

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO

KEYTH SULAMITTA DE LIMA GUIMARÃES

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DO *Hymenaea rubriflora* Ducke NA
REATIVIDADE VASCULAR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS**

JOÃO PESSOA-PB
2016

KEYTH SULAMITTA DE LIMA GUIMARÃES

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DO *Hymenaea rubriflora* Ducke NA
REATIVIDADE VASCULAR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS**

**JOÃO PESSOA-PB
2016**

KEYTH SULAMITTA DE LIMA GUIMARÃES

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DO *Hymenaea rubriflora* Ducke NA
REATIVIDADE VASCULAR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Clínica e Epidemiologia Aplicada à Nutrição.

Prof.^o. orientador: Dr.^o. Alexandre Sérgio Silva

Prof.^a. coorientadora: Dr.^a. Bagnólia Araújo da Silva

JOÃO PESSOA-PB

2016

KEYTH SULAMITTA DE LIMA GUIMARÃES

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DO *Hymenaea rubriflora* Ducke NA
REATIVIDADE VASCULAR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS**

Defesa: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva

Coordenador da Banca Examinadora

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof. ^a Dr.^a Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

Examinadora Interno -Titular

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Examinadora Interna – Suplente

Jailane de Souza Aquino

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof.^oDr.^o Enéas Ricardo de Moraes Gomes

Examinador Externo - Titular

(UFPB/ Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas)

Prof.^a. Dr.^a.Fabiana de Andrade Cavalcanti

Examinadora Externo - Suplente

(UFPB/ Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas)

Dedico este trabalho a minha querida Vovó Francisca Costa e minha mãe Eliane Costa. Amo vocês pelo exemplo de mulher que são, por dedicarem a mim uma parte do coração. Saibam que me sinto feliz ainda mais quando as faço sorrir, essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

“Que eu jamais me esqueça que **Deus** me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e espfoinça dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor” (Chico Xavier). As oportunidades nascem para provar que DEUS é uma fonte inesgotável de poder, por isso vejo que, minhas orações são sempre ouvidas um a uma, e ao seu tempo são respondidas. A ti meu Senhor, sou grata pelo presente da vida, assim como, pelas pessoas que colocastes no meu caminho, aquelas que me inspiraram, me ajudaram, me desafiaram e me dforam coragem para ser cada dia melhor.

Agradeço ao meu professor orientador Alexandre Sérgio Silva, pelos ensinamentos primorosos, a compreensão e ajuda incondicional em todos os momentos dessa caminhada. Seus desafios me ajudaram a acreditar em mim e a crescer pessoal e profissionalmente.

Á minha co-orientadora professora Bagnólia Araújo da Silva por me acolher e permitir um mundo de ensinamentos em seu laboratório. Obrigada pela disposição a me ajudar na elaboração desta dissertação, certamente sua participação foi imprescindível para chegarmos até aqui.

Á minha queria professora Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, por ser mais que professora, mas amiga, ouvinte e conselheira. Suas palavras sempre me acalmavam quando tudo parecia difícil. Obrigada por fazer parte da minha trajetória acadêmica e por continuar me apoiando nesta caminhada.

Ao professor Rubens Queiroz por identificar a espécie da planta e por toda disponibilidade para me ajudar na elaboração deste estudo.

Á professora Ângela Maria Tribuzy pelos ensinamentos e orientações para a elaboração e análise dos extratos para a realização dos experimentos.

As Professoras Doutoras Fabiana de Andrade Cavalcante, Jailane Aquino, e o professor Enéas Ricardo de Moraes Gomes pela disponibilidade em participar da banca examinadora da defesa de Mestrado. Agradeço por suas contribuições a esse trabalho, bem como a participação nessa etapa tão importante na minha formação acadêmica.

As minhas queridas, Iara Leão Luna de Souza e Isabelle de Lima Brito pela paciência, dedicação e ensinamentos em todos os experimentos que se estendiam pelas noites, por fazerem dos dias difíceis, momentos ricos de conhecimento e descontração. Eu tive a sorte de encontrar pessoas competentes, companheiras e amigas. Serei eternamente grata por tudo. Deus ilumine o caminho brilhante de vocês.

A todos os colegas Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, por me acolher, me ajudar e descontrair os momentos de pesquisa e experimentos.

Ao meu amor e companheiro Gabriel Costa, que esteve presente em todos os momentos desse estudo, que participou ativamente das coletas, da organização da escrita, que me ouviu reclamar, chorar e sorrir em todas as etapas desta caminhada. Você é um presente na minha vida meu amor, obrigada.

As minhas amigas amadas Adelia Pereira e Roberta Gouveia por me apoiarem em todos os dias de angústia, sempre com palavras de ânimo e de força. Vocês foram imprescindíveis nessa caminhada.

As minhas “Nutris tops” que estavam sempre torcendo por mim, permitindo que os dias de faculdade fossem regados de descontração e companheirismo, eu não poderia ter conhecido pessoas mais felizes e cheias de compromisso com a profissão. Amo vocês minhas queridas: Amanda, Arabela, Flávia, Ingrid, Luciana, Vitória, Edjeyse.

A todos os colegas da turma de mestrado do PPGCN e do GEPFADS por compartilhar cada desafio pessoal, as dificuldades e as dádivas desta fase em nossas vidas.

Keyth Sulamitta de Lima Guimarães.

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino” (Paulo Freire).

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo quantificar o conteúdo de compostos fenólicos de extratos da casca do caule e da polpa do fruto da *Hymenaea rubriflora Ducke* e sua ação na reatividade vascular a agentes contráteis e relaxantes de aorta torácica de ratos, assim como estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos. Foi realizada extração dos compostos fenólicos da casca do caule e da polpa utilizando como solventes água e álcool etílico (1:1). A presença de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH dos extratos hidroalcóolicos. O efeito vasorrelaxante do extrato hidroalcólico da casca do caule (HR-HAc), assim como a toxicidade aguda para a realização da suplementação de ratos Wistar com o HR-HAc foram investigados nas doses de 25 (G25), 50 (G50) e 150 mg/kg (G100) por quatro semanas (8 animais/grupo). A análise bioquímica foi utilizada para quantificar nitrito (NO), malondialdeído (MDA), atividade antioxidante, perfil lipídico e glicose. Identificou-se que o HR-HAc apresentou maior concentração de compostos fenólicos (274, 63 mg ác gál/g) e atividade antioxidante (5076,50 μ mol Tx/g), que o extrato da polpa do fruto (HR-HAp) (3,49 mg ác gál/g e 29,26 μ mol Tx/g, respectivamente). Além disso, o HR-HAc relaxou a aorta de rato pré-contráida com FEN de maneira dependente de concentração em ambos, presença e ausência do endotélio funcional ($CE_{50} = 5,0 \pm 1,1$ vs $8,7 \pm 1,8$ μ g/mL), sendo o relaxamento atenuado na presença do L-NAME ($CE_{50} = 142,4 \pm 21,6$ μ g/mL), entretanto, não foi observado alteração no relaxamento induzido pelo extrato na presença da indometacina ($CE_{50} = 2,9 \pm 0,3$ μ g/mL). A suplementação aguda do HR-HAc apresentou baixa toxicidade, enquanto que a suplementação crônica mostrou aumento da potência relaxante da ACh em G50, quando comparado ao G100 ($pD_2 = 7,8 \pm 0,1$ vs $7,6 \pm 0,1$). A curva cumulativa com nitroprussiato de sódio (NPS) apresentou maior potencia relaxante em G100 quando comparado a G50 ($pD_2 = 12,1 \pm 0,04$ vs $11,3 \pm 0,3$). A eficácia contrátil em aorta de rato sem endotélio foi reduzida em G100 ($E_{max} = 40,4 \pm 5,1\%$). A curva cumulativa a FEN na presença de L-NAME mostrou diminuição na potência contrátil em aorta de rato com endotélio em G25 e G50 quando comparado GC na presença e ausência L-NAME ($pD_2 = 6,4 \pm 0,1$, $6,4 \pm 0,1$ e $6,9 \pm 0,1$, respectivamente), assim como a eficácia contrátil da FEN foi reduzida nos grupos G25, G50 e G100 quando comparado ao GC na presença e ausência de L-NAME ($E_{max} = 61,4 \pm 5,2$; $74,4 \pm 5,3$; $76,9 \pm 3,7$; 100 e 100%, respectivamente). Verificou-se que não ocorreu diferença significativa para os valores da capacidade antioxidante, NO, perfil lipídico e glicose no plasma dos animais tratados e do grupo controle. Desse modo, conclui-se que este produto poderá ser indicado para benefícios profiláticos a patologias relacionadas à alterações na reatividade vascular.

