre Canais de cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) e o Sistema Cardiovascular

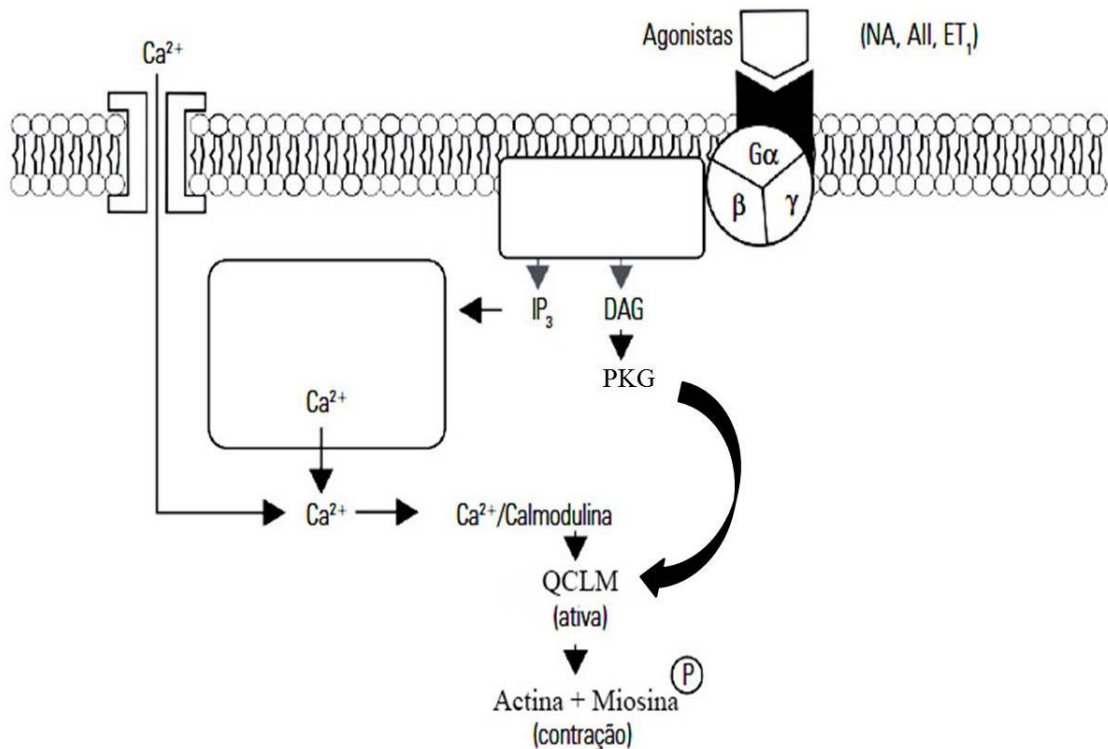
Os canais iônicos desempenham papel de grande importância na regulação do tônus vascular e, conseqüentemente, na regulação da PA. A contração nas células musculares lisas ocorre através da ação de proteínas contráteis especializadas (actina-miosina), cuja interação é diretamente regulada pela concentração intracelular de Ca^{2+} . Portanto, os canais de Ca^{2+} têm papel central na regulação da PA (JACKSON, 2000). Tanto sinais elétricos quanto químicos podem ativar a liberação de Ca^{2+} intracelular armazenado e/ou aumentar o influxo de Ca^{2+} extracelular para a célula. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular pode ocorrer via

canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, ativados por mudanças no potencial elétrico da célula, ou via canais de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs, do inglês *receptor operated channels*), ativados pela interação de agonistas com seus receptores (KARAKI; WEISS, 1984).

Os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes têm sua função regulada por mudanças no potencial de membrana da célula muscular (JACKSON, 2000). O potencial de membrana, por sua vez, é determinado pelo gradiente iônico, mantido pela ação de canais de K^+ , da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ e do trocador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (estequiometria: 3 íons Na^+ para cada 1 íon Ca^{2+}) (WAID; BURINI, 1991). Nas células musculares lisas, os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes podem ser de 2 tipos: (i) do tipo T (transientes), caracterizados por sua baixa condutância, são ativados por uma despolarização próxima do potencial de repouso e apresentam rápida inativação; e (ii) do tipo L (longa duração) sensíveis a diidropiridinas, os quais são ativados por uma intensa despolarização e apresentam inativação lenta. Os canais do tipo L são os mais predominantes nessas células e por esse motivo, mais estudados (CRIBBS, 2006). O início da vasoconstrição se dá pela abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L no sarcolema durante a despolarização da membrana plasmática celular. A abertura dessas canais gera o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, resultando na ativação da calmodulina. O complexo Ca^{2+} -calmodulina (molécula de calmodulina ligada a quatro íons Ca^{2+}), por sua vez, irá ativar a quinase da cadeia leve da miosina (QCLM), a qual medeia a fosforilação das cadeias leves de miosina. Essa fosforilação expõe os sítios de ligação da miosina, permitindo a interação da mesma com um filamento de actina, resultando em contração do músculo liso (PAIVA; FARIAS, 2005).

Nos ROCs, por sua vez, o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular se dá através da ação de agonistas, os quais determinam a abertura do poro do canal formado pela molécula receptora. Outra fonte de Ca^{2+} citosólico são as reservas intracelulares, em especial aquelas do retículo sarcoplasmático. A saída do Ca^{2+} dessas reservas está intimamente relacionada aos níveis de trifosfato de inositol (IP_3). Assim, diversos agonistas, como acetilcolina, noradrenalina, dentre outros, os quais interagem com receptores metabotrópicos, induzem mudança na conformação da proteína Gq/11 acoplada ao mesmo, ativando a fosfolipase C (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989; WAIB; BURINI, 1991). A fosfolipase C ativada hidrolisa o difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em IP_3 e diacilglicerol (DAG) (Fig. 8). O IP_3 promove a liberação do Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC ativada está envolvida em diferentes ações, como fosforilação direta da QCLM, assim como a manutenção da sua ativação, concorrendo para a contração da célula muscular lisa (Fig. 8) (WAIB; BURINI, 1991).

Figura 8. Regulação da contração da célula muscular lisa pelos canais de Ca^{2+} .

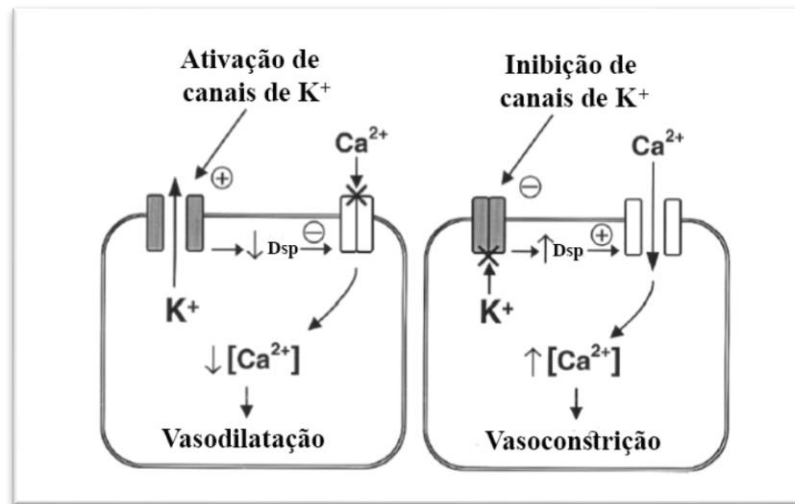


Fonte: PAIVA; FARIAS, 2005.

O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , seja pela abertura de canais de Ca^{2+} dependentes, seja pelo efluxo de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático após interação de agonistas com receptores metabotrópicos, resulta na ativação do complexo Ca^{2+} /calmodulina, que por sua vez ativa a quinase da cadeia leve da miosina (QCLM), a qual medeia a fosforilação das cadeias leves de miosina. Essa fosforilação permite a interação da miosina com um filamento de actina, resultando em contração do músculo liso. IP₃: trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol; NA: noradrenalina; AII: angiotensina; ET₁: endotelina.

Os canais de K^{+} também apresentam papel de grande importância no controle do tônus vascular. A abertura de canais de K^{+} na célula muscular lisa resulta no efluxo de íons K^{+} da célula, causando um estado de hiperpolarização celular. A hiperpolarização resulta no fechamento de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e consequente diminuição do influxo de Ca^{2+} , levando à vasodilatação (Fig. 9) (NELSON; QUAYLE, 1995). Existem pelo menos 5 tipos diferentes de canais de K^{+} na célula muscular lisa: canais de K^{+} voltagem-dependentes (K_v), canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} (ou ativados por Ca^{2+} : K_{Ca}), canais de K^{+} retificadores de influxo (K_{ir}), canais de K^{+} ATP-dependentes (K_{ATP}) canais de K^{+} ativado por GMPc (AKATA, 2007).

Figura 9. Regulação da contração da célula muscular lisa pelos canais de K^+ .



Fonte: SOBEY, 2001.

A abertura de canais de K^+ presente na membrana das células musculares lisas vasculares, provoca o aumento da saída de íons K^+ do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva, causando hiperpolarização, da membrana celular, inativação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente e consequente vasodilatação. O fechamento de canais de K^+ diminui, causando despolarização (Dsp) da membrana celular, ativação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, aumentando nível de Ca^{2+} intracelular, causando vasoconstrição.

Dada a importância para o presente estudo, faremos uma breve descrição sobre o papel dos canais K_{ATP} e K_{Ca} para a manutenção do tônus vascular, bem como das correntes de K^+ envolvidas na repolarização do tecido cardíaco. Os canais K_{ATP} são encontrados em diferentes tipos celulares, incluindo células musculares lisas de diferentes tecidos, como em artérias cerebrais, renais e mesentéricas. A exposição de regiões intracelulares desses canais ao ATP inibe a atividade dos mesmos. Drogas da classe das sulfoniluréias, como a glibenclamida, são capazes de inibir seletivamente os canais K_{ATP} (AKATA, 2007). Já os canais K_{Ca} estão presentes em praticamente todas as células excitáveis, sendo ativados pela despolarização da membrana plasmática celular e aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Os canais K_{Ca} são divididos em três diferentes subtipos, os de alta condutância (BK_{Ca}), os de condutância intermediária (IK_{Ca}) e os de baixa condutância (SK_{Ca}) (AKATA, 2007). Os canais BK_{Ca} são os canais de Ca^{2+} mais abundantes nas células musculares lisas vasculares e presume-se que eles sejam responsáveis pela manutenção do potencial de ação em pequenos vasos miogênicos. As toxinas caribdotoxina e iberiotoxina promovem bloqueio farmacológico desse tipo de canal (AKATA, 2007; KO et al., 2008). Os canais do tipo IK_{Ca} e SK_{Ca} estão relacionados à hiperpolarização celular e vasodilatação induzida por fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) (GARLAND; DORA, 2017). Esse processo ocorre através do aumento da concentração de Ca^{2+} nas células endoteliais, resultando na estimulação canais de K^+ , principalmente os IK_{Ca} e SK_{Ca} , resultando em efluxo de K^+ e, consequente, indução do

estado de hiperpolarização das células endoteliais. Essa hiperpolarização se espraia para as células musculares lisas adjacentes através de junções comunicantes do tipo *gap* (GARLAND; DORA, 2017).

O potencial de ação cardíaco é dividido em 5 fases distintas, caracterizadas por diferentes correntes iônicas. A fase 0 compreende a fase da despolarização da membrana, a qual ocorre após rápido influxo de Na^+ (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006). A repolarização, por sua vez, acontece de forma mais lenta e compreende as 3 fases seguintes: a fase 1, repolarização precoce, ocorre rapidamente com a abertura de poucos canais de K^+ ; em seguida, a fase 2, denominada como platô, é consideravelmente mais lenta, uma vez que as correntes de K^+ nessa fase são de lenta ativação ou de baixa condutância; a fase 3 assinala o fim do potencial de ação; por fim, a fase 4 constitui o retorno do potencial ao repouso (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006).

A corrente de retificação tardia de K^+ (I_{Kr}) é a principal corrente envolvida na fase 3 da repolarização das células cardíacas. Atualmente, sabe-se que essa corrente possui dois componentes distintos, com propriedades específicas e sensibilidade diferente a drogas: o componente rápido (I_{Kr}) e o componente lento da corrente de retificação tardia do K^+ (I_{Ks}) (CHENG; KODOMA, 2004). Apesar de ambos regularem o processo de repolarização, dentro de certos limites, quando um componentes está por algum motivo em disfunção, o outro aumenta sua atividade como forma de compensação (CHENG; KODOMA, 2004).

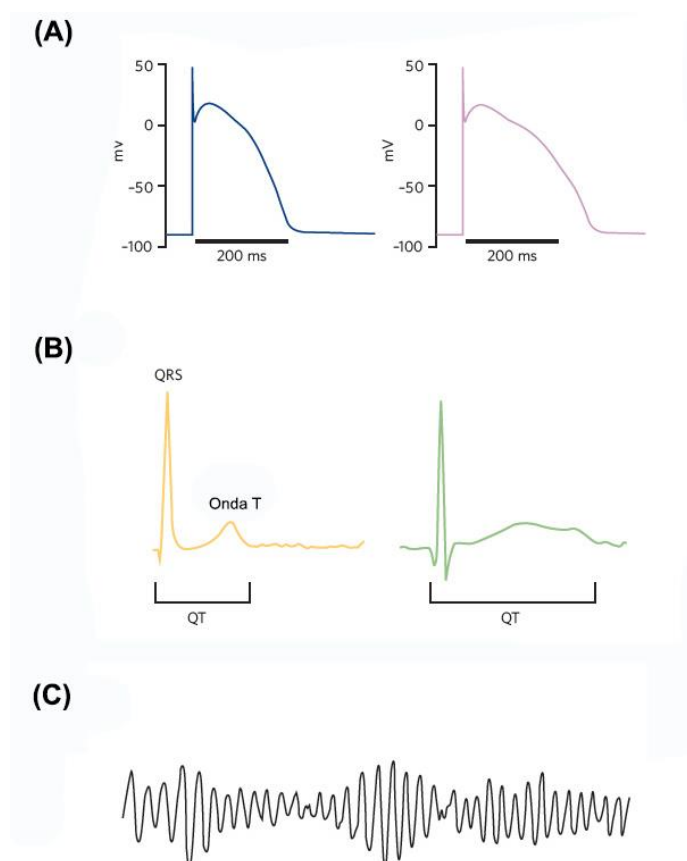
Apesar da atividade conjunta, o I_{Kr} é o principal responsável pelo efluxo de K^+ e consequentemente, pela repolarização (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006). O I_{Kr} é conduzido por canais voltagem-dependentes, frequentemente denominado como canais HERG, os quais são formados por duas subunidades: (i) a subunidade α , codificada pelo gene hERG (do inglês *human-ether-a go-go gene*¹) ou KCNH2 (em ratos), a qual forma o poro principal; (ii) e a subunidade β , codificada pelo gene MiRP1 (em humanos) ou KCNE2 (em ratos), que está relacionada à regulação da atividade do canal (CHENG; KODOMA, 2004; MOSS; KASS, 2005; KONOPELSKI; UFNAL, 2016). Diferentes classes de drogas, tanto as indicadas para distúrbios cardiovasculares (como antiarrítmicos), quanto as de uso comum (alguns antibióticos e anti-histamínicos, por exemplo), têm a capacidade de inibir os canais HERG, diminuindo o efluxo de K^+ e produzindo prolongamento do intervalo QT (iQT) do eletrocardiograma (ECG) (LAGRUTTA; TREPAKOVA; SALATA, 2008). Cabe lembrar que

¹O gene hERG, descrito por Trudeau e col. (1995) é o homólogo humano do gene *ether-à-go-go* encontrado na mosca *Drosophila*; William Kaplan nomeou esse gene em 1960, ao observar que quando moscas com mutações no mesmo são anestesiadas com éter, suas pernas começam a se agitar, como em uma dança então popular na boate *Whiskey A Go-Go* em West Hollywood, Califórnia (VANDERBERG et al., 2012).

o iQT engloba o tempo do início da despolarização ventricular até o final da repolarização ventricular (Fig. 10A e B) (THALER, 2007).