Palavras-chave: *Hymenaea rubriflora Ducke*. Vasorrelaxamento. Vasoconstrição. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

This study aimed to quantify the content of phenolic compounds of the bark extracts of the stem and pulp of the fruit of *Hymenaea rubriflora* Ducke and its effect on vascular reactivity to contractile and relaxing agents thoracic aorta of rats, as well as oxidative stress and biochemical parameters. extraction was performed phenolic compounds of the shell, the stem and the pulp using the ratio of water and alcohol solvents (1: 1). The presence of total phenolic compounds was performed by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity for the kidnapping of free radical DPPH of hydroalcoholic extracts. The vasorelaxant effect of the hydroalcoholic extract of the stem bark (HR-HAc), as well as acute toxicity for the realization of rats supplemented rats with HR-HAc was studied at doses of 25 (G25), 50 (G50) and 150 mg / kg (G100) for four weeks (8 animals / group). Biochemical analysis was used to quantify nitrite (NO), malondialdehyde (MDA), antioxidant activity, lipid profile, and glucose. It was identified that the HR-HAc showed higher concentration of phenolic compounds (274, 63 mg AC Gál / g) and antioxidant activity (5076.50 micromol Tx / g), the fruit pulp extract (HR-HAp) (Ac Ga 3.49 mg / g and 29.26 micromol Tx / g, respectively). In addition, the HR-HAc relaxed the aorta pre-contracted with mouse FEN concentration dependent manner in both, presence and absence of functional endothelium ($EC_{50} = 5.0 \pm 1.1$ vs. 8.7 ± 1.8 ug / mL), and the attenuated relaxation in the presence of L-NAME ($EC_{50} = 142.4 \pm 21.6$ mg / mL), however, was not observed change in the relaxation induced by the extract in the presence of indomethacin ($EC_{50} = 2.9 \pm 0.3$ ug / mL). Acute supplementation HR-HAc showed low toxicity, while the chronic supplementation showed increased relaxation potency of ACh compared to G50 G100 ($pD_2 = 7.8 \pm 0.1$ vs. 7.6 ± 0.1). The cumulative curve with sodium nitroprusside (SNP) showed greater potency in relaxing G100 compared to G50 ($pD_2 = 12.1 \pm 0.04$ vs 11.3 ± 0.3). The contractile efficacy without endothelium in rat aorta was reduced G100 ($E_{max} = 40.4 \pm 5.1\%$). The cumulative curve FEN in the presence of L-NAME showed reduction in contractile potency in rat aorta with endothelium G25 and G50 in comparison GC in the presence and absence of L-NAME ($pD_2 = 6.4 \pm 0.1$, 6.4 ± 0.1 and 6.9 ± 0.1 respectively) as well as contractile efficiency of FEN was reduced in the groups G25, G50 and G100 when compared to the control group in the presence and absence of L-NAME ($E_{max} = 61.4 \pm 5.2$, 74.4 ± 5.3 , 76.9 ± 3.7 , 100 and 100%, respectively). It was found that there was no significant difference in the values of antioxidant capacity, NO, lipid profile and glucose in plasma of the treated animals and the control group. Thus, it is concluded that this product may be indicated for prophylactic benefits to pathologies related to changes in vascular reactivity.

Keywords: *Hymenaea rubriflora* Ducke. Vasorelaxation. Vasoconstriction. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 -	Jatobá (<i>Hymenaea rubriflora</i> Ducke).....	21
Figura 2 -	Fruto do Jatobá.....	22
Figura 3 -	(A) Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de <i>H. courbaril</i> . (B) flavonóides isolados das cascas do caule de <i>H. Parvifolia</i>	24
Figura 4 -	Estrutura de álcool quiral (+) e mentol (-).....	25
Figura 5 -	Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^{+}	33
Figura 6 -	Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $Gq/11-PLC\beta 1$	34
Figura 7 -	Sistema de banho para órgãos isolados compostopor cubas (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C).....	40
Figura 8 -	Amplificador (A) e do microcomputador (B).....	41
Figura 9 -	Analisador automático Labmax 240 premium da Labtest.....	41

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1 -	Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta de rato na presença (●) e ausência (○) de endotélio funcional.....	76
Figura 2 -	Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN em aorta de rato com endotélio funcional na ausência (●) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (○).....	77
Figura 3 -	Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta de rato com endotélio funcional na ausência (●) e na presença de 10^{-5} M de indometacina (○).	78
Figura 4 -	-Efeito relaxante da ACh (A) e do NPS (B) sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■) e GS100 (□) em aorta isolada de rato.	79
Figura 5	Efeito contrátil da FEN na presença (A) ou ausência (B) do endotélio nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■) e GS100 (□) em aorta isolada de rato.	80
Figura 6	Efeito contrátil da FEN na presença do L-NAME nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■), GS100 (□) e na ausência do L-NAME no grupo GC (△) em aorta isolada de rato.....	82

QUADRO DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1	Mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial sistêmica e sua medida nutricional atenuante.....	28
-		

TABELA DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 -	Composição físicoquímica de calorias totais, macronutrientes, minfoiis e vitamina C da polpa e semente do jatobá (<i>Hymenaeacourbaril L.</i>).....	23
Tabela 2	Solução de Krebs	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
BKCa	Canais de potássio de grande condutância ativados pelo cálcio
A1GPA	Alfa-1 Glicoproteína Ácida
ANOVA	Análise de Variância
[Ca²⁺]	Concentração de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_c	Concentração citosólica de Ca ²⁺
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CE50	Concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
4Ca²⁺-CaM	Complexo cálcio-calmodulina
DASH	<i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
ECA	Enzima de Conversão da Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E.P.M	Erro padrão da média
E_{max}	Efeito máximo
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FEN	Fenilefrina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína
HR-HAc	Extrato hidroalcoólico da casca do caule de H. rubriflora D
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
NO	Oxido Nítrico
O₂	Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PCR-us	Proteína C Reativa-ultrassensível
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia

SRAA	Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Características do jatobá.....	21
2.1.1 O jatobá do cerrado (<i>Hymenaea rubriflora</i> Ducke).....	21
2.1.2 Propriedades terapêuticas do <i>hymenaea</i>	25
2.2 REATIVIDADE VASCULAR E HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	26
2.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL E INFLUÊNCIA DA DIETA.....	27
2.4 MECANISMOS DA CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO EM MÚSCULO LISO.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	36
3.2 DESENHO DO ESTUDO.....	36
3.3 PRODUTO TESTE.....	36
3.3.1 Obtenção e preparo do extrato da casca do caule e da polpa do fruto de Jatobá.....	31
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO.....	37
3.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS....	38
3.6 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.7 SUBSTÂNCIAS E SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	38
3.7.1 Equipamentos Utilizados.....,	39
3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VITRO.....	41
3.8.1 Preparação da solução-estoque.....	41
3.8.2 Avaliação do efeito do HR-HAc sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato..	42
3.8.3 Pré contração com felilefrina e curva de relaxamento do HR-HAc com L-NAM.	43
3.8.4 Análise da participação dos prostanóides na resposta contrátil à fenilefrin.....	43
3.9 PROTOCOLO DE TOXICIDADE.....	43

3.10 PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO COM HR-HAc	44
3.10.1 Eutanásia e coleta do material biológico	45
3.10.2 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa de contração à FEN em aorta isolada de rato	45
3.10.3 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa de relaxamento em aorta isolada de rato	46
3.10.4 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa à fen em aorta isolada de rato, na ausência e na presença de L-NAME	46
3.10.5 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa à nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta isolada de rato	47
3.11 MEDIDAS BIOQUÍMICAS	47
3.11.1 Avaliação de nitrito no plasma	47
3.11.2 Avaliação das concentrações de malondialdeído -MDA	48
3.11.3 Capacidade antioxidante total (DPPH) do plasma	48
5.11.4 Análise de perfil lipídico e glicêmico	49
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO 1: Certidão de aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA)	58
ANEXO 2: Triagem comportamental do HR-HAc na dose de 2000mg/kg (v.o)	59
ARTIGO: Potencial antioxidante e efeito na reatividade vascular do extrato da casca do <i>Hymenaea rubriflora</i> D	60
INTRODUÇÃO	62
MÉTODOS	63
RESULTADOS	68
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Em meio a diversidade de plantas no mundo, o homem desde a antiguidade vem utilizando espécies vegetais para prevenção e tratamento de doenças. O uso empírico e etnofarmacológico de diversas espécies vegetais tornou-se base para o direcionamento de muitos estudos (MONTES et al., 2009). Encontram-se registradas informações sobre princípios ativos isolados em espécies vegetais brasileiras com propriedades medicinais, algumas utilizadas até a atualidade para terapêutica de várias patologias (MONTANARI; BALZANI, 2001).

Dentre as diversas espécies que ocorrem no Brasil a *Hymenaea*, trata-se de uma leguminosa típica do cerrado brasileiro, também conhecida como jutaí ou jatobá do cerrado (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987). Este vegetal que ocorre no Nordeste, foi evidenciado em um estudo etnofarmacológico desenvolvido por Cartaxo, Souza e Albuquerque (2010), por ser culturalmente consumido pela população por meio de infusões e decocções das folhas, raízes, frutos e a casca do caule para diversas finalidades terapêuticas, como: anemias, problemas renais, dores de garganta e doenças de vias respiratórias.

Estudos experimentais têm mostrado efeito antidiarréico e gastroprotetor com o extrato da casca do caule da espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart em ratos com úlcera péptica e gástrica (RODRIGUES et al., 2012) e efeito hipoglicemiante e hipolipemiante acompanhado de redução de LDL e HDL-colesterol com uso de concentrado da polpa do fruto também em ratos diabéticos (SALES, 2011).

Alguns estudos *in vitro* evidenciam propriedades antioxidante, pela capacidade de sequestrar os radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e anti-inflamatória pelo isolamento do ácido graxo linolênico, assim como a presença de compostos fenólicos com promissor efeito terapêutico (BEZERRA et al., 2013; VEGGI et al., 2014). Interessantemente, atividades pró-oxidantes e inflamatórias estão entre os principais mecanismos que explicam a menor capacidade vasodilatadora e o resultante aumento da pressão arterial em hipertensos (NEVES et al., 2012).

A liberação das espécies reativas de oxigênio (EROS) induz, a nível cardiovascular, contração vascular, disfunção endotelial e liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-6 e *Tumor Necrosis Factor – alpha* - TNF- α .

Nos rins, promove reabsorção de sódio, decréscimo da filtração glomerular e dano tecidual, que contribui para aumento do volume plasmático. Além disso, promove aumento da atividade simpática (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2004), sendo todos estes fenômenos contribuintes para o aumento da pressão arterial.

A presença de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias na casca, caule ou polpa do *Hymenaea*, suportam a hipótese de que este produto pode apresentar a capacidade anti-hipertensiva. Entretanto, apesar destas evidências prévias, não há estudos que apresentaram a eficácia da suplementação da casca do caule e da polpa do *Hymenaea* na função vascular, e consequentemente na pressão arterial. Por outro lado, foi demonstrado efeito espasmolítico em traquéia de ratos hiperresponsivos e ação imunomoduladora sobre leucócitos e eosinófilos dos mesmos em um estudo com o isolado fenólico astilbin, obtido do extrato da casca do caule do *Hymenaea courbaril* (BEZERRA et al., 2013). Este efeito espasmolítico em traqueia oferece uma base para se testar a hipótese de ocorrer efeito relaxante também a nível de músculo liso vascular.

Diante desta perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar o efeito do extrato de *Hymenaea rubriflora* Ducke na reatividade vascular e capacidade antioxidante em ratos. Como objetivos específicos: quantificar os compostos fenólicos e avaliar a capacidade antioxidante do extrato da casca do caule e do fruto do *H. rubriflora* D., investigar o efeito do extrato hidroalcoólico sobre a reatividade vascular de artéria aorta torácica isolada; avaliar o efeito da suplementação do extrato hidroalcoólico sobre a reatividade vascular de artéria aorta torácica isolada, assim como o efeito desta suplementação sobre o estresse oxidativo, e perfis lipídico/glicêmico de ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DO JATOBÁ

2.1.1 O jatobá do cerrado (*Hymenaea rubriflora* Ducke)

O Jatobazeiro (*Hymenaea rubriflora* D.) é uma planta com 4 a 6m de altura, característica do cerrado brasileiro (Figura 1), que produz frutos farináceos comestíveis com comprimento entre 6 e 18 cm e diâmetro de 3 a 6 cm (CHANG et al., 1998). Seus frutos são apresentados na Figura 2, têm formato de vagem, com uma casca lenhosa marrom escuro intenso, polpa de cor amarela, sabor doce e aroma característicos. Suas sementes são achatadas quando frescas, elas são apreciadas por pessoas e animais (DIAS; LUZIA; JORGE, 2013).

Figura 1- Jatobá (*Hymenaea rubriflora* Ducke.)



Fonte: própria.

A polpa de fruta pode ser utilizados na formulação de aperitivos por proporcionar sabor apetecível e enriquecer a alimentação com fibras (CHANG et al., 1998). São muito apreciados pela população regional, sendo consumidos e utilizados na elaboração de bolos, pães e mingaus, *cookies* e *snacks* com alto teor de fibras (SILVA et al., 2001).

Figura 2: Fruto do Jatobá



Fonte: própria

Estudo fitoquímico de Dias, Luzia e Jorge (2013) evidencia significativa presença de minerais, especialmente sódio, potássio e fósforo, assim como a presença de fibra bruta considerando 50,02% na polpa e 72,14% na semente e a presença de vitamina C com 121,45 mg/100g e 51,87 mg/100g na polpa e semente respectivamente como evidenciado na tabela 1. Também observou-se a presença de óleos essenciais oleico e linoleico e substâncias bioativas abundantes como o alfa-tocoferol e beta-sitosterol.

Até mesmo a casca do caule pode ter propriedades funcionais. A madeira é composta, principalmente, de celulose, hemiceluloses e lignina, também conhecidos como metabólitos primários, que são responsáveis pela formação da parede celular e pela maioria de suas propriedades (LEPAGE, 1986). Os componentes minoritários de baixo peso molecular são os extrativos ou metabólitos secundários (saponinas, taninos, alcalóides, flavonóides, graxas, terpenos e esteróides) e as substâncias minfoiis, que constituem o material inorgânico.

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente no gênero *Hymenaea*; alguns estudos apresentam isolados de flavonóides em diferentes espécies deste gênero. Imai e colaboradores (2008), identificaram estruturas dos flavonóides em isolados do cerne de *H. courbaril* (figura 3A), Ishibashi e colaboradores (1999), isolaram diflavonoides da espécie *parvifolia* (figura 3B). Nas plantas, os flavonóides garantem a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com a finalidade de polinização; ação antioxidante; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e Inibição de enzimas (MARANHÃO, 2009).

Tabela 1: Composição físicoquímica de calorias totais, macronutrientes, minfoiis e vitamina C da polpa e semente do jatobá (*Hymenaea courbaril L.*).

Constituintes (%)	Polpa	Semente
Lipídeos	1,94 ±0,05	5,78±0,02
Proteínas	12,32±0,02	11,32±0,01
Fibras	50,02±0,28	72,14±0,08
Carboidratos	31,2	8,81
Calorias (kcal/100g)	191,54	132,54
Vitamina C (mg/100g)	121,45±0,65	51,87±0,27
Minfoil (mg/100g):		
Cobre	2,07±0,07	3,35±0,01
Selênio	0,27±0,23	0
Boro	1,32±0,56	1,31±0,53
Manganês	7,62±0,58	3,90±0,25
Zinco	1,14±0,12	2,01±0,33
Cálcio	57,39±0,09	89,50±0,05
Potássio	229,40±0,11	139,65±0,02
Magnésio	99,15±0,06	82,47±0,16
Fósforo	137,60±0,20	158,16±0,61
Sódio	468,15±0,29	251,49±0,50

Fonte: adaptado de Dias; Luzia; Jorge, (2013).

Além dos compostos fenólicos, outros compostos têm sido isolado das cascas do caule, tronco e frutos do *Hymenaea*, como os *sesquiterpenos*, *diterpenos*, ácidos graxos e oligossacarídeos; assim como a sacarose e o ácido linoleico foram isolados do pó amarelado obtido a partir de seus frutos (NOGUEIRA et al., 2002; JAYAPRAKASAM et al., 2007).

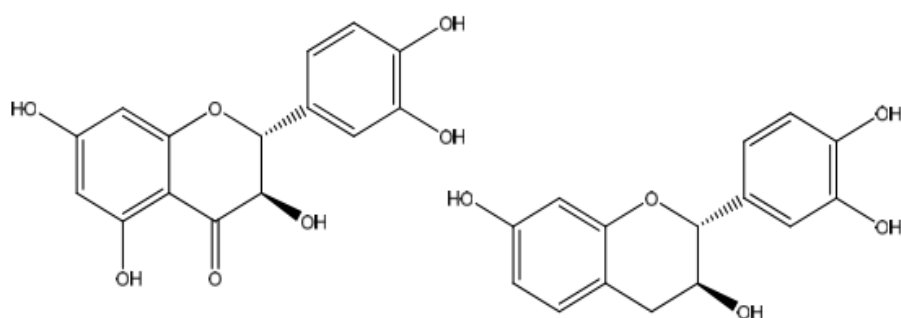
Os terpenos são moléculas de tamanho relativamente pequeno, os quais apresentam em sua constituição seguimentos de unidades isoprênicas com átomos de carbono geralmente múltiplos de cinco, ligados entre si, geralmente são encontrados na forma de seus derivados oxigenados, tais como, álcool, aldeído, cetonas, ésteres e ácidos carboxílicos (MATICH et al., 2007).