Assim, a diminuição do efluxo de K^+ resulta em uma menor taxa de inativação de canais de Ca^{2+} , contribuindo para um maior influxo deste íon. O aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , por sua vez, produz uma corrente despolarizante mediada por Na^+ , o que ocorre através da ação do trocador $(3)Na^+-(1)Ca^{2+}$. A despolarização resultante gera pós-despolarizações precoces (i.e., despolarizações que ocorrem durante a fase de repolarização das fibras miocárdicas), deflagrando, dessa forma, taquiarritmias ventriculares e *Torsades de pointes* (TdP) (VISKIN, 1999). A TdP é uma taquiarritmia ventricular polimórfica potencialmente fatal, associada ao aumento do tempo de repolarização das células musculares cardíacas e, conseqüentemente, diretamente relacionada ao prolongamento do iQT (Fig. 10C) (RODEN, 2008).

Figura 10. Esquema representativo do prolongamento do iQT e suas conseqüências.



Fonte: SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006 (modificado).

O potencial normal de ação dos miócitos do ventrículo humano (esquerda) e um potencial de ação prolongado simulado, no qual a corrente dos canais HERG foi reduzida em 80% (A). Traçado normal de um ECG para um único ciclo cardíaco (esquerda) e traçado anormal de um ECG com iQT prolongado (direita) (B). O complexo QRS representa a despolarização e a onda T indica repolarização dos ventrículos. O intervalo iQT representa o tempo entre despolarização inicial e repolarização final dos ventrículos. Diagrama de traçado de ECG mostrando uma arritmia do tipo *Torsade de pointes* (TdP) (C).

1.4.2 Fatores Endoteliais

As células endoteliais contribuem de diversas formas para a regulação da homeostase vascular, visto que as mesmas são capazes de sintetizar e liberar diversas substâncias que estimulam tanto a vasoconstrição quanto a vasodilatação (TRIGGLE et al., 2012). A importância do endotélio no tônus vascular teve maior destaque após a publicação dos resultados observados em um estudo pioneiro e de extrema relevância, onde Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que o relaxamento vascular produzido pela acetilcolina era dependente da integridade das células endoteliais, as quais eram capazes de liberar um fator (ou fatores) que se difundia para a musculatura lisa. Tal fator foi denominado inicialmente de EDRF (do inglês, *endothelium-derived relaxing factor*) e estudos subsequentes evidenciaram que o principal EDRF era óxido nítrico (NO) (IGNARRO, 1987). O NO é considerado atualmente a substância vasodilatadora mais importante liberada pelo endotélio. A sua biossíntese ocorre através da oxidação enzimática do aminoácido L-arginina, a qual é mediada pela óxido nítrico sintase (NOS), originando como produto da reação NO e L-citrulina. A NOS constitutivamente expressa no endotélio, denominada como NOS endotelial (eNOS), é uma enzima dependente do complexo Ca^{2+} -calmodulina. Sendo assim, com o aumento intracelular de Ca^{2+} induzido por agonistas, como acetilcolina, ou por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (força mecânica induzida na parede dos vasos pelo aumento do fluxo sanguíneo), a eNOS é ativada (MAYER; ANDREW, 1999). O processo de vasodilatação ocorre através do estímulo da guanilato ciclase, a qual aumenta os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc ativa, por sua vez, a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a qual fosforila alvos que resultam na abertura de canais BK_{Ca} , com consequente hiperpolarização celular e fechamento de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes da membrana plasmática. Em conjunto, esses eventos acarretam diminuição nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} e relaxamento muscular (BATLOUNI, 2001; AKATA, 2007). Contudo, o NO também pode causar vasodilatação por meio da ativação de canais de K^+ diretamente, sem a participação da via GMPc/PKG (LINCOLN et al., 1994). Ainda, diversos outros mecanismos também já foram propostos, como o aumento da captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e inibição de sua liberação por essa organela, aumento da extrusão de Ca^{2+} pela célula, etc (AKATA, 2007).

À semelhança do descrito para o NO, os produtos derivados do endotélio a partir da atividade das enzimas ciclooxigenases (COXs) são de extrema importância no que diz respeito à modulação do tônus vascular. As COXs são responsáveis por transformar o ácido

araquidônico (AA) em endoperóxidos cíclicos, as prostaglandinas PGG₂ e PGH₂. Os endoperóxidos são moléculas instáveis, as quais são rapidamente biotransformadas por diferentes enzimas, dando origem a substâncias de grande importância na função vascular, como a prostaciclina (PGI₂), um potente vasodilatador, e o tromboxano A₂ (TXA₂), um prostanóide vasoconstritor (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011).

A PGI₂, sintetizada pela ação da prostaciclina sintase, induz vasodilatação através da interação com seus receptores (receptores IP) presentes nas células da musculatura lisa vascular. Essa interação promove a estimulação de uma cascata de sinalização que culmina com a ativação da adenilato ciclase e consequente aumento nas concentrações intracelulares de monofosfato cíclico adenosina (AMPc). O AMPc estimula então a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual promove a fosforilação de alvos proteicos, resultando na diminuição das concentrações intracelulares de Ca²⁺, inibição da QCLM e, conseqüentemente, relaxamento vascular (AKATA, 2007; FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). O TXA₂, por sua vez, induz vasoconstrição ao interagir com receptores TP das células musculares lisas, promovendo o aumento da concentração plasmática de Ca²⁺, tanto de compartimentos extracelulares quanto intracelulares (retículo sarcoplasmático). Cabe ressaltar que as outras prostaglandinas, como a PGH₂, também podem estimular os receptores TP (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011).

1.4.3 Regulação da PA pelo sistema nervoso autônomo

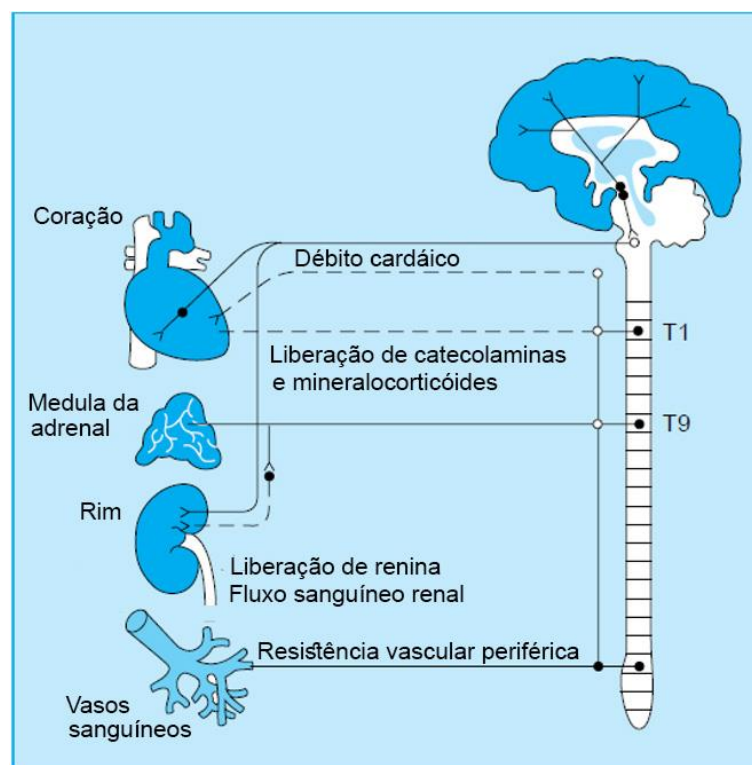
O sistema nervoso autônomo (SNA) exerce papel fundamental no controle da PA (CONSOLIM-COLOMBO; FIORINO, 2005) (Fig. 11). O braço simpático do SNA excita o sistema cardiovascular e participa de três arcos reflexos, os quais são acionados através de estruturas especializadas que detectam e corrigem mudanças na PA (barorreceptores), no volume ou composição química do sangue (receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores arteriais) (GUYENET, 2006).

Os barorreceptores funcionam como o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA a curto prazo. Essas estruturas são neurônios sensoriais sensíveis ao estiramento situados em grandes vasos (aorta e carótida) (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015) e apresentam atividade contínua em repouso (GUYENET, 2006). Assim, os sinais eferentes simpáticos associados à atividade dos barorreceptores regulam a atividade cardíaca e dos rins (secreção de renina), a liberação de adrenalina e noradrenalina pela medula da glândula adrenal e o tônus arteriolar (Fig. 11) (JÄNIG; HÄBLER, 2003; GUYENET, 2006). Em longo

prazo, a atividade barorreceptora pode influenciar o controle da PA através da regulação do fluxo sanguíneo renal, reabsorção de Na^+ tubular e secreção de renina (Fig. 11) (GUYENET, 2006).

Quando há aumento da PA, os barorreceptores são ativados, aumentando-se a geração de potenciais de ação que são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário através do nervo glossofaríngeo (carótida) e vago (aorta) (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001). Esses estímulos por sua vez são integrados e retransmitidos a uma rede de neurônios centrais que irão equalizar os estímulos parassimpáticos e simpáticos com o intuito de regular os níveis pressóricos: há redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal, resultando em dilatação de vasos, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica (CAMPONOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; DRAGER; KRIEGER, 2009). A queda da PA, por sua vez, resulta em uma menor deformação da parede dos vasos, levando à redução proporcional da gênese de potenciais de ação pelos barorreceptores (IRIGOYEN; KRIEGER; CONSOLIM-COLOMBO, 2005).

Figura 11. Esquema representativo do sistema nervoso autônomo e o controle da PA.



Fonte: BEEVERS; GREGORY; O'BRYEN, 2001 (modificado).

A figura mostra os locais de atuação do sistema nervoso autônomo, com intuito de regular a PA. No sistema nervoso simpático, os neurônios pré-ganglionares estão localizados nos segmentos torácicos e lombares altos da medula espinhal. Com relação à localização dos neurônios pós-ganglionares, no sistema simpático eles estão localizados nos gânglios paravertebrais ou no pré-vertebrais, que se encontram a alguma distância dos órgãos-alvo (SAPER, 2002).

Apesar do papel central dos barorreceptores arteriais na modulação dos níveis de PA, o reflexo neural da circulação também depende em grande parte da atividade dos receptores cardiopulmonares (GUYENET, 2006). Essas estruturas também são mecanorreceptores; contudo, sua estimulação está mais relacionada à expansão de volume sanguíneo local, uma vez que se encontram em um sistema de baixa pressão (CAMPGONOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). Os receptores cardiopulmonares são classificados em diferentes grupos, conforme sua localização e função na homeostase cardiovascular. O primeiro grupo, situado nas junções veno-atriais, é ativado pelo enchimento e contração dos átrios cardíacos. Uma vez ativados, eles promovem aumento da frequência cardíaca decorrente da elevação da atividade simpática para o nó sinusal, assim como estimulam a vasodilatação reflexa em leitos específicos (vasos que irrigam músculos esqueléticos) e aumentam a excreção urinária de água (IRIGOYEN; KRIEGER; CONSOLIM-COLOMBO, 2005). O segundo grupo, localizados difusamente nas câmaras do coração (nervo vago), quando ativados, agem como os barorreceptores, reduzindo a atividade simpática e aumentando a atividade vagal para o coração (IRIGOYEN; KRIEGER; CONSOLIM-COLOMBO, 2005). O terceiro grupo também se situa de forma difusa nas câmaras do coração, porém através em nervos simpáticos; estes são ativados tanto por estímulos mecânicos quanto por substâncias produzidas e/ou liberadas pelo miocárdio (IRIGOYEN; KRIEGER; CONSOLIM-COLOMBO, 2005).

Os quimiorreceptores são conjuntos de células altamente especializadas, localizadas em corpúsculos aórticos e carotídeos, responsáveis por detectar alterações da pressão parcial de oxigênio (pO_2) e de dióxido de carbono (pCO_2), além do nível de pH sanguíneo (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015). Uma vez ativadas, essas células desencadeiam respostas fisiológicas com intuito de corrigir as alterações detectadas. Por exemplo, os quimiorreceptores exercem papel de grande importância no controle da ventilação: sua estimulação promove o aumento da FC e da amplitude respiratória, aumentando a ventilação, restaurando os níveis de gases sanguíneos e normalizando o pH (CAMPGONOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001). Além disso, os quimiorreceptores também são capazes de estimular respostas cardiovasculares com objetivo de garantir a composição química ideal do sangue. Essa modulação é exercida através da estimulação do sistema nervoso simpático, contribuindo dessa forma para a manutenção dos níveis basais da PA e de parte da resistência periférica total (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

Por fim, vale ressaltar que as modulações do sistema cardiovascular mediadas pelos mecanismos de regulação supracitados são passíveis de intervenção farmacológica. Nesse sentido: (i) a transmissão em gânglios autonômicos pode ser bloqueada por drogas como o hexametônio (um antagonista de receptores nicotínicos); (ii) a ação do neurotransmissor acetilcolina (ou de possíveis agonistas muscarínicos presentes no extrato) pode ser bloqueada pela metilatropina (um antagonista de receptores muscarínicos); (iii) a produção de PGI₂ pode ser inibida por drogas como a indometacina (um inibidor de ciclooxigenases); (iv) a produção de NO pode ser inibida por análogos da L-arginina, os quais agem como inibidores competitivos da eNOS, como o L-NAME (N-ó-nitro-l-arginina-metilester); (v) o influxo de Ca²⁺ pode ser bloqueado pela nifedipina (bloqueador de canais de Ca²⁺ voltagem-dependente do tipo L); e a hiperpolarização induzida pela saída de K⁺ das células por canais sensíveis ao ATP pode ser bloqueada pela glibenclamida (bloqueador desses canais) (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989; LAHLOU et al., 2003; AKATA, 2007; FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2010; NWOKOCHA et al., 2012)

2. JUSTIFICATIVA

A HAS é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo atualmente o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CHOW, 2013; FARACO; IADECOLA, 2013). De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010), estima-se que a prevalência da HAS na população urbana adulta brasileira varie de 22,3% a 43,9%, podendo atingir até 75% quando se considera indivíduos com mais de 70 anos de idade. O tratamento da HAS requer frequentemente a terapêutica medicamentosa (SIMÃO et al., 2016). Porém, estudos mostram baixos níveis de adesão à terapia anti-hipertensiva devido a fatores como dificuldades financeiras, grande número de medicamentos prescritos e reações adversas a esses medicamentos (GIROTTO et al., 2013). Por esses motivos as plantas medicinais tem despertado a atenção da população para o tratamento de doenças como a HAS. O Brasil é um país com imensa diversidade de espécies de plantas, e grande parte da população as utiliza para fins terapêuticos (SIMÕES et al., 2007). Sendo assim, estudos que verifiquem e comprovem as propriedades hipotensivas de espécies vegetais são de grande relevância, pois auxiliam na descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, bem como podem indicar espécies potenciais para a produção de fitoterápicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar fitoquimicamente e avaliar os efeitos do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre a PA, FC e iQT de ratos Wistar normotensos anestesiados e determinar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos observados.