Alguns terpenos são utilizados na indústria farmacêutica para a formulação de medicamentos, como o mentol (figura 4), constituinte do óleo essencial Labiaceae. É o mais empregado no ramo da indústria devido a suas propriedades anestésicas e anti-inflamatórias (GALEOTTIA et al., 2002; ECCLES, 1994). Apesar de serem moléculas estruturalmente simples, exercem atividade terapêutica, já bastante elucidada na literatura, destacando-se pela sua ação no sistema cardiovascular, por desempenhar

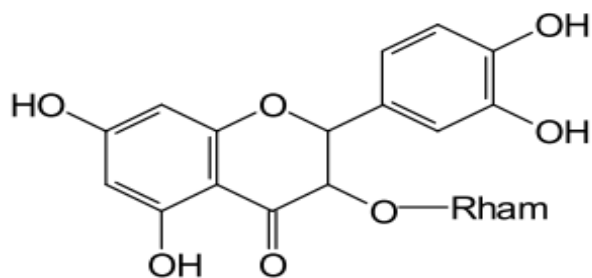
atividades vasorelaxante, hipotensiva e na diminuição da frequência cardíaca (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; BASTOS et al., 2010; AYDINET al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008).

Figura 3: **A:** Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de *H. courbaril*. **B:** flavonóides isolados das cascas do caule de *H. parvifolia*.

A

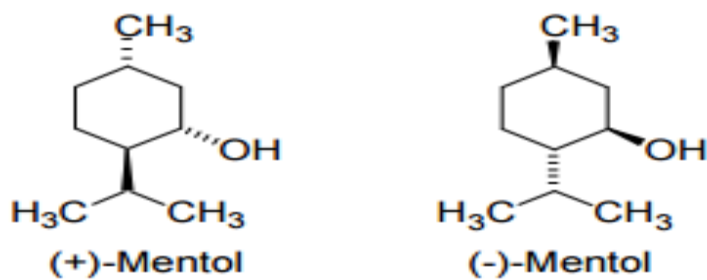


B



Fonte: MARANHÃO, 2009.

Figura 4 : Estrutura de álcool quiral (+) e mentol (-).



Fonte: adaptado de MARANA, DUCATI, SILVA, FILHO, 2013.

2.1.2 Propriedades terapêuticas do gênero *Hymenaea*

Considerando que a composição química do *Hymenaea* fornece capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antilarvívica (JAYAPRAKASAM et al., 2007), alguns estudos tem testado estas propriedades. Entretanto, o jatobá ainda é pouco elucidado na literatura, ocorrendo predominância para os estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos e caracterização bioquímica do extrato das espécies *H. courbari* L.; *H. stigonocarpa* Mart e *H. stilbocarpa* Mart (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010) (ALIMENTAR et al., 2001) (RODRIGUES ORSI et al., 2012) (VEGGI et al., 2014), poucas evidências científicas são apresentadas, no que se refere a sua capacidade farmacológica, não sendo identificado estudos de intervenção em humanos.

O estudo de Bezerra et al. (2013), apresentou a presença de um importante flavonóide, astilbin, que foi isolado da casca do caule do *H. courbaril*, sendo capaz de retardar aproximadamente 50% da contração induzida por K^+ em anéis traqueais de ratos. No mesmo estudo, observou-se que a suplementação de 150mg/kg do extrato alcoólico da cascas do *H. courbaril* em ratos sensibilizados com ovalbumina diminuiu a hipersensibilidade das vias aéreas, assim como reduziu o número total de glóbulos brancos, em particular os eosinófilos e neutrófilos no tecido bronco-alveolar.

Rodrigues Orsi et al. (2012), avaliaram a capacidade gastroprotetora do extrato da casca do caule e da polpa do fruto do *H. stinocarpa* em ratos com lesão na mucosa gástrica e duodenal, assim os animais foram tratados por 14 dias com 200 mg/kg do extrato e 10% da ração foi complementada pela farinha do fruto. Desse modo identificou-se a capacidade antidiarreica, gastroprotetora e cicatrizante do extrato da casca e da polpa do fruto do *H. stinocarpa*, o que pode representar uma importante fonte alimentar para o tratamento de úlceras pépticas.

O efeito hipoglicemiante do *Hymenaea* foi identificado por Sales (2011), quando realizou a suplementação por 50 dias do concentrado de jatobá preparado feito por diluição a 10% peso/volume da polpa do fruto, em volume correspondente a 0,5 mL/100g de peso corporal do animal. A administração foi realizada diariamente por gavagem nos animais diabéticos.

Com base nos achados de estudos prévios os quais utilizaram diferentes espécies do gênero *Hymenaea* em experimento *in vitro*, na musculatura lisa de traquéia e

(BEZERRA et al, 2013; RODRIGUES ORSI et al., 2012), compreende-se a necessidade de avaliar o efeito de outra espécie do gênero das diversas espécies de *Hymanae* em músculo liso de vaso sanguíneo.

2.2 REATIVIDADE VASCULAR E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, considera -se adultos hipertensos aqueles que apresentam valores sustentados para pressão arterial sistólica igual ou superior a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica igual ou superior a 90 mmHg, com diagnóstico validado por medidas repetidas, por pelo menos três ocasiões (SBC; SBH; SBN, 2010), de tal modo que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é diagnosticada por níveis pressóricos aumentados e sustentados com alterações funcionais e metabólicas associados.

Do ponto de vista vascular, este estado sustentado de pressão arterial aumentada é resultado, dentre alguns fatores de uma diminuição da capacidade do leito vascular de responder a estímulos vasorrelaxantes e uma hiperresponsividade a estímulos contráteis (KEARNEY et al., 2004). Em modelo animal, este fenômeno é investigado através de estudos de reatividade a agentes agonistas contráteis e relaxantes (JESUÍNO, 2013; SOCORRO, 2014). Em humanos é avaliado indiretamente por meio da resposta pletismográfica a agentes contráteis e relaxantes (MENEZES, 2014).

A HAS tem sido apontada como o mais importante fator de risco modificável para as doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais (LEWINGTON et al., 2002; KEARNEY et al., 2004). Estudos têm demonstrado uma relação direta entre níveis elevados de pressão arterial e aumento no risco de lesões em órgãos-alvo, tais como, acidente vascular encefálico (JONES et al., 2003; VEGLIO et al., 2009), doença arterial coronariana (LAI et al., 2012), insuficiência cardíaca (GADDAM et al., 2009) e insuficiência renal (YAN et al., 2012).

Vários estudos apontam o sedentarismo, o tabagismo, as dislipidemias e a obesidade como fatores de relação direta com o aumento da pressão arterial, ainda bastante preocupantes, que se apresenta entre homens e mulheres, e independem da classe econômica (YAHAGI; DAVIS; ARBUSTINI; VIRMANI, 2015; GUS et al., 2015; YUSUF et al., 2004). Desse modo a terapêutica desta enfermidade, deverá voltar-

se a compreensão de sua etiologia, dos fatores de risco modificáveis abordados anteriormente e dos fatores de risco não modificáveis como idade, gênero, etnia e fatores genéticos (CESARINO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008) que também determinam o controle da pressão arterial.

O consumo de alimentos funcionais capazes de promover o controle da pressão arterial torna-se uma estratégia importante no controle e na prevenção da HAS. Desse modo, tem sido reportado diversos alimentos como chia, melancia, uva e derivados, e leite que promovem redução da pressão arterial por sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo, inflamação sistêmica em humanos (TOSCANO, 2013; BRITO, OLIVEIRA, TOSCANO, SILVA, 2013) e melhoria da reatividade vascular a agentes relaxantes, bem como inibição da reatividade vascular a agentes contráteis em estudo com modelo animal (SOCORRO, 2014; ANDRADE, 2014).

2.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL E INFLUÊNCIA DA DIETA

O sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) é um complexo hormonal que desempenha importante função no controle da pressão arterial e na homeostasia hidroeletrolítica do organismo (CAREY; SIRAGY, 2003). A renina é uma enzima proteolítica, com ação vasopressora, liberada pelas células justaglomerulares dos rins em resposta a situações de hipovolemia e/ou hipotensão. Em nível de circulação, a renina age sobre o angiotensinogênio formando a angiotensina I, que por sua vez sofre a ação da Enzima de Conversão da Angiotensina I (ECA) produzindo a angiotensina II, um peptídeo biologicamente ativo (RIGATTO; BOHLKE; IRIGOYEN, 2004). A angiotensina II atua via ativação dos receptores AT1 o qual, estimula uma série de respostas no nível intracelular incluindo a mobilização de cálcio, estimulação na troca Na^+/H^+ , metabolismo do fosfato, promovendo vasoconstrição. Além disso, a angiotensina II promove a produção de aldosterona pelas glândulas adrenais, acarreta no aumento da reabsorção de sódio e água pelos túbulos distais do sistema renal e, conseqüentemente, elevação da volemia (CAREY; SIRAGY, 2003; QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013). O quadro 1 mostra os principais mecanismos envolvidos no aumento da pressão arterial e a intervenção nutricional na modulação dos fatores fisiopatológicos evidenciados.

O sódio é um minfoil que atua na regulação osmótica dos fluidos corporais pelos rins, além de aumentar a condução de estímulos nervosos e contração muscular influenciando no aumento da pressão arterial (MOLINA et al., 2003). Segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) o consumo modificado de sódio é considerado um meio de prevenção primária não medicamentosa da HAS. Por outro lado, alimentos que atuam na regulação dos fluidos corporais e na reatividade vascular são apresentados como adjuvantes no controle da HAS, a exemplo do chuchu (*Sechium edule*) cujo efeito vasorrelaxante obtido do extrato hidroalcoólico da raiz desta planta foi descrito em teste pré-clínico (EKPENYONG, AKPAN, DANIEL, 2014), o uso da polpa e da casca dos frutos desta espécie vegetal levaram a diminuição da pressão arterial de usuários em Minas Gerais (COSTA, 2011). Outras espécies vegetais são apontadas como atuantes no controle da hipertensão, como o hibiscus, *Hibiscus sabdariffa* (JESUÍNO, 2013), erva-cidreira, *Lippia Alba* (CUNHA et al., 2013) e o campim-santo, *Lippia Alba* (MAYNARD et al., 2013).

Quadro1- Mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial sistêmica e sua medida nutricional atenuante.

MECANISMOS	CONSEQUÊNCIAS	INTERVENÇÃO NUTRICIONAL
Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) hipofunção	Aumenta da volemia, atividade simpática e vasoconstrição	Diminuir a ingestão de sódio
Barorreflexo diminuído	Ausência de feedback negativo quando a pressão arterial aumenta	
atividade simpática aumentada	Vasocostricção	
Espécies reativas de oxigênio (EROS) com produção exacerbada	Vasocostricção e aumento da atividade simpática	Consumir alimentos antioxidantes
Função endotelial deficiente , com produção ou biodisponibilidade diminuída de fatores vasorelaxantes	Diminui a capacidade vasodilatadora	Consumo de alimentos ricos em L-arginina e L-citrulina, precursores de NO (óxido nítrico)
Agentes inflamatórios	Aumento da atividade simpática e disfunção endotelial	Consumo de alimentos anti-inflamatórios

Fonte: Adaptado de Toscano (2014).

Enquanto o comprometimento da atividade barorreflexa é apontado como um dos maiores determinantes do aumento da variabilidade da pressão arterial em sujeitos hipertensos (SILVA et al., 2007). Esses indivíduos apresentam uma menor despolarização dos barorreceptores, mesmo diante de níveis elevados de pressão arterial (CONSOLIM- COLOMBO; FIORINO, 2005). Como resultado, a redução reflexa da pressão arterial deixa de ocorrer mantendo estes sujeitos com seus níveis pressóricos elevados permanentemente.

Alterações nas respostas cardiovasculares encontradas na HAS estão associadas a disfunções na atividade dos reflexos cardiovasculares (barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares), no sistema nervoso autônomo ou em ambos, uma vez que esses reflexos estão envolvidos na modulação da atividade autonômica simpática (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; IRIGOYEN et al., 2005).

Não se conhece alguma medida nutricional que restaure a função barorreflexa. Entretanto, o efeito da hiposensibilidade barorreflexa é um estado sustentado de maior atividade autonômica simpática (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; IRIGOYEN et al., 2005). Equanto isso, sabe-se que alimentos como uva e derivados e consumo modificado de álcool resultam em diminuição da atividade nervosa simpática em humanos (DAL; BOSCO, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) também desempenham respostas moduladoras na função cardiovascular. Tratam-se de pequenas moléculas de oxigênio utilizado na respiração, que sofrem oxidação e perdem o balanço usual de elétrons, tendo como característica a instabilidade química e a capacidade de desestabilizar moléculas em sua proximidade (NOWOTNY; et al., 2015; BECKMAN; AMES, 1998). Essas podem ser classificadas em espécies radicalares, como superóxido (O_2^-) e hidroxil (HO^-), e em não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOHEN; NYSKA, 2002).

Vários sistemas são afetados pela ação das EROS, incluindo o cardiovascular, renal e nervoso, seja de forma direta ou através da depleção do óxido nítrico. Os efeitos dessas espécies, a nível cardiovascular incluem indução a contração, com degradação do óxido nítrico, disfunção endotelial e remodelação hipertrófica dos vasos sanguíneos; já nos rins promovem a reabsorção de sódio, decréscimo da filtração glomerular e dano tecidual; enquanto no sistema nervoso aumentam a atividade simpática (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2004). Desta forma, essas alterações na estrutura e função vascular

induzem a redução na vasodilatação, aumento da vasoconstrição, inflamação vascular e remodelação estrutural provocando aumento da resistência periférica e, consequentemente, da pressão arterial (WILCOX, 2005).

Enquanto isso, vários alimentos são apresentados na literatura pelo seu potencial antioxidante, a exemplo da uva cujo polifenóis apresenta importante ação cardioprotetora (DAS; MUKHERJEE; RAY, 2010), os vegetais, legumes, frutas, nozes, sementes, cereais, peixes e azeite de oliva apresentados na dieta do mediterrâneo, associam-se a efeitos benéficos nos níveis pressóricos devido aos compostos de ação antioxidantes presentes nesses alimentos. (TOLEDO, 2013; (TRICHOPOULOU; VASILOPOULOU, 2000).

Sabe-se que uma dieta equilibrada é capaz de oferecer alimentos ricos em compostos antioxidantes, capazes de modular a ação dos EROS e o processo inflamatório sistêmico. Corroborando com estudos anteriores, Bezerra (2014) em seu estudo de revisão apresenta alimentos ricos em vitamina C, vitamina E e beta carotenos, os quais agem como seqüestrantes de espécies reativas de oxigênio, além de atuar na redução da disfunção endotelial em homens com histórico de doenças cardiovasculares ou diabetes (WANNAMETHEE et al., 2006).

A inflamação sistêmica é uma condição envolvida na etiologia da HAS, assim como na maioria das doenças cardiovasculares (PARK; CHARBONNEAU; SCHIFFRIN, 2001; MONNINK et al., 2002). O tecido adiposo, especialmente, a gordura visceral é uma importante fonte produtora de citocinas pró-inflamatórias (KERSHAW; FLIER, 2004) que provocam a disfunção endotelial contribuindo assim, para o desenvolvimento da hipertensão (LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2013). A inflamação também pode ser decorrente do excesso de EROS que atuam modulando a transcrição de genes que codificam citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão desencadeando o processo inflamatório (LUM; ROEBUCK, 2001).

Os ácidos graxos poli-insaturados; ácido linoleico (ω -6) e ácido α -linolênico (ω -3), quando metabolizados formam outros poli-insaturados como ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA), e ácido docosahexaenoico (DHA; ω -3) respectivamente. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do ω -3 à saúde, sua atividade anti-inflamatória é representada pela capacidade de reduzir a síntese de derivados do ácido araquidônico, as prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4 (LTB4), no metabolismo lipídico, diminui a concentração de colesterol total e LDL, ação vasodilatadora e redução da

incidência de aterosclerose, atividade anticoagulante e antiagregante (KREMER, 2007; MESQUITA et al., 2011). Os alimentos ricos em α -linolênico são os óleos de linhaça, canola e peixes (CALDER, 2003; JAMES; GIBSON; CLELAND, 2007).