3.2 Objetivos específicos

- Construção da curva dose-efeito (1-80 mg/kg) para caracterização das respostas evocadas pela administração i.v. do extrato, sobre a pressão arterial média (PAM) e FC;
- Investigar, através da administração de metilatropina, a participação de receptores muscarínicos na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Investigar, através da administração de hexametônio, a participação de alterações nos efluxos autonômicos na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Investigar, através da administração de indometacina, a participação de prostaglandinas na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Investigar, através da administração de L-NAME, a participação do NO na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Investigar, através da administração de nifedipina, a participação de canais de Ca^{2+} na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Investigar, através da administração de glibenclamida, a participação de canais de K^+ dependentes de ATP na instalação dos efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.
- Identificar os constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As amostras das folhas de *A. crassiflora* foram coletadas em dezembro de 2016, em um campo de vegetação espontânea na fazenda Santa Rita situada no Município de Lassance, Minas Gerais (localização: 17.989434, 44.738243). O material vegetal foi identificado pela Dra. Adriana Arantes e uma exsiccata da espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU 73.547).

4.2 Obtenção do extrato aquoso

As folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água destilada. Posteriormente, as folhas foram colocadas em estufa a 40° C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e pesadas. As folhas trituradas foram colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 10% (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente durante 48 h. O extrato foi então filtrado inicialmente em funil contendo algodão e em seguida em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi acondicionado a -20° C. Após o congelamento, o extrato foi submetido à liofilização à -34° C até a remoção total do conteúdo de água do mesmo. O material produzido foi pesado e mantido em freezer a -20° C até a sua utilização.

4.3 Identificação dos constituintes do extrato da *A. crassiflora* por CLAE-DAD-EM/EM

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UFLC da Shimadzu, provido por duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20A e forno CTO-20A) acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a um espectrômetro de massas de alta resolução MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (IES) e analisador QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência). A coluna cromatográfica empregada foi uma Kinetex (Phenomenex, 150 x 2,1 mm), utilizando como fase móvel acetonitrila (B) e água (A) ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição aplicado foi: de 0-2 min a 3% de B, de 2-25 min a 3-25% de B, de 25-40 min a 25-80% B e de 40-43 min a 80% de B. As amostras foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL, filtradas em filtros Millex (PTFE, 0,22 µm) e 1 µL desta solução foi injetada no cromatógrafo.

A identificação estrutural dos constituintes dos extratos foi realizada a partir dos dados de fragmentação (EM/EM), da massa acurada (EM) para a determinação da possível fórmula molecular e também dos dados dos espectros de ultravioleta. O processo de identificação supracitado foi realizado em colaboração com a Dra. Denise Brentan da Silva, professora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.4 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 250-350 g, os quais foram cedidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU). Os animais foram mantidos em condições de livre acesso à ração e água e foram mantidos no depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Uberlândia (ARFIS/UFU) em gabinetes com controle de temperatura (25° C) e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 h. Os procedimentos do presente projeto foram avaliados, revisados e aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) antes da sua realização (protocolos CEUA/UFU: 105/16; Anexo). A distribuição de animais nos diferentes grupos experimentais encontra-se resumida na tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos diferentes grupos experimentais utilizados no presente trabalho.

Curva dose-efeito	Grupo Metilatropina	Grupo Hexametônio	Grupo Indometacina	Grupo L-NAME	Grupo Nifedipina	Grupo Glibenclamida
Eleição de dose efetiva.	Participação de receptores muscarínicos.	Participação de alterações nos efluxos autonômicos periféricos.	Participação de prostaglandinas.	Participação da síntese e/ou liberação de NO.	Participação de canais de Ca ²⁺ voltagem dependente do tipo L	Participação de canais de K ⁺ ATP dependentes
N= 5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=4

Fonte: A autora, 2017.

4.5 Avaliação da PAM e da FC

Para analisar os efeitos da administração das substâncias, os animais foram primeiramente anestesiados com uretana (1,5 g/kg de peso corporal) (ANAKA et al, 2009) e mantidos sob oxigenação através de máscara apropriada durante todo o experimento (esse procedimento garantiu melhor estabilização dos parâmetros cardiovasculares avaliados). Suplementação anestésica foi empregada sempre que necessária (0,15 g/animal a cada 20 minutos até a obtenção do estado anestésico). Em seguida, através de procedimento cirúrgico, foram inseridas cânulas de polietileno (PE-10 fundido à PE-50) na artéria e veia femoral para aferição direta da PA dos animais ou para a administração das diferentes substâncias (extrato aquoso e/ou inibidores ou antagonistas específicos), respectivamente. A cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão mecanoelétrico, o sinal detectado foi amplificado e convertido de analógico para digital e visualizado em um computador através do software *LabChart 8*. A PAM (em mmHg) e a FC (em batimentos por minuto; BPM) foram então determinadas. Além desses dois parâmetros também avaliamos o tempo decorrido para que 50% da PAM fosse recuperada após a administração do extrato (esse parâmetro possibilita avaliar a fase de manutenção da resposta hipotensora). Após o término do protocolo experimental os animais, ainda sob o efeito do anestésico uretana, foram mortos por aprofundamento anestésico (tiopental 160 mg/kg, i.v.).

4.6 Eletrocardiograma (ECG)

Após as cirurgias para canulação, eletrodos conectados ao eletrocardiógrafo interfaciado com o computador foram posicionados (implantação subcutânea) nos animais para registro da 2ª derivação bipolar (DII: eletrodo negativo na pata dianteira direita e eletrodo positivo na pata traseira esquerda com aterramento produzido pela inserção de eletrodo na pata traseira direita). A sensibilidade de aquisição dos dados foi de 1 kHz. O iQT (em ms) dos animais foi então avaliado da seguinte forma: 10 complexos foram escolhidos aleatoriamente sempre um minuto antes da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* e no minuto no qual houve o pico máximo da queda da PAM após a administração do extrato. A mesma avaliação foi realizada no grupo de animais que recebeu glibenclamida, tanto para a administração controle do extrato (antes da injeção do bloqueador), quanto para a administração do extrato após injeção de glibenclamida. O valor médio das 10 medidas obtidas foi determinado e utilizado como representativo do iQT dos

animais. No presente estudo, o iQT não foi corrigido pela frequência cardíaca, já que a literatura relata que o iQT de ratos não é afetado por esse parâmetro, contrariamente ao descrito para outras espécies (HAYES et al., 1994; OHTANI et al., 1997). Na vigência de arritmias, os iQTs foram avaliados no minuto anterior ao aparecimento do primeiro episódio.

4.7 Construção da curva dose-efeito

O extrato liofilizado foi solubilizado em solução de NaCl 0,9% e, em seguida, diferentes doses do mesmo foram preparadas por meio de diluições seriadas a partir da maior dose. As doses utilizadas na confecção da curva dose-efeito foram: 1, 6, 10, 15, 20, 30, 60 e 80 mg/kg. Após um período para estabilização dos animais (10-20 minutos) administrávamos inicialmente, através de injeção em bolo, 1 mL/Kg de solução de NaCl 0,9%. Em seguida, administrávamos, também através de injeção em bolo, doses crescentes de extrato (preparadas de forma que os animais recebiam sempre 1 mL de solução/Kg de animal). Entre cada dose do extrato foi dado um intervalo de até 30 minutos para avaliação do retorno dos parâmetros aos níveis basais, ou estabelecimento de uma resposta estável (conduta utilizada em todos os demais experimentos). Os parâmetros de interesse foram então calculados subtraindo-se o efeito do extrato daquele obtido com a administração de solução salina, ou veículo (procedimento empregado em todos os experimentos e também válido para todas as substâncias administradas).

4.8 Avaliação da participação de receptores muscarínicos na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato

Os efeitos da administração do extrato (45 mg/Kg i.v.) foram avaliados antes e 30 minutos após o tratamento com metilatropina (3 mg/Kg, i.v.) (SONCINI et al. 2011). A acetilcolina foi administrada no início do experimento e após 25 minutos da administração do antagonista para verificação da efetividade do bloqueio muscarínico (10 µg/Kg, i.v.).

4.9 Avaliação das alterações nos efluxos autonômicos periféricos na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato

Os efeitos da administração do extrato (45 mg/Kg i.v.) foram avaliados antes e 10 minutos após o tratamento com hexametônio (20 mg/Kg, i.v.) (SONCINI et al., 2011). A

integridade da resposta reflexa cardíaca frente a alterações de PAM foi testada no início do protocolo e ao final dos experimentos através da administração de droga vasoconstritora (fenilefrina) e vasodilatadora (nitroprussiato de sódio; NPS) (ambas na dose de 4 µg/Kg, i.v.) (SYBERTZ; SABIN; MORAN, 1981; O'SHAUGHNESSY; NEWMAN; WARREN, 1992).

4.10 Avaliação da participação de prostaglandinas e do NO na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato

Os efeitos da administração do extrato (45 mg/Kg i.v.) foram avaliados antes e 30 minutos após o tratamento com indometacina (5 mg/Kg, i.v.) ou L-NAME (10 mg/Kg, i.v.) (WONG et al., 1990; SONCINI et al., 2011).

4.11 Avaliação da participação de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes do tipo L na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.

Os efeitos da administração do extrato (45 mg/Kg i.v.) foram avaliados antes e 30 minutos após o tratamento com nifedipina (3 mg/Kg, i.v.).

4.12 Avaliação da participação de canais de K⁺ ATP-dependentes na instalação dos efeitos induzidos pelo extrato.

Os efeitos da administração do extrato (45 mg/Kg i.v.) foram avaliados antes e 30 minutos após o tratamento com glibenclamida (20 mg/Kg, i.v.) (HORIKAWA et al. 1998).

4.13 Veículos empregados no presente estudo.

Quando necessário, foram utilizadas diferentes soluções para solubilização de algumas das drogas supracitadas: (i) para solubilizar a nifedipina, foi utilizada uma solução de propilenoglicol associado à solução salina (3:1); (ii) para solubilizar a glibenclamida, foi utilizada uma solução de DMSO 100%; (iii) para solubilizar a indometacina, utilizou-se uma solução de carbonato de sódio 0,5% (Na₂CO₃). Cabe ressaltar que todos os veículos supracitados foram administrados previamente aos protocolos experimentais, como forma de controle. Todas as outras drogas foram diluídas em solução salina (0,9%), a qual também foi administrada previamente como controle.

4.14 Análise estatística

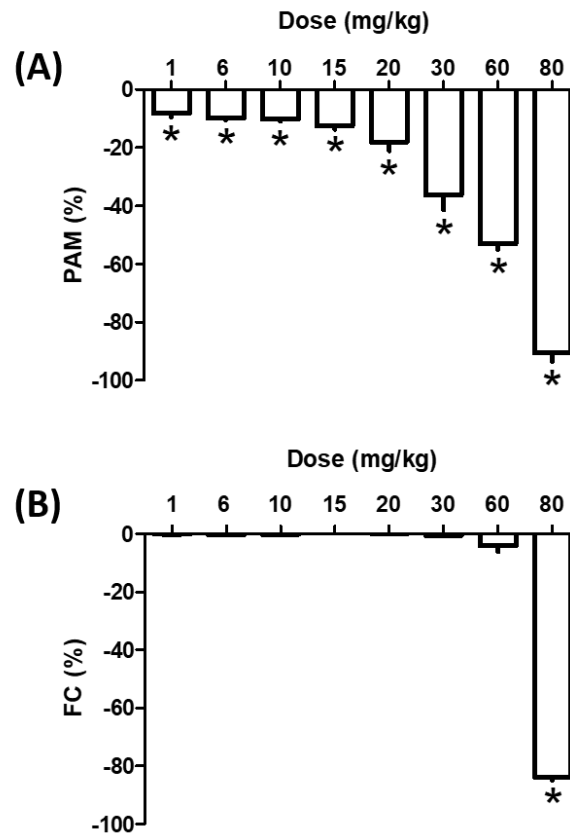
Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM) das alterações de PAM e FC em % (algumas vezes os valores de FC foram expressos em BPM), ou iQT. Os dados foram avaliados através do teste “t” de Student pareado utilizando-se o programa GraphPad Prism® (versão 5.0). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de *P* eram menores que 0,05 ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Curva dose-efeito

A administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* induziu, de forma dose-dependente, queda na PAM dos animais (Fig. 12A e Fig. 13). Contudo, a FC não foi significativamente alterada pelo extrato ($P > 0,05$ vs. zero, valor hipotético que representa ausência de alteração), exceto após a administração da maior dose empregada (80 mg/kg), a qual causou intensa taquiarritmia ventricular (detectada no ECG) associada a aumento do iQT (Fig. 14; Fig. 15 B e C), queda proeminente da pressão arterial e da FC (derivada da pressão de pulso, i.e., dos ciclos sístole-diástole) (Fig. 12 A e B; Fig. 13). As alterações produzidas pela dose de 80 mg/kg causou a morte de todos os animais utilizados nesse experimento (Fig. 12 A e B; Fig. 13). Por fim, cabe salientar que as alterações no iQT também foram dose-dependentes e que extrato promoveu um discreto aumento da pressão arterial imediatamente antes da instalação do efeito hipotensor, cuja magnitude não se mostrou dose-dependente (Fig. 14).

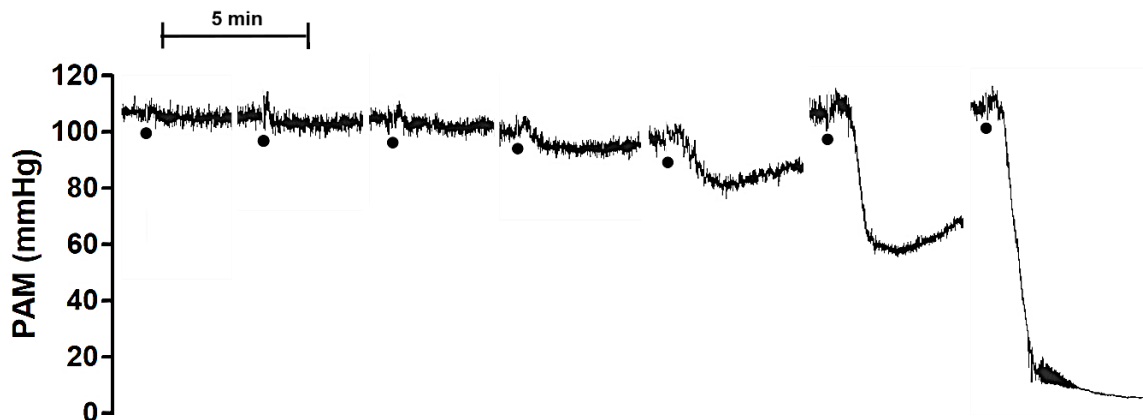
Figura 12. Curva dose-efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca.



Fonte: A autora, 2017.

Efeitos da administração intravenosa do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A) e frequência cardíaca (FC, Δ em %) (B) de ratos Wistar anestesiados. Os dados representam a média \pm EPM de 5 experimentos. * $P < 0,05$ (teste "t" de Student usando como média para comparação o valor hipotético de zero, i.e., nenhuma alteração).

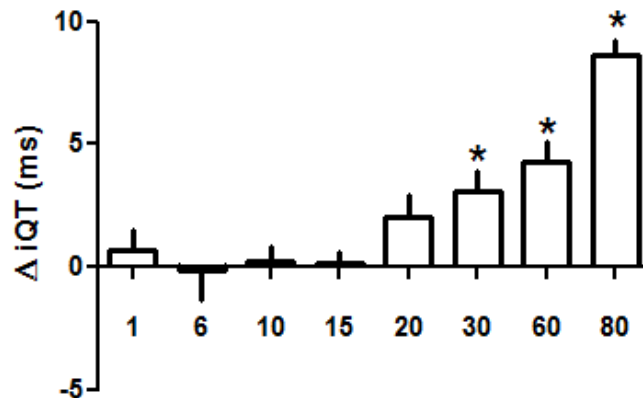
Figura 13. Alterações pressóricas induzidas pela administração de doses crescentes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.