Os próprios vasos também controlam a pressão arterial através da produção de substâncias tanto vasoconstritoras (endotelinas, endoperóxidos cíclicos - prostaglandina e tromboxano, angiotensina II e EROS), quanto vasodilatadoras (prostaciclina, fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio e óxido nítrico) (BATLOUNI, 2001). Destas, o óxido nítrico (NO) é a substância com maior potencial de controle da pressão arterial, a nível endotelial (GILES et al., 2012). No endotélio, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase, em resposta a estímulos fisiológicos, como a ação do mensageiro químico a acetilcolina (Ach) que ligando-se a receptores específicos da célula endotelial, promovem a abertura dos canais de cálcio, promovendo a contação, logo o óxido nítrico produzido difunde-se da célula endotelial para a célula muscular, onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC), causando aumento nos níveis de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). O aumento nos níveis de cGMP diminui a quantidade de Ca^{2+} livre na célula muscular, causando sua relaxação (BRUNNER et al., 2005). Além da função vasodilatadora, o NO exerce importante ação protetora vascular, por inibir a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas (CARVALHO et al., 2001).

Diversos nutrientes têm sido demonstrados como capazes de aumentar a produção de NO, com consequente aumento da capacidade vasodilatadora. Dentre eles, o aminoácido L-arginina quase dobrou a concentração de nitrito/nitrato plasmático, fenômeno este acompanhado por significativa redução da pressão arterial (LIMA, 2009). Enquanto isso, alguns estudos demonstraram que a ingestão de melancia também foi capaz de reduzir a pressão arterial, aumentar a capacidade vasorrelaxante e a produção de NO em humanos (FIGUEROA et al., 2010 COLINS, 2007).

2.4 MECANISMOS DA CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO EM MÚSCULO LISO

Com base nos achados de estudos prévios os quais utilizaram diferentes espécies do gênero *Hymanae* em experimento *in vitro*, na musculatura lisa de traquéia e íleo (BEZERRA et al., 2013; RODRIGUES ORSI et al., 2012) assim como, a escassez de estudos com modelos *in vivo*, compreendemos a necessidade de avaliar o efeito de outra espécie do gênero o *Hymanae* em músculo liso de vaso sanguíneo. De fato, vários

estudos têm utilizado como modelo experimental a musculatura lisa vascular (BRITO, 2014; SILVA, 2009), buscado identificar estratégias terapêuticas no tratamento das diversas patologias que acometem as doenças cardiovasculares.

Para que ocorra a contração do músculo liso deverá existir um aumento na concentração de cálcio no citoplasma da célula muscular ($[Ca^{2+}]_c$) este íon pode ser originado do meio extracelular, que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV) (CATTFOILL, 2011), e outra intracelular, representada pelos estoques intracelulares, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS), que libforam Ca^{2+} para o citosol (MA; PAN, 2003). O cálcio presente no citosol foi ligado a proteínas específicas, desencadeando diversos processos intracelulares, dentre estes a fosforilação da cadeia leve de miosina que foi ligada aos filamentos de actina, promovendo a contração muscular (WEBB, 2003).

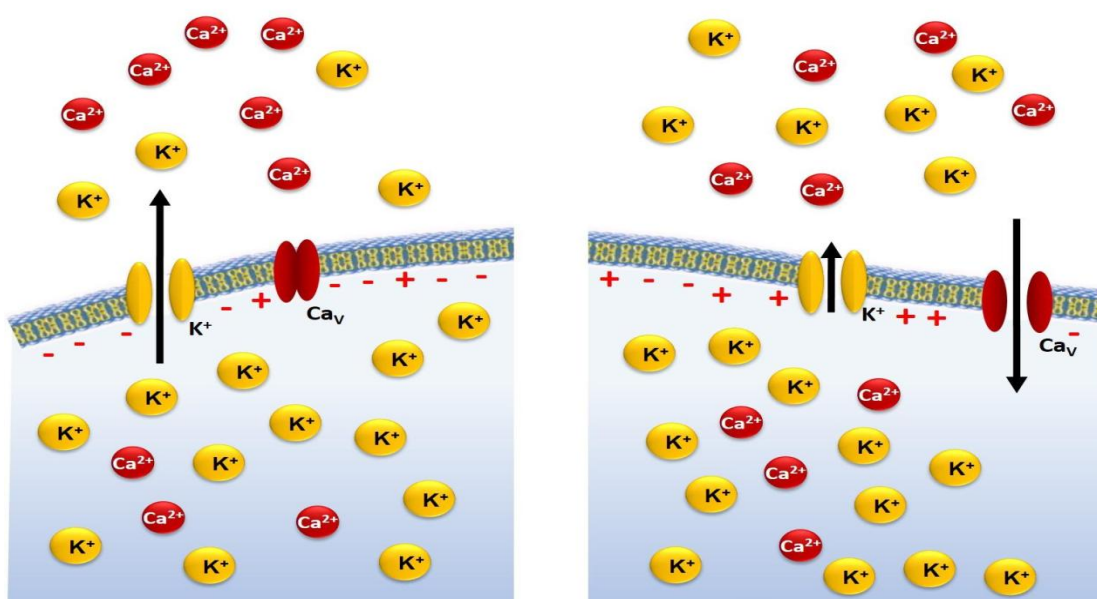
A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_c$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois tipos de acoplamentos: um acoplamento eletromecânico, que envolve a mudança de potencial de membrana (V_m) e outro acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do V_m . O acoplamento eletromecânico leva a resposta contrátil através da despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) (Figura 5) ou a ligação de bloqueadores dos canais de K^+ (REMBOLD, 1992).

Por outro lado, o mecanismo fármaco-mecânico da contração ocorrem quando um agonista como fenilefrina, angiotensina II e adrenalina, ligam-se a seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína G_q ou G_{11} , cujas suas subunidades α ativam a fosfolipase C $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) e consequentemente promovem hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), produzindo o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 2008; BILLINGTON; PENN, 2003).

O IP₃ induz a libfoição de Ca^{2+} do RS por ativar os receptores de IP₃ (IP₃R) e o DAG ativa a proteína cinase dependente de Ca^{2+} (PKC), que, por sua vez, leva a um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ através da ativação direta dos CaV ou, indiretamente, por inibição de canais de K^+ presentes na membrana plasmática (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O aumento na $[Ca^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} com a proteína CaM, formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Este complexo ativa a

cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), a qual fosforila a cadeia leve regulatória da miosina (rMLC), promovendo a intfoição dos filamentos de miosina com os de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (Figura 6) (WEBB, 2003).

Figura 5 - Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



Legenda: Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; 2. um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração. Fonte: SOUZA, 2014.

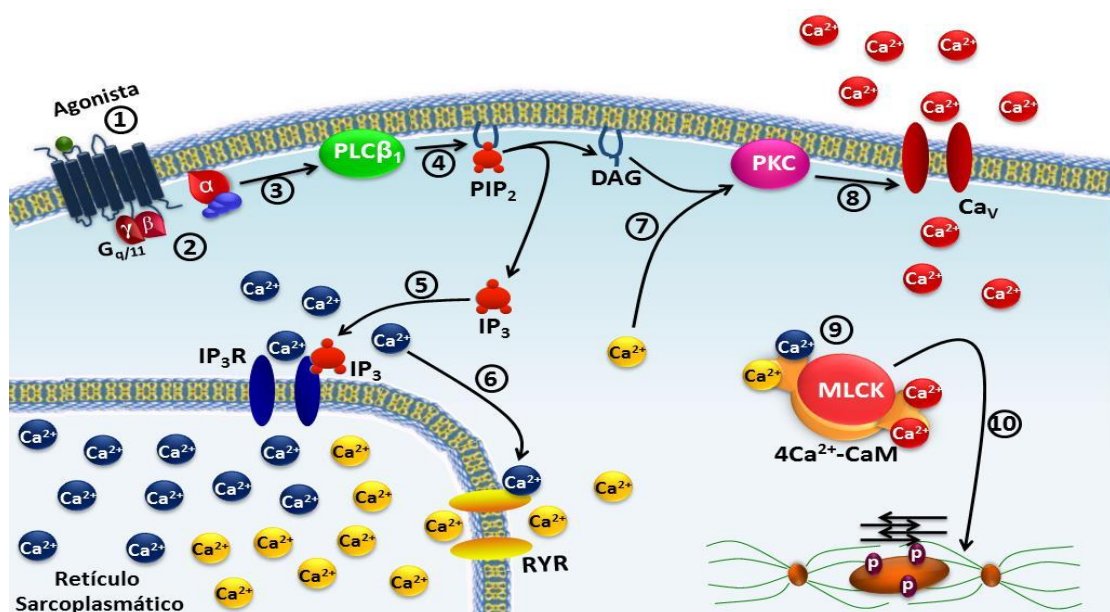
Se o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ gfoi a contração muscular, logo, o relaxamento ocorre por diminuição dos níveis deste íon no meio citosólico (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esta diminuição na $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer por um acoplamento eletromecânico, caracterizado pela repolarização ou pela hiperpolarização da membrana, ou ainda, pelo acoplamento fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O acoplamento eletromecânico que leva ao relaxamento envolve a abertura de canais de K^+ , que desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso

depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ , gerando uma repolarização/hiperpolarização. Além disso, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por substâncias que abrem diretamente os canais de K^+ , como, por exemplo, a cromacalina, a levocromacalina e o nicorandil e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de K^+ da célula (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