Fonte: A autora, 2017.

Registro representativo do efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre a pressão arterial média (PAM, em mmHg) de ratos anestesiados. Os pontos indicam o momento da administração intravenosa do extrato (doses: 1, 6, 10, 15, 20, 30, 60 e 80 mg/kg, respectivamente).

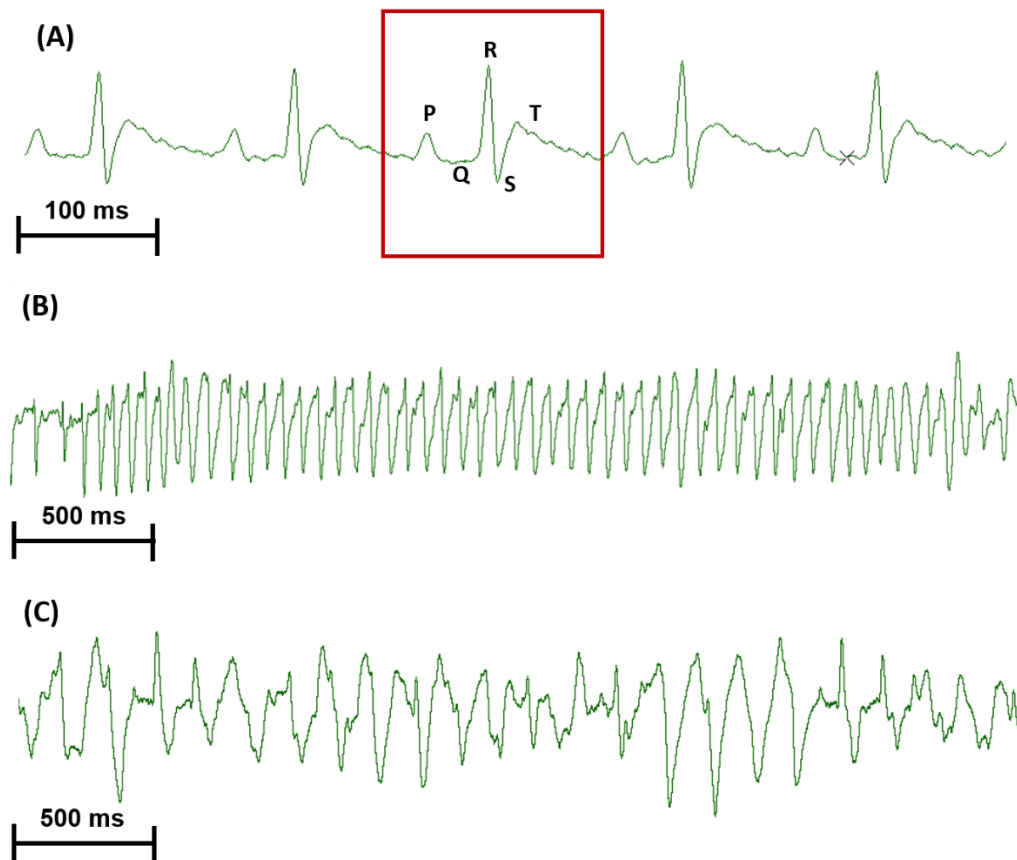
Figura 14. Efeito da administração de doses seriadas do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* no iQT de ratos Wistar anestesiados.



Fonte: A autora, 2017.

Efeitos da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre o intervalo QT (iQT) de ratos Wistar anestesiados. Os dados representam a média±EPM de 5 experimentos conduzidos em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student usando como média para comparação o valor hipotético de zero, i.e., nenhuma alteração).

Figura 15. Efeitos da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (80 mg/kg, i.v.) sobre o eletrocardiograma de ratos Wistar anestesiados.



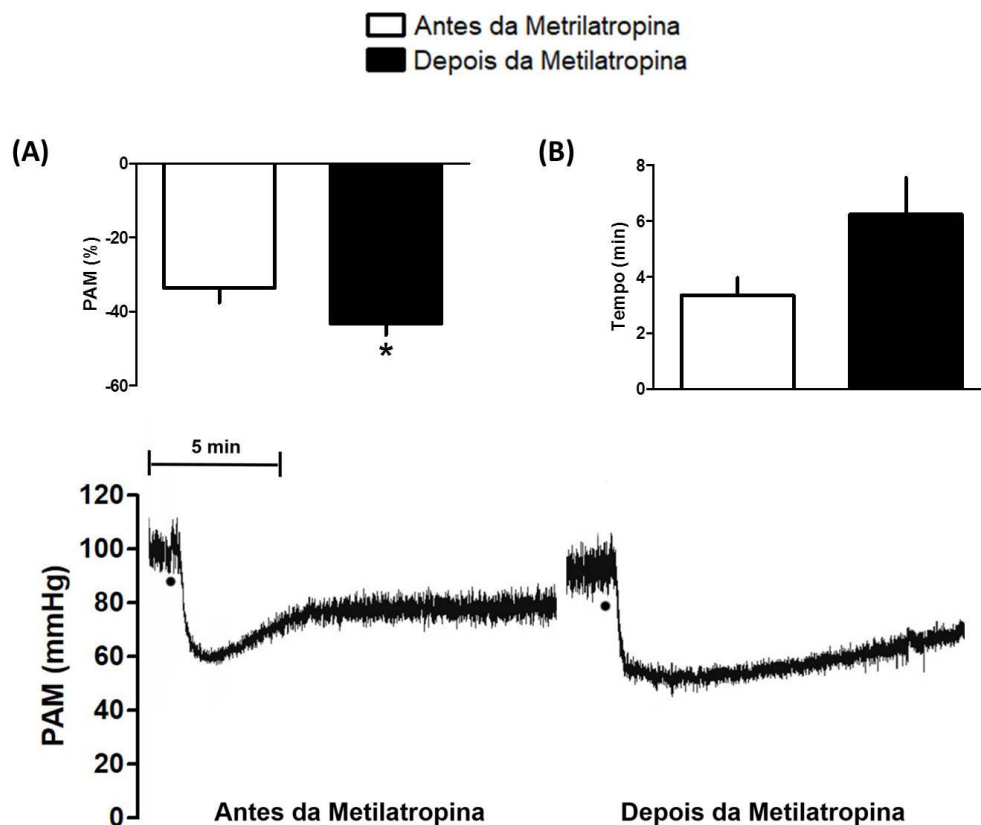
Fonte: A autora, 2017.

Registro eletrocardiográfico representativo de ratos Wistar anestesiados antes da administração de extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*; em destaque, estão evidenciados o complexo QRS e as ondas P e T (A). Taquiarritmia ventricular intensa (B) e episódios de *torsades de pointes* (C) precipitados pela administração intravenosa de 80 mg/kg de extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.

5.2 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois da administração de metilatropina.

A administração de metilatropina causou queda transitória da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($99,62 \pm 5,55$ mmHg) compatíveis com aqueles do período de pré-tratamento ($97,26 \pm 5,32$ mmHg; $P > 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). A metilatropina causou potencialização do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, evidenciada pelo aumento na queda da PAM (Fig. 16A); entretanto, não houve alteração estatisticamente significativa no tempo para recuperação da resposta hipotensora do extrato (Fig. 16B). O efeito vasodilatador da acetilcolina foi efetivamente inibido pela administração de metilatropina (Fig. 17).

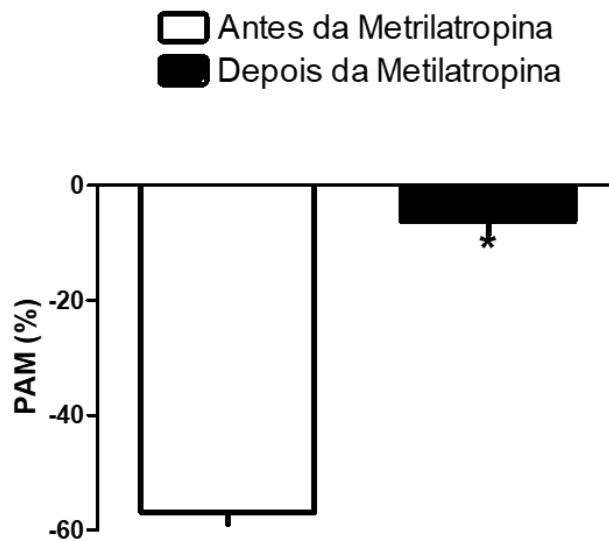
Figura 16. Efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois da administração de metilatropina.



Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de metilatropina (3 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). A figura B apresenta o tempo (em minutos) para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato, antes e depois do tratamento com metilatropina. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado). A figura C mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com metilatropina. Os pontos indicam o momento da administração do extrato.

Figura 17. Efeito da acetilcolina, antes e depois da administração de metilatropina, sobre a pressão arterial média.



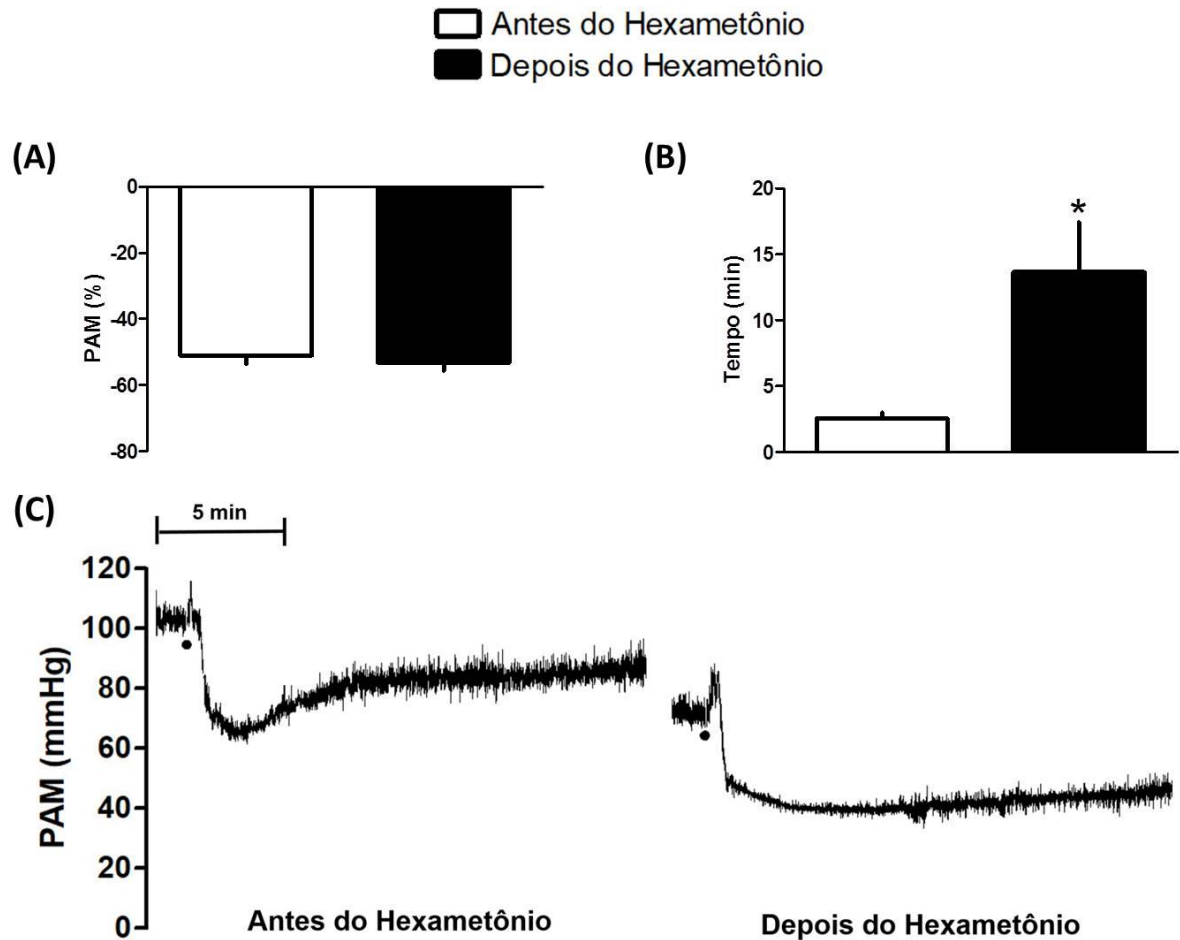
Fonte: A autora, 2017.

Inibição do efeito hipotensor da acetilcolina pela administração de metilatropina (3 mg/kg, i.v.). Os resultados representam a média±EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado).

5.3 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com hexametônio.

A administração de hexametônio causou queda da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($64,92 \pm 4,59$ mmHg) inferiores àqueles do período de pré-tratamento ($94,54 \pm 3,78$ mmHg; $P < 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). A administração de hexametônio não alterou o efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (Fig. 18A). Entretanto, a administração dessa droga modificou o tempo para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato (Fig. 18B). O hexametônio diminuiu significativamente a bradicardia e a taquicardia induzidas pela administração de fenilefrina e NPS, respectivamente (Fig. 19 A e B). Ainda, o efeito hipertensor da fenilefrina foi potencializado pelo hexametônio (Fig. 20).

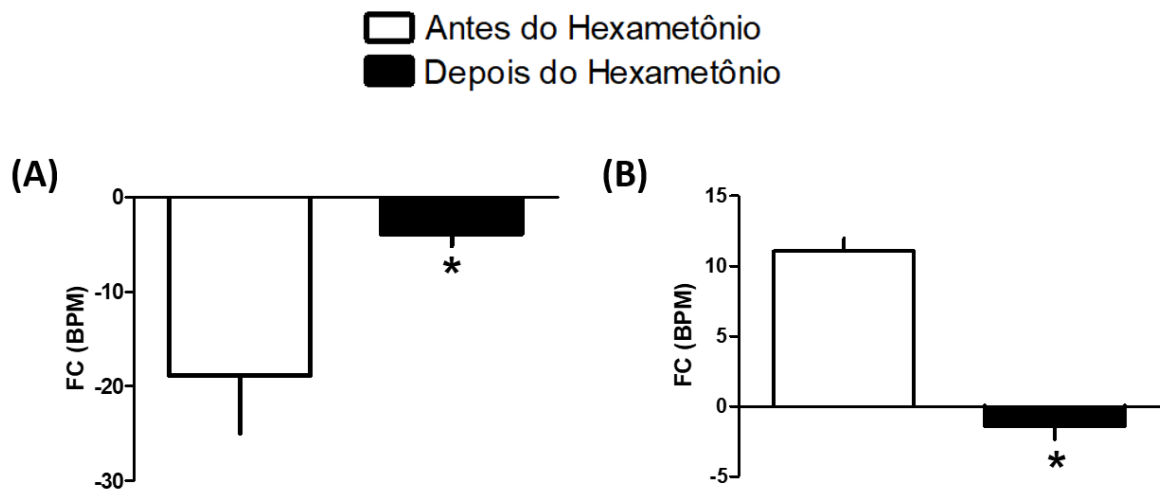
Figura 18. Efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com hexametônio.



Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de hexametônio (20 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). A figura B apresenta o tempo (em minutos) para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato, antes e depois do tratamento com hexametônio. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste "t" de Student pareado). A figura C mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com hexametônio. Os pontos indicam o momento da administração do extrato

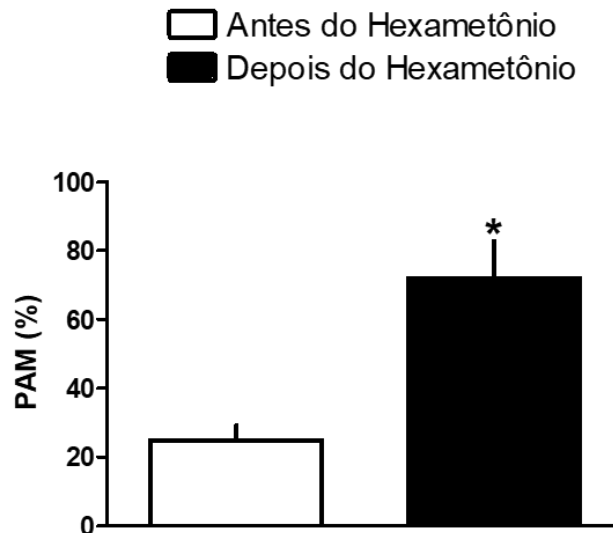
Figura 19. Efeito da fenilefrina e do nitroprussiato de sódio sobre a frequência cardíaca, antes e depois da administração de hexametônio.



Fonte: A autora, 2017.

Alterações da frequência cardíaca (FC; batimentos por minutos: BPM) induzidas pela administração de fenilefrina (4µg/kg, i.v.) (A) e nitroprussiato de sódio (4µg/kg, i.v.) (B), antes e depois do tratamento com hexametônio (20 mg/kg, i.v.). Os resultados representam a média±EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. *P<0,05 (teste “t” de Student pareado).

Figura 20. Efeito da fenilefrina, antes e depois do tratamento com hexametônio, sobre a pressão arterial média.



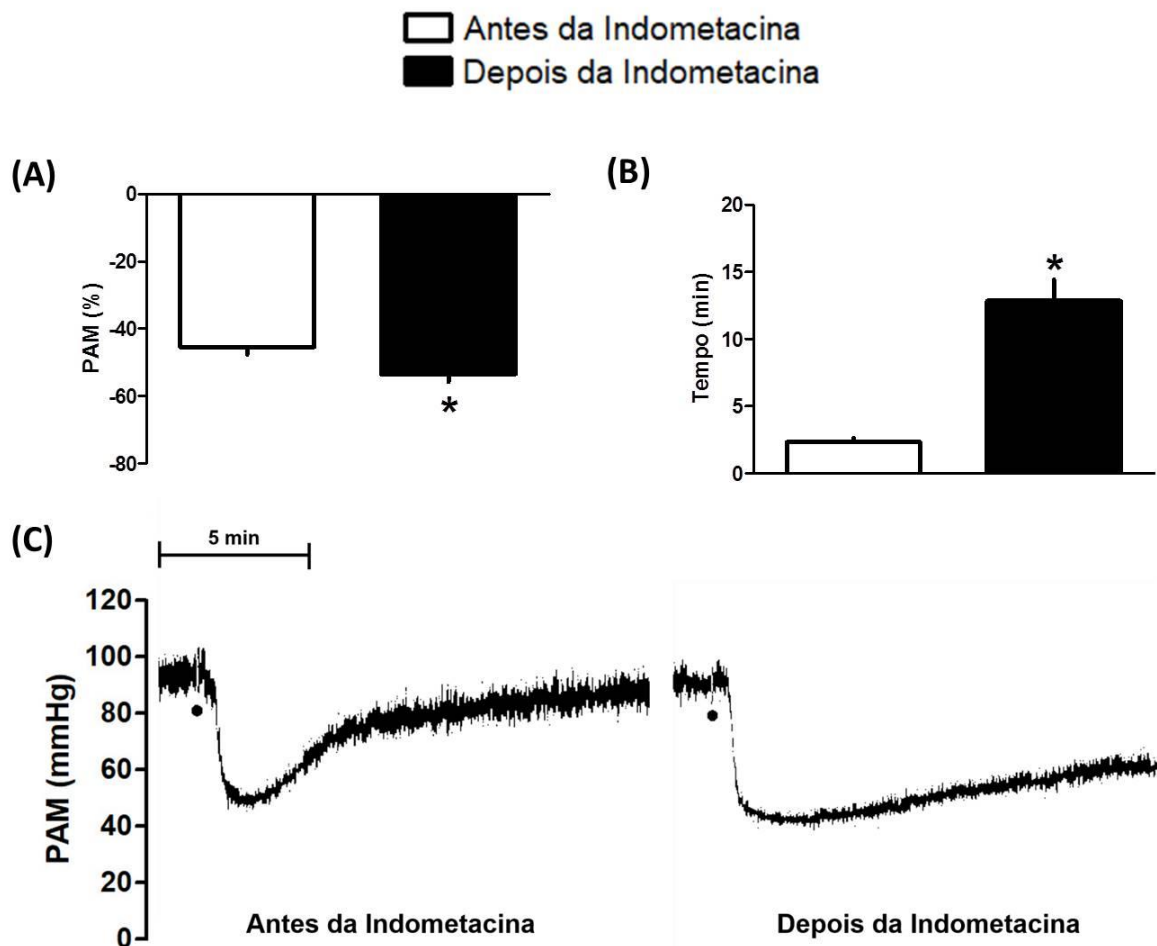
Fonte: A autora, 2017.

Efeito da administração de fenilefrina (4µg/kg, i.v.) sobre a pressão arterial média dos animais (PAM; Δ em %), antes e depois do tratamento com hexametônio (20 mg/kg, i.v.). Os resultados representam a média±EPM de 5 experimentos. *P<0,05 (teste “t” de Student pareado).

5.4 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com indometacina.

A administração de indometacina causou aumento transitória da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($98,50 \pm 2,51$ mmHg) compatíveis com aqueles do período de pré-tratamento ($99,02 \pm 3,21$ mmHg; $P > 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). A indometacina causou potencialização do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, evidenciada pelo aumento na queda da PAM e pelo aumento no tempo para recuperação da resposta hipotensora (Fig. 21 A e B).

Figura 21. Efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com de indometacina.



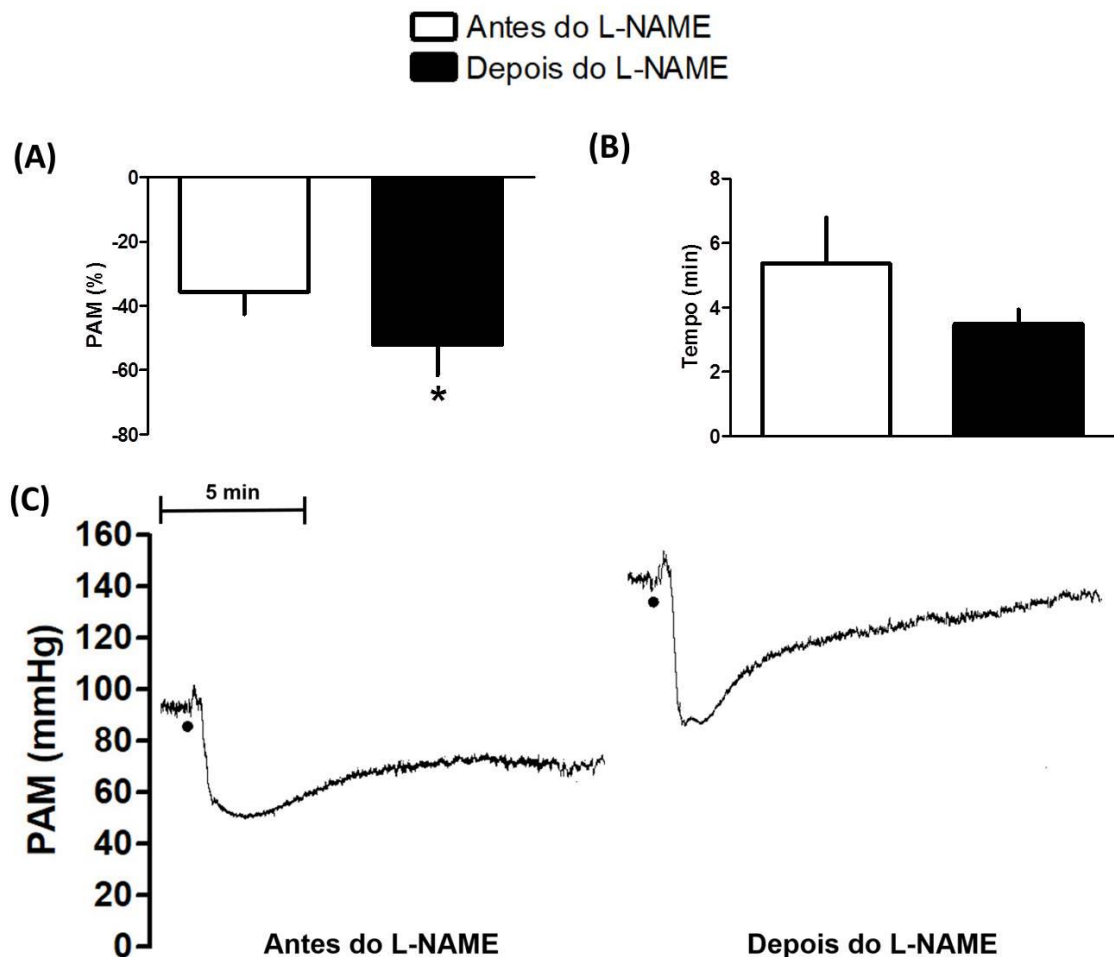
Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de indometacina (5 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). A figura B apresenta o tempo (em minutos) para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato, antes e depois do tratamento com indometacina. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado). A figura C mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com indometacina. Os pontos indicam o momento da administração do extrato.

5.5 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com L-NAME.

A administração de L-NAME causou aumento da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($152,30 \pm 2,86$ mmHg) maiores do que aqueles do período de pré-tratamento ($94,06 \pm 4,17$ mmHg; $P < 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). O L-NAME causou potencialização do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, evidenciada pelo aumento na queda da PAM (Fig. 22A); entretanto, não houve alteração no tempo para recuperação da resposta hipotensora do extrato (Fig. 22B).

Figura 22. Efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois da administração de indometacina.



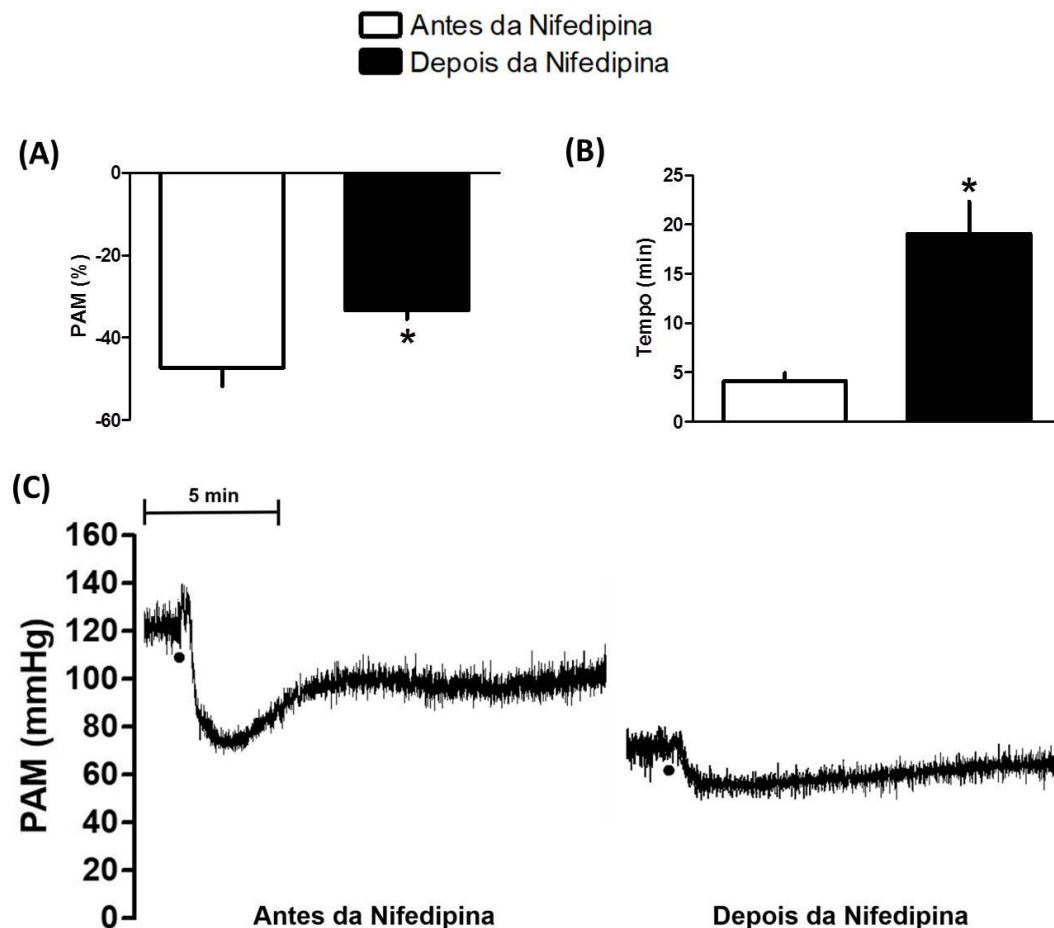
Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de L-NAME (10 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). A figura B apresenta o tempo (em minutos) para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato, antes e depois do tratamento com L-NAME. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado). A figura C mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com L-NAME. Os pontos indicam o momento da administração do extrato.

5.6 Avaliação do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com nifedipina.

A administração de nifedipina causou diminuição da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($70,41 \pm 4,00$ mmHg) menores do que aqueles do período de pré-tratamento ($103,90 \pm 6,27$ mmHg; $P < 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). A nifedipina causou inibição do efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, evidenciada pela diminuição na queda da PAM (Fig. 23A); contudo, houve aumento significativo no tempo para recuperação da resposta hipotensora do extrato (Fig. 23B).

Figura 23. Efeitos cardiovasculares do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois da administração de nifedipina.



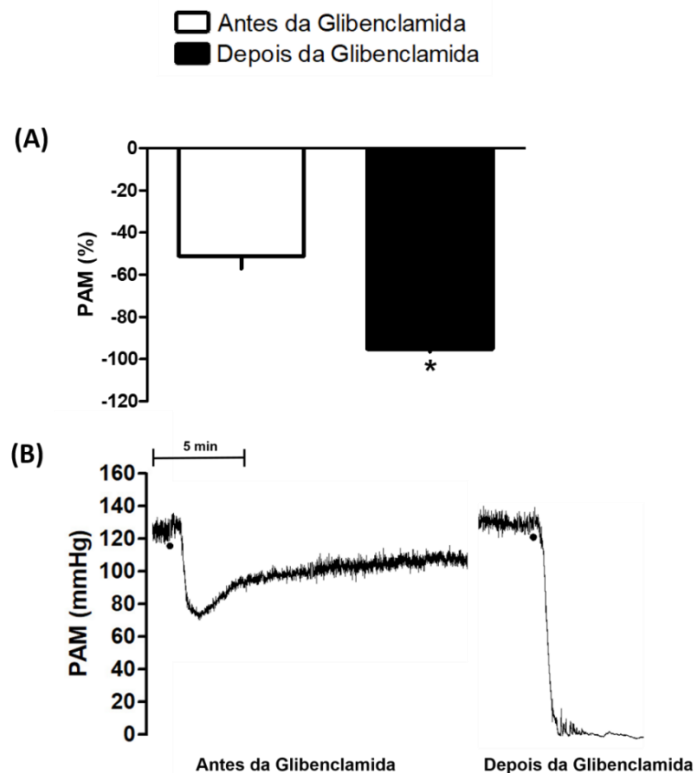
Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de nifedipina (3 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). A figura B apresenta o tempo (em minutos) para recuperação de 50% da resposta hipotensora do extrato, antes e depois do tratamento com nifedipina. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. * $P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado). A figura C mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com nifedipina. Os pontos indicam o momento da administração do extrato.