O acoplamento fármaco-mecânico que leva ao relaxamento envolve a fosforilação, via proteína cinase dependente de cAMP (PKA) ou de cGMP (PKG), de vários substratos, ocasionando: (1) o aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando, assim, o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; (2) a inativação do IP₃R, pela PKG, reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS; (3) diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} ; (4) a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo 4 Ca^{2+} -CaM, causando uma redução nos níveis de rMLC fosforilada e, dessa forma, do processo contrátil; (5) a inibição direta dos CaV, causando uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} e (6) a ativação de canais de K^+ que, por hiperpolarização, bloqueiam os CaV (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Figura 6 - Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via Gq/11-PLC β 1



Legenda: O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2. levando a troca do GDP por GTP na subunidade α das proteínas Gq/11 (não mostrado na figura), tornando-se ativa; 3. a subunidade α q/11-GTP ativa a enzima PLC β 1; 4. a PLC β 1 cliva o fosfolipídio de membrana PIP2 em IP3 e DAG; 5. o IP3 migra pelo citosol e ativa o IP3R presente no RS, libfoindo o Ca²⁺ do estoque; 6. o Ca²⁺ libfoido ativa o RyR, fazendo com que mais Ca²⁺ seja libfoido para o citoplasma; 7. o Ca²⁺ junto com o DAG ativam a PKC; 8. a PKC ativada fosforila os CaV promovendo o influxo de Ca²⁺; 9. o aumento da [Ca²⁺]_c aumenta a afinidade do Ca²⁺ pela CaM formando o complexo4 Ca²⁺-CaM e ativando a MLCK; 10. a MLCK ativada fosforila a rMLC que intfoige com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto. Fonte: CORREIA, 2013.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo é caracterizado como experimental, pré-clínico, do tipo controlado e randomizado.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Inicialmente foi feita a caracterização do extrato hidroalcoólico da casca e da polpa do *Hymenae rubriflora Ducke* para determinação dos compostos fenólicos E capacidade antioxidante. Em seguida, foram realizados procedimentos de toxicidade e teste *in vitro* para avaliar a ação do extrato sobre a reatividade vascular de aorta torácica de ratos Wistar. Tendo sido constatada ausência de toxicidade e ocorrência de reatividade da artéria aorta ao extrato, procedeu-se um protocolo de suplementação de ratos Wistar. Após 30 dias de suplementação, os animais foram eutanasiados, amostras de sangue foram coletadas para posterior análise de ação antioxidante e do perfil glicídico/lipídico e a artéria aorta foi removida para ensaios de reatividade vascular a agentes relaxantes e contráteis.

3.3 PRODUTO TESTE

A espécie *Hymanea rubriflora Ducke* foi coletada no Município de Cuitégi no Estado da Paraíba no período de Agosto de 2015 e posteriormente foi realizada a identificação botânica da espécie. Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Profº Lauro Pires Xavier (JPB)/UFPB sob o código de identificação JPB nº 61262.

3.3.1 Obtenção e preparo do extrato da casca do caule e da polpa do fruto de jatobá

A casca do caule foi previamente aquecida em estufa por 50°C durante 5 dias, em seguida, as cascas foram submetidas ao processo de trituração utilizando

inicialmente um “mixer” comercial seguido de trituração em cuba de porcelana, para então se obter um produto final com partículas homogêneo abaixo de 0,35 mm, equivalente a 20g. Com o material homogeneizado a amostra foi levada a extração usando como solvente uma mistura de etanol-água (1:1) levada ao agitador por 2 horas sob agitação de 200 força g. Após o período de extração, o material foi filtrado à vácuo em papel de filtro comum para retirada do material particulado restando o extrato solubilizado no solvente extrator conforme metodologia empregada por Bezerra et al (2013).

Para a obtenção do extrato seco a solução extrativa foi levada a rota evaporação a 45°C até que o volume fosse reduzido à metade do volume inicial da mistura de extração, obtendo-se rendimento de 25%. Em seguida, o extrato livre de etanol e água foi congelado em freezer – 80°C por 24 horas e posteriormente liofilizado a 0,024 mBar por 24 horas, obtendo-se por fim o extrato seco, caracterizado como extrato hidroalcoólico da casca do caule do *Hymenae rubriflora D* (HR-HAc), conservado em freezer comum à – 22°C até a utilização nos experimentos.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO

O teor de fenólico total foi determinado, pelo método colorimétrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), com modificações. Alíquotas de 240 µL dos extratos diluídos foram misturados com 60 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, 180 mL de uma solução de carbonato de sódio a 15% e água destilada até completar o volume de 3 mL. A mistura reacional foi mantida em repouso por 2 horas, em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada leitura a 760nm em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2550, UV-Vis. Uma curva padrão de ácido gálico (de 2,5 a 25 mg / L) foi obtida, utilizando as mesmas condições. Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de ácido gálico de ácido gálico (GAE) por grama de extrato em mg (GAE/ g) ($r^2 = 99,39$).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH. Em triplicata, alíquotas da amostra (5 mg.mL^{-1}) foram misturadas com etanol e $2.700 \mu\text{L}$ da solução de DPPH•. Após 30 minutos em banho, protegido da luz e a temperatura ambiente, foi efetuada a leitura a 517 nm, em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550. Uma curva controle foi preparada utilizando trolox ($0,5$ a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como padrão. Os resultados foram expressos em mmol Trolox por grama do extrato seco (mmolTrolox/g extrato).

3.6 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Para os estudos de toxicidade, ensaio *in vitro* e suplementação, foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB. Os animais foram mantidos em caixas com dois animais cada, ad libitum alimentar com uma dieta balanceada, livre, a base de ração (Presence[®]), livre acesso à água, com ventilação e temperatura ($21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo operíodo claro das 06h00 às 18h00.

Todos os animais, incluindo o grupo controle, receberam ração padrão (Presence[®] ratos e Camundongos) composto por 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibras e 12% de minfoiis. O acompanhamento do peso total foi definido pela subtração entre o peso inicial e o peso final expresso em gramas. O consumo de água e ração, foi medido pela diferença obtida entre a ração e água ofertado e o consumo semanalmente. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais “Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies” (SHERWIN et al., 2003), submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CBiotec (CEUA/CBiotec), certidão 010/15 (Anexo 1).

3.7 SUBSTÂNCIAS E SOLUÇÕES NUTRITIVAS

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de potássio (KCl) e o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). A glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o ácido clorídrico (HCl) e o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram adquiridos da Nuclear (Porto Alegre-RS, Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido da Dinâmica (Diadema-SP, Brasil). O cloridrato de acetilcolina (ACh) foi obtidos da Merck (Brasil). A Fenilefrina (FEN) foi obtido da Pfizer (EUA). A aminofilina, aindometacina, e o L-arginina metil éster (L-NAME) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (1:250) foi adquirido da Bio Técnica-Biotecnologia Avançada (Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

Para todos os experimentos realizados, foi utilizada a solução nutritiva de Krebs (ajustada ao pH 7,4 com solução de HCl ou NaOH 1N), e mantidas a 37°C , cuja composição está descrita na Tabela 1.