5.7 Avaliação do efeito hipotensor do extrato antes e depois do tratamento com glibenclamida.

A administração de glibenclamida causou diminuição transitória da PAM, cujos valores estabilizaram em patamares ($120,60 \pm 12,50$ mmHg) semelhantes àqueles do período de pré-tratamento ($105,30 \pm 7,70$ mmHg; $P > 0,05$, teste “t” de Student pareado, $n=5$). A glibenclamida aumentou significativamente o efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (Fig. 24 A e B), bem como precipitou taquiarritmias ventriculares e episódios de TdP, à semelhança do observado com a administração de 80 mg/kg do extrato na ausência de qualquer inibidor/bloqueador (Fig. 25B e C). Ainda, o iQT dos animais após a administração do extrato foi significativamente aumentado pelo tratamento com glibenclamida (Fig. 26).

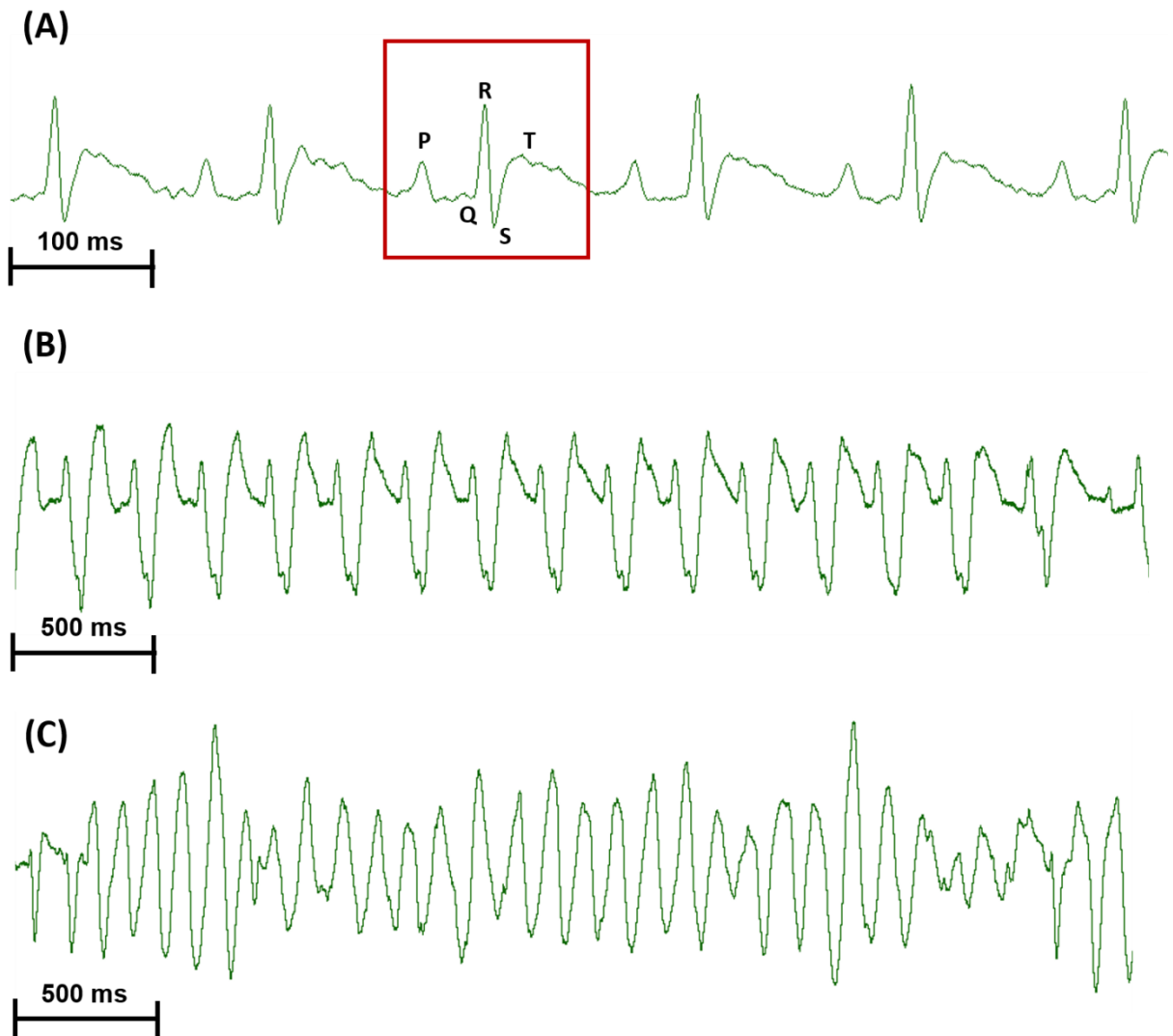
Figura 24. Efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* antes e depois do tratamento com glibenclamida.



Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de glibenclamida (20 mg/kg, i.v.), sobre a pressão arterial média (PAM, Δ em %) (A). Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos realizados em ratos Wistar anestesiados. $*P < 0,05$ (teste “t” de Student pareado). A figura B mostra um registro representativo do efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, antes e depois do tratamento com glibenclamida. Os pontos indicam o momento da administração do extrato. A administração do extrato após o tratamento com glibenclamida causou a morte de todos os animais avaliados nesse grupo, não havendo, portanto, recuperação da resposta.

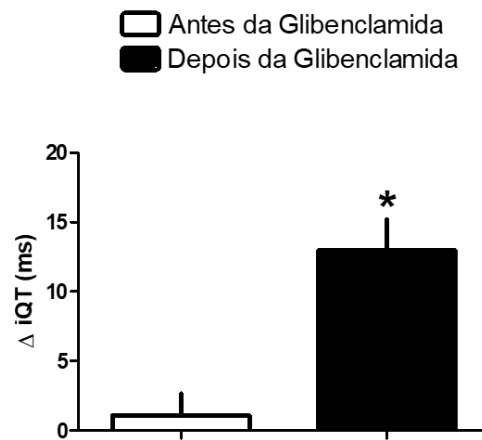
Figura 25. Efeitos da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* sobre o eletrocardiograma de ratos Wistar anestesiados, antes e após a administração de glibenclamida.



Fonte: A autora, 2017.

Registros representativos dos eletrocardiogramas (ECGs) de ratos Wistar anestesiados. Em (A) encontra-se o registro do ECG no início do experimento, o qual evidencia (em destaque) o complexo QRS e as ondas P e T (A). A administração do extrato (45 mg/kg, i.v.), após o tratamento com glibenclamida (20 mg/kg, i.v.), precipitou taquiarritmias ventriculares intensas (B), com episódios de *torsades de pointes* (C). A administração do extrato antes do tratamento dos animais com glibenclamida não alterou significativamente o comportamento do ECG dos animais (não mostrado).

Figura 26. Efeito da administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* no iQT de ratos Wistar anestesiados, antes e após a administração de glibenclamida.

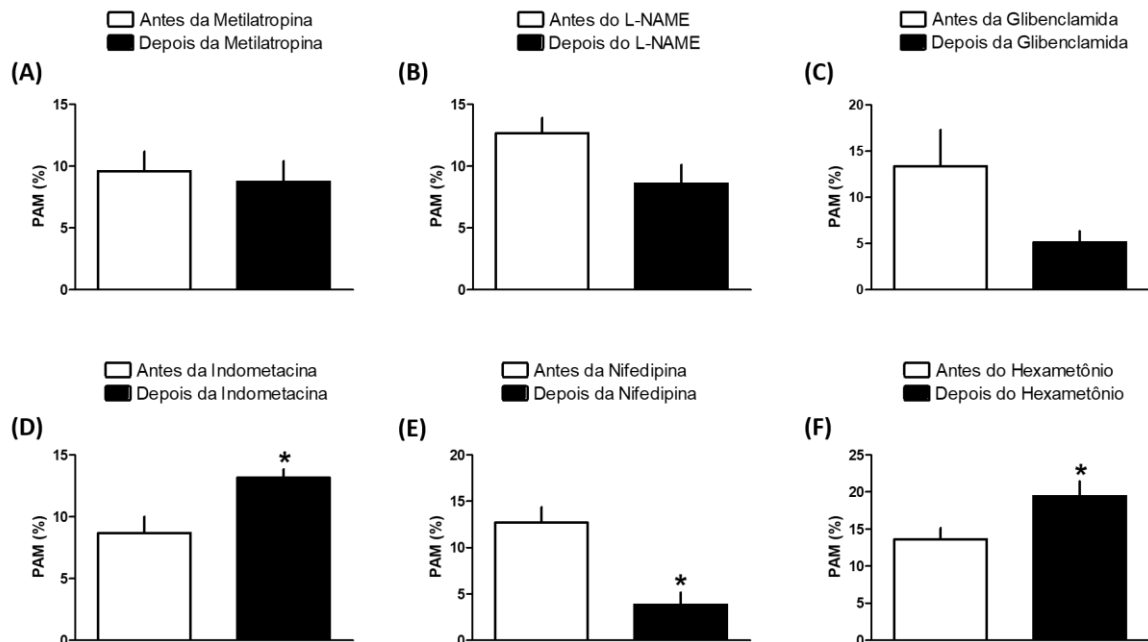


Fonte: A autora, 2017.

Efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de glibenclamida (20 mg/kg, i.v.), sobre o intervalo QT (iQT) de ratos Wistar anestesiados. Os resultados representam a média±EPM de 4 experimentos. *P<0,05 (teste “t” de Student pareado).

5.8 Efeitos dos diferentes antagonistas e inibidores sobre o componente hipertensor da resposta evocada pela administração do extrato.

Figura 27. Efeito hipertensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* na presença de diferentes inibidores e antagonistas.



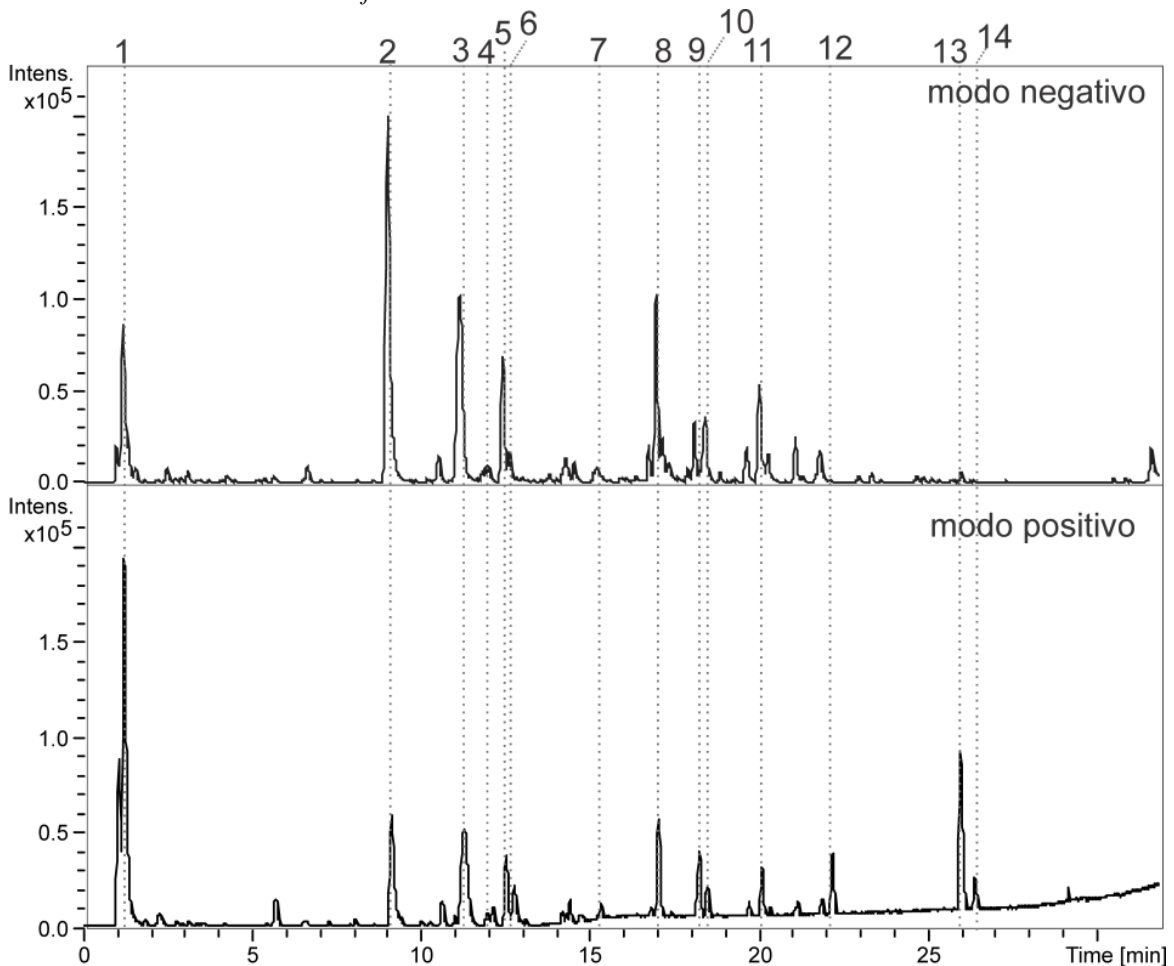
Fonte: A autora, 2017.

Aumento inicial da pressão arterial média (PAM, Δ em %) evocado pela administração do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* (45 mg/kg, i.v.), antes e depois da administração de metilatropina (3 mg/kg, i.v.: A), L-NAME (10 mg/kg, i.v.: B), glibenclamida (20 mg/kg, i.v.: C) indometacina (5 mg/kg, i.v.: D), nifedipina (3 mg/kg, i.v.: E) ou hexametônio (20 mg/kg, i.v.: F). Os resultados representam a média±EPM de 4-5 experimentos conduzidos em ratos Wistar anestesiados. *P<0,05 (teste “t” de Student pareado).

5.9 Caracterização fitoquímica do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.

A separação cromatográfica e a identificação dos diferentes constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* estão apresentadas na figura 28 e tabela 2, respectivamente. Foram identificadas metabólitos secundários pertencentes às seguintes classes: proantocianidinas, flavonoides (em especial várias formas de quercetina glicosilada), alcaloides aporfínicos (xilopina e isolaurelina) e um alcaloide de estrutura ainda não determinada (12).

Figura 28. Cromatograma de íons totais obtido em modo de ionização negativa e positiva do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.



Fonte: A autora, 2017.

Separação cromatográfica dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, com destaque para os diferentes picos identificados.

Tabela 2. Identificação dos compostos apresentados no cromatograma.