TABELA 2: Solução de Krebs

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH_2PO_4	1,1
MgSO_4	5,7
CaCl_2	2,5
NaHCO_3	25,0
Glicose	11,0

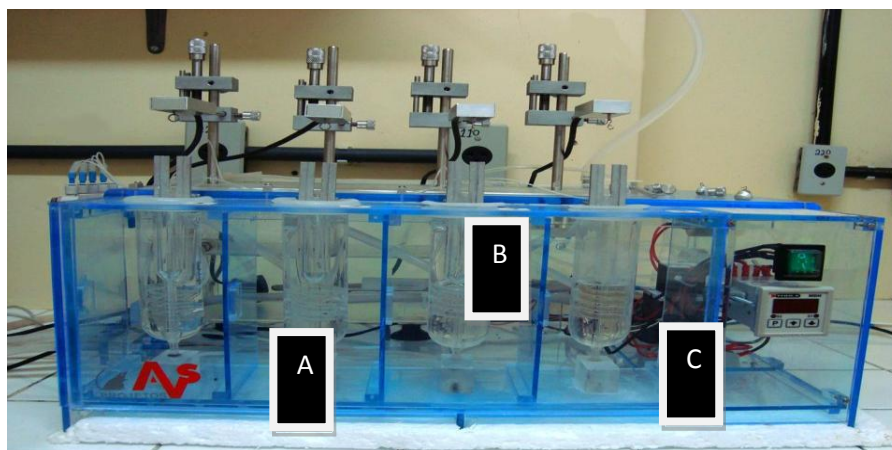
3.7.1 Equipamentos Utilizados

Para o registro das contrações isométricas, os órgão foram suspensos em cubas de banho (6mL) para órgão isolado (Figura 9A), modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM-05 (Figura 9 B) acoplados a um

amplificador modelo AECAD 04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital como "software" AQCAD versão 2.1.6 para obtenção dos dados e "software" ANCAD para análise (Figura 8). O sistema continha uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas (Figura 7 C). Todos os aparelhos foram adquiridos junto à empresa AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de pH foram verificados através de um pHmetro digital PG2000GEHAKA (São Paulo-SP, Brasil) e todas as substâncias foram pesadas em balança analítica modelo AG 200 GEHAKA (São Paulo-SP, Brasil). Os animais foram pesados em balanças analítica GEHAKA (São Paulo-SP, Brasil).

FIGURA 7: Sistema de banho para órgãos isolados composto por cubas (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C).



Fonte: Própria.

Nos estudos bioquímicos para a separação do produto do plasma foi utilizada a centrífuga modelo 80-2B-15ML da CENTRIBIO[®] (Guarulhos-SP, Brasil) sendo a leitura das absorbâncias para o malondialdeído, superóxido desmutase e nitrito obtidas no espectrofotômetro ultravioleta modelo SP-220 da Biospectro (Curitiba-PR, Brasil). A leitura da absorbância da creatina cinase, lactato desidrogenase foi obtida através do analisador automático (FIGURA 10) Labmax 240 premium da Labtest (Lagoa Santa-MG, Brasil).

FIGURA 8: Amplificador (A) e do microcomputador (B)



Fonte: MONTEIRO, 2013.

FIGURA 9: Analisador automático Labmax240 premium da Labtest



FONTE: <www.labtest.com.br/equipamentos/labmax240>

3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

3.8.1 Preparação da solução-estoque

O HR-HAc foi solubilizado em Cremophor® (3%v/v) e diluído em água destilada até a concentração de 10 mg/mL. Essa solução foi preparada diariamente, uma vez que óleos essenciais caracterizam-se pela presença de compostos voláteis. De

acordo com a necessidade de cada protocolo experimental as soluções foram novamente diluídas em água destilada. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v); nessa concentração, o Cremophor[®] é desprovido de efeito relaxante ou contrátil significativo em íleo de cobaia, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (dados não mostrados). As concentrações do extrato foram utilizadas em múltiplos de 3 afim de se obter as concentrações que produzissem os efeitos mínimo e máximo (Emax).

3.8.2 Avaliação do efeito do HR-HAc sobre o tônus vascular da aorta isolada de rato

Seis ratos foram eutanasiados com quilhotina em seguida foi realizado o isolamento da artéria aorta torácica por laparotomia, e os anéis aórticos de 3-5 mm foram obtidos livres de tecido conjuntivo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente por uma haste de aço inoxidável em cubas para banhos de órgãos isolados (6 mL) contendo solução de Krebs normal a 37 °C. As preparações foram estabilizadas por um período de uma hora, durante o qual foram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva foi renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos. A integridade do endotélio vascular foi verificada pela adição de 10^{-6} M de ACh à cuba durante a fase tônica da primeira resposta induzida por FEN (3×10^{-7} M) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentassem relaxamento induzido por ACh superior a 50% (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). A retirada do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de ACh à cuba ou quando este relaxamento foi inferior a 10%. Apenas os anéis com endotélio funcional foram utilizados para a realização dos protocolos, exceto para os protocolos experimentais que foram utilizados os anéis com e sem endotélio.

Após a lavagem das preparações, esperava-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, a HR-HAc foi adicionada, de maneira cumulativa à cuba para obtenção da curva controle. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN. Os valores de CE₅₀ foram obtidos como e comparados na ausência e na presença do endotélio.

3.8.3 Pré contração com fenilefrina e curva de relaxamento do HR-HAc com L-NAME

Para avaliar a influência do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi utilizado o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) o N - nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Após o teste de integridade do endotélio e posterior ao retorno da tensão de repouso, com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico no efeito do HR-HAc sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração- resposta à FEN, após incubação com 100 μ M de L-NAME e após incubação conjunta de L-NAME e HR-HAc.

3.8.4 Análise da participação dos prostanóides na resposta contrátil à fenilefrina

Com o objetivo de estudar a influência dos prostanóides da via da ciclooxigenase na vasoconstrição induzida pela fenilefrina, foi utilizado o fármaco Indometacina (10 μ M) um anti-inflamatório inibidor da ciclooxigenase. Assim, para avaliar a participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase no efeito do HR-HAc sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina após incubação com os fármaco descrito independentemente e após incubação conjunta do mesmo com HR-HAc. Este fármaco foi adicionado à preparação 30 minutos antes do início da curva de fenilefrina.

3.9 PROTOCOLO DE TOXICIDADE

Foi realizado o protocolo de toxicidade aguda do extrato hidroalcolólico da casca do *Hymenae rubriflora* D., seguindo as recomendações da Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF (2013) e OECD (2001).

Dessa forma, os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou

mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (GESEF, 2013).

Foram utilizados 31 ratos, machos com 16 semanas de idade e pesando entre 350 e 500 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB).

Iniciou-se o protocolo com 3 animais do mesmo sexo, aplicando-se a dose de 2000 mg/kg de peso corporal. Segundo as recomendações da OECD (2001). Os animais estavam em jejum antes da administração da dose, e após a gavagem com o extrato, a comida foi suspensa de 3 a 4 horas, porém a água só ficou suspensa por 4 horas antes o início do protocolo (OECD, 2001).

O período de observação dos animais foi de 14 dias após a administração da substância teste, entretanto no dia da administração os animais foram observados duas vezes ao dia e uma vez ao dia nos dias posteriores.

As observações foram voltadas as alterações na pele e pêlos, olhos e mucosas, aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central, da atividade motora e de comportamento. A atenção foi dirigida à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma (Anexo 2).

3.10 PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO COM HR-HAc

Considerando uma concentração de compostos fenólicos bem maior no extrato da casca do caule em relação ao extrato da polpa (vide resultados), o estudo prosseguiu com um protocolo de suplementação somente com o extrato da casca do caule HR-HAc. Para isso, 32 ratos foram randomizados em quatro grupos com diferentes doses do extrato, conforme descrito:

- GC (n=8): ração padrão e gavagem com solução salina
- G 25 (n=8): extrato da casca do *Hymanaeae rubriflora D.* (25mg/kg)
- G50 (n=8): extrato da casca do *Hymanaeae rubriflora D.* (50mg/kg);
- G100 (n=8): extrato da cascado *Hymanaeae rubriflora D.* (100mg/kg);

O número de animais foi estimando pela média de animais utilizados em

experimentos com protocolos semelhantes, assim como as doses de administração do extrato (BEZERRA et al., 2013). Considerando que o estudo relacionado encontrou efeito relaxante em traqueia de animais hiperresponsivos na dose de 150 mg/kg.

Os animais foram suplementados via gavagem de 1 mL/kg diariamente, sempre às 12h. O protocolo da suplementação durou 30 dias. Os animais do grupo controle receberam também por gavagem, igual volume de solução salina

3.10.1 Eutanásia e coleta do material biológico

Vinte e quatro horas depois da última dose de suplementação, os animais foram eutanasiados com auxílio de uma guilhotina, Imediatamente após este processo, foi feita retirada do sangue por punção cardíaca, sendo o sangue, colocados em tubos seco com anticoagulante (EDTA), e então centrifugado a 3000 força g por 15 minutos e o sobrenadante retirado e congelado à -80° C até as análises. Posteriormente, 2 mL do sangue coletado foram colocados em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) (obtenção do plasma) para as análises de Malondialdeído (MDA), Capacidade antioxidante total (CAT), perfil lipídico, glicose e nitrito (NO) (OKAFOR et al., 2011).

3.10.2 Efeito da suplementação com HR - HAc sobre a curva cumulativa de contração à FEN em aorta isolada de rato

A integridade do endotélio foi verificada como descrito no item 3.8.2, em seguida, as preparações foram lavadas e após