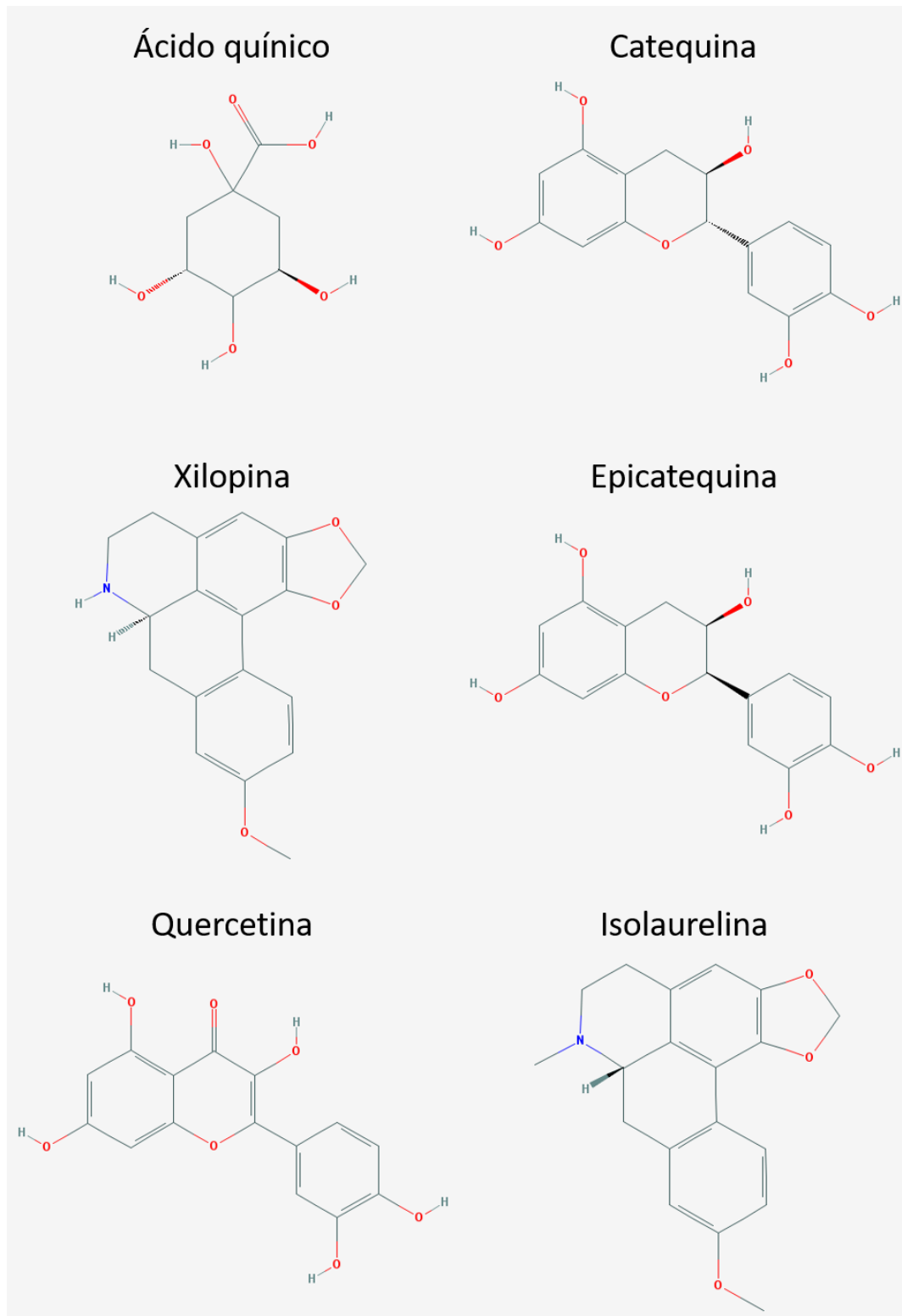
Pico	Composto	FM	UV	MS (<i>m/z</i>)	
				[M-H] ⁻	[M+H] ⁺
1	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	-	191,0564	193,0701
2	Catequina*	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	280	289,0718	291,0874
	Dímero procianidina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	280	577,1352	579,1497
3	Ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	299, 324	353,0873	355,1024
4	Dímero procianidina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	280	577,1351	579,1513
	Trímero procianidina	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	280	865,1964	867,2131
5	Epicatequina*	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	280	289,0724	291,0874
6	Trímero procianidina	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	280	865,1957	867,2131
7	<i>O</i> -galoil dímero procianidina	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	278	729,1438	731,1631
8	<i>O</i> -pentosil hexosil quercetina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	265, 353	595,1305	597,1456
9	<i>O</i> -hexosil-deoxihexosil quercetina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	265, 355	609,1479	611,1609
10	<i>O</i> -hexosil quercetina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	265, 355	463,0888	465,1028
11	<i>O</i> -pentosil quercetina	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	265, 355	433,0785	435,0932
12	Alcaloide	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	280	-	328,1913
13	Xilopina	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	280	-	296,1291
14	Isolaurelina	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	280	-	310,1441

*confirmado por injeção de padrão autêntico.

Fonte: A autora, 2017.

Identificação dos constituintes do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*. O processo foi realizado por HPLC-DAD-MS/MS usando um equipamento ESI-QTOF.

Figura 39. Estrutura química dos compostos identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*.



Fonte: PubChem (modificado).

A figura apresenta a estrutura de alguns flavonoides e alcaloides identificados no extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*. Apesar de no extrato terem sido identificados apenas espécies de quercetina glicosilada, a figura apresenta apenas a estrutura da quercetina, uma vez que as análises conduzidas não possibilitaram a determinação do oxigênio envolvido na ligação com os açúcares. Ainda, como as análises não indicam o tipo de proantocianidinas (A ou B), a estrutura das mesmas não foi representada.

6. DISCUSSÃO

O efeito hipotensor dose-dependente do extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora* pode decorrer de alterações na resistência vascular periférica e/ou no débito cardíaco, parâmetros que determinam a PA (GUYENET, 2006). Observamos que efeito hipotensor não é acompanhado por aumentos reflexos na FC; pelo contrário, a FC ou não foi alterada ou diminuiu muito discretamente após a administração do extrato, exceto após a administração da maior dose avaliada (80 mg/kg), a qual causou intensa queda da PAM. Nesse último caso, o extrato causou não apenas vasodilatação, mas também acentuada taquiarritmia ventricular, a qual possivelmente produziu diminuição do débito cardíaco (assistolia). Cabe salientar que, apesar de grandemente deprimida pela anestesia, a atividade barorreflexa pôde ser detectada nos animais utilizados no presente estudo, como sugere os efeitos observados após a administração de fenilefrina e NPS. Assim, é possível sugerir que, exceto para a maior dose avaliada, o efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora* se explica majoritariamente por ações vasodilatadoras e não cardiodepressoras.

O efeito imediato e de duração relativamente evocada pelo extrato na pressão sanguínea dos animais se assemelha ao efeito hipotensivo relatado para muitos dos metabólitos secundários identificados, como catequina, epicatequina e proantociandinas, mais especificamente, procianidinas de tipo B (LIMA-LANDMAN et al., 2007). Embora a administração intravenosa de quercetina tenha demonstrado diminuir a pressão arterial em ratos (DA ROCHA LAPA et al., 2011), a presença de diferentes formas de quercetina glicosilada no presente extrato dificulta determinar a sua contribuição para o efeito hipotensivo observado. De fato, enquanto alguns flavonóides glicosilados têm efeito hipotensivo quando administrados por via intravenosa, outros não (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2011; LIMA-LANDMAN et al., 2007).

O aparecimento de episódios de TdP evidencia um efeito cardiotoxico associado à administração do extrato. Zitron e colaboradores (2005) avaliaram a possível interação de diferentes flavonoides contidos no suco de uva com canais HERG. Foi observado que mais da metade dos flavonoides possuía atividade inibitória sobre os referidos canais, dentre eles a quercetina; contudo, a rutina, uma quercetina glicosilada, não foi capaz de inibir as correntes mediadas pelo HERG. Assim, como o presente extrato possui apenas variedades de quercetina glicosilada, é pouco provável que essa classe de metabólitos secundários seja capaz de interferir com a atividade do HERG no coração de ratos e, portanto, de induzir cardiotoxicidade (KONOPELSKI; UFNAL, 2016). Por outro lado, a literatura relata que as

proantocianidinas são responsáveis pelo bloqueio de canais HERG *in vitro* e explicam a ação potente de alguns extratos com relação a esse particular (SCHRAMM et al., 2014). Ainda, apesar da variada relação estrutura atividade observada, alcaloides diversos são capazes de inibir as correntes mediadas por HERG (KRATZ et al., 2017), incluindo aqueles pertencentes à classe das protoberberinas e aporfinas, as quais apresentam semelhança estrutural com os alcaloides já identificados no extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora* [e.g., alcaloide da classe das tetraidroprotoberberinas, identificado previamente por nosso grupo de pesquisa (FERRAZ et al., 2017), bem como xilopina e isol Laurelina, identificadas na amostra do extrato e pertencentes à classe das aporfinas). Logo, é possível que as proantocianidinas e alcaloides possam estar relacionados com a inibição de canais HERG no tecido cardíaco de ratos, diminuição do efluxo de K^+ e, conseqüente, prolongamento do iQT e desenvolvimento de taquiarritmias e/ou episódios de TdP, os quais levaram a óbito todos os animais que receberam a maior dose do extrato avaliada no presente estudo. Entretanto, a contribuição das diferentes classes de metabólitos secundários para o efeito cardiotoxico do extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora* permanece por ser elucidada.

Sabe-se que substâncias capazes de reduzir os efluxos autonômicos simpáticos podem alterar o tônus vascular, causando vasodilatação (GUYENET, 2006). A caracterização fitoquímica do extrato de *A. crassiflora* realizada no presente estudo evidenciou a presença de xilopina, um alcaloide descrito na literatura como antagonista altamente seletivo de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos (LIU; HAN; WANG, 1989). Contudo, alterações nos efluxos autonômicos periféricos parecem não contribuir para a instalação do efeito hipotensor do extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora*, uma vez que o bloqueio ganglionar, através da administração de hexametônio, não alterou a queda da PAM induzida pelo extrato. Ademais, a administração de hexametônio potencializou o efeito hipertensor inicial evocado pelo extrato e aumentou o tempo para recuperação da resposta hipotensora. Esses fatos podem ser explicados pela supersensibilidade dos vasos sanguíneos a substâncias vasoconstritoras após o bloqueio ganglionar (TERASHINI; SHIMAMOTO, 1993), bem como à ausência de vasoconstrição adrenérgica que se oporia à vasodilatação induzida pelo extrato, acelerando, assim, a recuperação da resposta hipotensora do mesmo. Ressalta-se que a intensificação do efeito vasoconstritor da fenilefrina após a administração de hexametônio corrobora a hipótese de supersensibilidade a agentes vasoconstritores aventada acima.

A estimulação de receptores muscarínicos endoteliais induz vasodilatação (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989); de fato, no presente estudo a metilatropina, um antagonista muscarínico não seletivo, foi capaz de inibir a ação vasodilatadora da acetilcolina.

Contudo, a resposta hipotensora do extrato de *A. crassiflora* parece não estar relacionada à estimulação de receptores muscarínicos, visto que a administração de metilatropina potencializou a queda da PAM evocada pelo extrato. A administração (i.v.) de metilatropina em ratos, dentro da faixa de dose utilizada em nosso estudo, comumente causa aumento da frequência cardíaca associada a um discreto aumento da pressão arterial. Contudo, apesar de ser um antagonista muscarínico clássico, a atropina pode causar queda significativa da pressão arterial após a administração de altas doses (25 mg/kg), um efeito atribuído ao bloqueio de receptores α -adrenérgicos (ABRAHAM et al., 1981); embora a metilatropina apresente praticamente a mesma potência em antagonizar os receptores muscarínicos que a atropina, a primeira é cerca de 100 vezes menos potente do que a segunda no que se refere ao antagonismo de receptores α -adrenérgicos (CANTOR et al., 1983). Assim, nossas observações de que a metilatropina causou queda transitória da PAM, bem como potencializou o efeito hipotensor do extrato não eram esperadas e sugerem que o extrato foi capaz de alterar a farmacologia desse antagonista (cabe lembrar que os animais receberam metilatropina após a administração de 45 mg/kg de extrato). Mecanismos que envolvam efeitos sobre o sistema nervoso central parecem pouco prováveis, já que a metilatropina possui pouca capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica; portanto, apenas a intensificação (produzida pelo extrato) da interação da metilatropina com os receptores α -adrenérgicos (por fenômenos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos) nos parece provável como mecanismo, o qual permanece por ser investigado.

A administração de L-NAME potencializou o efeito hipotensor do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*, sem alterar o tempo para a recuperação dessa resposta. Tais observações sugerem que a hipotensão induzida pelo extrato não envolve a síntese e/ou liberação de NO a partir da atividade da sintase do óxido nítrico. Tanto quercetina quanto proantocianidinas parecem estimular a síntese e secreção de NO pelas células endoteliais, um efeito cuja importância depende do leito vascular avaliado (ZHOU et al., 2006; DALBÓ et al., 2008); assim, nossos dados sugerem que o tipo de glicosilação da molécula de quercetina, bem como as variedades específicas de proantocianidinas presentes no extrato de *A. crassiflora*, possuam um comportamento farmacológico diferente. Corroborando com essa hipótese, tem sido demonstrado que a rutina evoca dilatação vascular por mecanismos diferentes daqueles observados após a administração de quercetina; ainda, nem toda proantocianidina apresenta a mesma eficácia e potência vasodilatadora (FUSI et al., 2003; ZHOU et al., 2006; DALBÓ et al., 2008). Por outro lado, a potencialização do efeito hipotensor do extrato pelo L-NAME suscita a possibilidade de que o extrato possa ativar, de

alguma forma e ao menos parcialmente, o sistema GMPc/PKG vascular. De fato, a inibição da síntese de NO *in vitro* e *in vivo*, inclusive com L-NAME, potencializa a ação de nitrovasodilatadores, evidenciando uma supersensibilização vascular ao NO nessa condição (MONCADA et al. 1991; GUPTA et al., 2008). Vários mecanismos foram apontados como responsáveis por esse fenômeno, inclusive aumento da sensibilidade da PKG ao GMPc (GUPTA et al., 2008). A esse respeito, foi demonstrado que a quercetina é capaz tanto de ativar diferentes formas de guanilato ciclases particuladas, quanto de aumentar os níveis de GMPc em cultura de células (CHEN et al., 2002). Portanto, se as diferentes formas de quercetina identificadas no extrato de *A. crassiflora* mantiverem ao menos a mesma capacidade descrita para a quercetina não glicosilada com relação à ativação das guanilato ciclases, o consequente aumento do conteúdo de GMPc vascular supostamente produzido por essas substâncias, em uma condição associada à supersensibilidade da PKG, explicaria a potencialização do efeito do extrato pelo L-NAME. Essa possibilidade também permanece por ser esclarecida.

O tônus vascular também sofre influência de diversos tipos de canais de K⁺, incluindo os canais de K⁺ ATP-dependentes (KO et al., 2008) Contudo, tais canais não contribuem para o efeito hipotensor do extrato de *A. crassiflora*, como sugere a observação de que a administração de glibenclamida, um bloqueador de canais de K⁺ ATP-dependentes, não bloqueou a resposta hipotensora, mas sim potencializou grandemente esse efeito, levando a óbito todos os animais deste grupo experimental. Assim, semelhantemente ao constatado após a administração da dose de 80 mg/kg durante a construção da curva dose-efeito, a administração de 45 mg/kg de extrato, após glibenclamida, causou, além de intensa vasodilatação, a precipitação de taquiarritmia ventricular e episódios de TdP, tornando-se igualmente cardiotoxica. A literatura relata que a glibenclamida encontra-se 98% ligada à albumina plasmática (OLSEN; KEARNS; KEMP, 1995). Flavonoides e proantocianidinas também são capazes de se ligar à albumina, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOLLI et al., 2010; LI et al., 2013). Assim, é possível que a administração de glibenclamida tenha alterado a farmacocinética dos componentes do extrato, causando o deslocamento da ligação destes à albumina e, conseqüentemente, potencializando seus efeitos não apenas vasodilatadores, mas também cardiotoxicos, como sugere o aumento do iQT nessa condição experimental.

Frente à estimulação por diferentes agonistas, as células endoteliais sintetizam e secretam produtos derivados da atividade das COXs, os quais podem evocar efeitos tanto vasodilatadores (como aqueles produzidos pela PGI₂), quanto efeitos vasoconstritores (como aqueles decorridos da ação de TXA₂ e a PGH₂) (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE,

2011). De fato, o extrato das folhas de *A. crassiflora* parece estimular tanto substâncias vasoconstritoras, quanto vasodilatadoras dependentes da atividade de COXs, uma vez que a administração do extrato após a indometacina potencializou tanto o discreto efeito hipertensor inicial, quanto o efeito vasodilatador e o tempo para recuperação da PAM. Contudo, os efeitos desses mediadores COX-dependentes parecem ter cinéticas diferentes; assim, enquanto o efeito da(s) substância(s) vasodilatadora(s) se manifesta(m) inicialmente, logo após a administração do extrato, o efeito da(s) substância(s) vasoconstritora(s) instala(m)-se posteriormente (fase de relaxamento), participando inclusive na recuperação da resposta.

O bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L representa um importante mecanismo de indução de vasodilatação (JACKSON, 2000). De fato, as diidropiridinas, como a nifedipina, que promovem o bloqueio desses canais, representam uma importante classe de agentes anti-hipertensivos (RICHARD, 2005). O efeito vasodilatador do extrato de *A. crassiflora* foi significativamente reduzido após a administração de nifedipina, sugerindo que o bloqueio, direto ou indireto, dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L contribui para o efeito hipotensor do extrato. As proantocianidinas parecem evocar a vasodilatação, pelo menos parcialmente, através da hiperpolarização vascular (DALBÓ et al., 2008); uma vez que a hiperpolarização causa a inativação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, a presença de proantocianidinas no presente extrato pode explicar porque a hipotensão causada pelo mesmo é sensível a ação da nifedipina. Esta possibilidade permanece por ser investigada. Vale ressaltar que o modesto efeito hipertensor inicial evocado pela administração do extrato também foi reduzido pela nifedipina, sugerindo que a contração evocada requer o influxo de Ca^{2+} nas células musculares lisas, motivo pelo qual também houve aumento no tempo para recuperação da resposta hipotensora (JACKSON, 2000).

7. CONCLUSÃO

- O extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* possui efeito hipotensor relacionado primariamente a uma ação vasodilatadora;
- A vasodilatação parece envolver o bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, mas não está relacionada com a síntese e/ou liberação de NO, nem de prostaglandinas vasodilatadoras, tão pouco depende da estimulação de receptores muscarínicos;
- O extrato parece evocar a síntese e liberação de um vasoconstritor COX-dependente, cujo efeito de baixa magnitude se opõe à vasodilatação produzida pelo extrato; há também a síntese e liberação de um prostanóide vasodilatador que, apesar de não estar envolvido na fase hipotensiva do efeito do extrato, contribui para minimizar o discreto efeito vasoconstritor inicial induzido por este;
- Apesar do extrato possuir substâncias com propriedade antiadrenérgicas, como o alcaloide xilopina, interferências com o tônus simpático não parecem contribuir para a vasodilatação induzida pelo extrato;
- Altas doses de extrato produzem cardiotoxicidade aparentemente relacionada ao retardo da repolarização ventricular; essa cardiotoxicidade é aumentada pela glibenclamida, alertando para uma interação fármaco/produto natural potencialmente fatal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S.; CANTOR, E. H.; SPECTOR, S. Studies on the hypotensive response to atropine in hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 218, n. 3, p. 662-668, 1981.
- ADILSON BRITTO. *Annona crassiflora – Araticum*. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/40115752@N00/3340877451>> Acesso em out. 2017.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239-244, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **Journal of Anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 232-242, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00540-006-0488-4>
- ALBUQUERQUE, U. P. D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnorientadas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500015>
- ALMEIDA, S. P. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF: Embrapa CPAC, 1998. 464 p.
- ANAKA, O.N., OZOLUA, R.I., OKPO, S.O. Effect of the aqueous seed extract of *Persea Americana* mill (Lauraceae) on the blood pressure of Sprague-dawley rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.3, n. 10, p. 485-490, 2009.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 521-531, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00115-7)
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001.
- BEEVERS, G.; LIP, G. Y. H.; O'BRIEN, E. The pathophysiology of hypertension. **BMJ**, v. 322, n. 7291, p. 912-916, 2001. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7291.912>
- BENTLEY, K.W. **The Isoquinoline Alkaloids: A Course in Organic Chemistry**. Oxford: Pergamon Press, 2014. 276 p.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy: Phytochemistry, medicinal plants**. 2 ed. Paris, França: Lavosier Publishing, 1999. 1119 p.
- BOLLI, A. et al. Flavonoid binding to human serum albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 444-449, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.096>

- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J.; HAIBARA A.S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 30-40, 2001.
- CANTOR, E. H. et al. Structure-activity requirements for hypotension and α -adrenergic receptor blockade by analogues of atropine. **European journal of pharmacology**, v. 90, n. 1, p. 75-83, 1983. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90215-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90215-7)
- CHEN Z.J. et al. Quercetin, a phytoestrogen and dietary flavonoid, activates different membrane-bound guanylate cyclase isoforms in LLC-PK1 and PC12 cells. **J Pharm Pharmacol**. v. 55, n. 3, p. 353-8, 2003. <https://doi.org/10.1211/002235702685>
- CHENG, J.-H.; KODAMA, I. Two components of delayed rectifier K^+ current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 2, p. 137-145, 2004.
- CHOW, C. K. et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. **JAMA**, v. 310, n. 9, p. 959-968, 2013. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.184182>
- CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p. 221-230, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.026>
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.M. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2 ed. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2015. 1250-1318 p.
- CROZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolism: occurrence, structure and role in the human diet**. United Kingdom, Blackwell Publishing, 2006. 384 p. <https://doi.org/10.1002/9780470988558>
- CONSOLIM-COLOMBO FM, FIORINO P. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. **Rev Bras de Hipertensão**, v. 12, n. 5, 2005.
- CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery — a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 463-480, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00230-2)
- CUNHA, P.A.; SILVA, A.P.; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. 4 ed. Portugal: Calouste Gulbenkian Foundation, 2012. 729 p.
- DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent advances in polyphenol research**. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2008, vol. 1. 416 p.
- DALBÓ et al. Mechanisms Underlying the Vasorelaxant Effect Induced by Proanthocyanidin-Rich Fraction From *Croton celtidifolius* in Rat Small Resistance Arteries. **Journal of**

Pharmacological Sciences, v. 106, n. 2, p. 234-241, 2008.

<https://doi.org/10.1254/jphs.FP0071119>

DA ROCHA LAPA, F. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 6, p. 875–881, 1 jun. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01240.x>

DRAGER, L.F.; KRIEGER, E. M. Mecanismos de controle da pressão arterial no sono. **Rev Bras Hipertens**, v.16, n. 3, p. 169-173, 2009. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(93\)90159-U](https://doi.org/10.1016/0306-3623(93)90159-U)

DUARTE, J. et al. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology: The Vascular System*, v. 24, n. 4, p. 857-862, 1993. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90968-N](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90968-N)

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 35-36, 2003.

ERIC BRUSSELL, D. A Medicinal Plant Collection from Montserrat, West Indies. **Economic Botany**, v. 58, n. sp1, p. S203-S220, 2004. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)58\[S203:AMPCFM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)58[S203:AMPCFM]2.0.CO;2)

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 1, p. 69-75, 2001.

FACCHINI, P. J. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 29-66, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29>

FARACO, G.; IADECOLA, C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p. 10.1161, 2013.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 941-950, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0812-6>

_____. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x>

FERRAZ, C.R. et al. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural Product Research**, 2017. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1396589>

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, p. 1829-1829, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900001>

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Dialogues in Cardiovascular Medicine**. v. 3, n. 4, p. 222-231, 1980. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

FUSI, F. et al. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 10-17, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0395-5>

GARLAND, C. J.; DORA, K. A. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 152-161, 2017. <https://doi.org/10.1111/apha.12649>

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 363–372, 24 mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.026>

GIROTTI, E. et al. Adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico e fatores associados na atenção primária da hipertensão arterial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 6, p. 1763-1772, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000600027>

GOOGLE PATENTES. **Proantocianidinas**. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/WO2008152173A1?cl=es>> Acesso em fev. 2015.

GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L.-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 204-214, 2015. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i4.204>

GRYCOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 150-175, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.004>

GUPTA P.K. et al. Role of protein kinase G in nitric oxide deficiency-induced supersensitivity to nitrovasodilator in rat pulmonary artery. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 51, n. 5, p. 450-6, 2008. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31816949ca>

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrn1902>

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 647-672, 2013. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct020>

HARBONE, J.B.; BEXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2. ed. London: Taylor and Francis, 1999. 976p.

HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Alkaloid Biogenesis: Molecular Aspects. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 257-285, 1994. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.001353>

- HASSANPOUR, S. et al. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v. 1, n. 1, p. 47-53, 2011.
- HAYES, E. et al. Relationship between QaT and RR intervals in rats, guinea pigs, rabbits, and primates. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32, n. 4, p. 201-207, 1994. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)90088-4)
- HORIKAWA, N. et al. Glibenclamide-Sensitive Hypotension Produced by Helodermin Assessed in the Rat. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 12, p. 1290-1293, 1998. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.1290>
- HUANG, Y. et al. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. **Life Sciences**, v. 63, n. 4, p. 275-283, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00273-2)
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; KRIEGER, E. et al. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.
- IRIGOYEN, M.; KRIEGER, E.; CONSOLIM-COLOMBO, F. Controle fisiológico da pressão arterial pelo sistema nervoso. **Soc. Bras. Hipert**, v. 8, n. 1, p. 6-10, 2005.
- JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000.
- JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.173>
- JÄNIG, W.; HÄBLER, H. J. Neurophysiological analysis of target-related sympathetic pathways – from animal to human: similarities and differences*. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 3, p. 255-274, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01088.x>
- KAPADIA, N.; HARDING, W. Aporphine Alkaloids as Ligands for Serotonin Receptors. 2016.
- KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium channels in smooth muscle. **Gastroenterology**, v. 87, n. 4, p. 960-970, 1984.
- KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.65>
- KONOPELSKI, P; UFNAL, M. Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human. **Physiological Research**; v. 65, n. 5, p. 717-725, 2016.

KRATZ, J.M. et al. Natural products modulating the hERG channel: heartaches and hope. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, 957–980, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7NP00014F>

LAGRUTTA, A. A.; TREPAKOVA, E. S.; SALATA, J. J. The hERG Channel and Risk of Drug-Acquired Cardiac Arrhythmia: An Overview. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1102-1112, 2008. <https://doi.org/10.2174/156802608785700016>

LAHLOU, S. et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 17, n. 3, p. 323-330, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00150.x>

LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. 328 p.

LI, X. et al. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: Ascorbic acid, α -tocopherol, and proanthocyanidins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, n. Supplement C, p. 22-36, 2013.

LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, v. 14, n. 5, p. 314–320, 21 maio 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.003>

LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P.; CORNWELL, T. L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1141-1147, 1994.

LIU, G. Q.; HAN, B. Y.; WANG, E. H. Blocking actions of l-stephanine, xylopine and 7 other tetrahydroisoquinoline alkaloids on alpha adrenoceptors. **Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica**, v. 10, n. 4, p. 302-306, 1989.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, vol. 2. 1998.

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

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>

MONCADA S. et al. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. **Proc Natl Acad Sci**. v. 86, n. 6, p. 2166-70, 1991.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>

MOSS, A. J.; KASS, R. S. Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2018-2024, 2005. <https://doi.org/10.1172/JCI25537>

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799-C822, 1995. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>

NOBRE, F. et al. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013.

NWOKOCHA, C. R. et al. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague–Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 11, p. 1436-1441, 2012. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.684690>

OHTANI, H. et al. A Comparative Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of the Electrocardiographic Effects of Epinastine and Terfenadine in Rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 458-462, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06824.x>

OLSEN, K. M.; KEARNS, G. L.; KEMP, S. F. Glyburide Protein Binding and the Effect of Albumin Glycation in Children, Young Adults, and Older Adults with Diabetes. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 7, p. 739-745, 1995. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1995.tb04115.x>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Traditional, complementary and integrative medicine**. Disponível em: <<http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/en/>> Acesso em set. 2017.

O'SHAUGHNESSY, K. M.; NEWMAN, C. M.; WARREN, J. Inhibition in the rat of nitric oxide synthesis in vivo does not attenuate the hypotensive action of acetylcholine, ATP or bradykinin. **Experimental physiology**, v. 77, n. 2, p. 285-292, 1992. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1992.sp003588>

PAIVA, B.P.; FARIAS, N.C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev. Bras. Hipertens**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)

PUBCHEM. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em out. 2017.

_____. **Flavone**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10680#section=2D-Structure>> Acesso em out. 2017.

_____. **Isoquinoline**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8405#section=2D-Structure>> Acesso em out. 2017.

- RAMON LAMAR DE OLIVEIRA JUNIOR. **Araticum ou marolo**. Disponível em: <<http://carpoteca.blogspot.com.br/search/label/Annona%20crassiflora>> Acesso em out. 2017.
- RICHARD, S. Vascular Effects of Calcium Channel Antagonists: New Evidence. **Drugs**, v. 65, n. 2, p. 1-10, 2005. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565002-00002>
- RODEN, D. M. Cellular basis of drug-induced torsades de pointes. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 7, p. 1502-1507, 2008. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.238>
- ROESLER, R. et al. Evaluation of the Antioxidant Properties of the Brazilian Cerrado Fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. C102-C107, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08882.x>
- SANGUINETTI, M. C.; TRISTANI-FIROUZI, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 463-469, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04710>
- SAPER, C. B. The Central Autonomic Nervous System: Conscious Visceral Perception and Autonomic Pattern Generation. **Annual Review of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 433-469, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.032502.111311>
- SOARES, F. P. et al. **Marolo**: uma frutífera nativa do Cerrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras- MG. 2009
- SOB A SOMBRA DAS ÁRVORES. **Marolo – *Annona crassiflora***. Disponível em: <<https://sobasombradasarvores.wordpress.com/arvores-frutiferas-e-aromaticas/marolo-annona-crassiflora/>> Acesso em out. 2017.
- SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.1.28>
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 107, n.3, supl. 3, 2016.
- SONCINI, R. et al. Hypotensive effect of aqueous extract of *Averrhoa carambola* L.(Oxalidaceae) in rats: An in vivo and in vitro approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 353-357, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.001>
- TRIGGLE, C. R. et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 6, p. 713-738, 2012. <https://doi.org/10.1139/y2012-073>
- TRUDEAU, M. et al. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. **Science**, v. 269, n. 5220, p. 92-95, 1995. <https://doi.org/10.1126/science.7604285>
- USEFUL TROPICAL PLANTS. ***Annona crassiflora***. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Annona+crassiflora>> Acesso em out. 2017.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. **Annu Rev Physiol**, v. 51, p. 315-29, 1989.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.51.030189.001531>

VANDENBERG, J. I. et al. hERG K^+ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1393-1478, 2012.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>

VILAR, J. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice.

Brazilian Journal of Biology, v. 68, p. 141-147, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100020>

VILAR, J.; FERRI, P.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 197-202, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000100028>

VISKIN, S. Long QT syndromes and torsade de pointes. **The Lancet**, v. 354, n. 9190, p. 1625-1633, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)02107-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)02107-8)

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In: (Ed.). **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**: Wiley-Blackwell, v. 40, 2010.

WONG, P. C. et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 252, n. 2, p. 726-732, 1990.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. e264-e270, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2006001900029>

ZITRON, E. et al. QTc Prolongation by Grapefruit Juice and Its Potential Pharmacological Basis. HERG Channel Blockade by Flavonoids. **Circulation**, v. 111, n. 7, p. 835-838, 2005.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155617.54749.09>

ZHOU, X.-M. et al. Comparison of vasodilatation effect between quercetin and rutin in the isolated rat thoracic aorta. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2006.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 243/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/16

Projeto Pesquisa: “Avaliação do efeito hipotensor e antidepressivo do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Annona Crassiflora* Mart”.

Pesquisador Responsável: Ingrid Beatriz de Melo Moraes

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 16 de novembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU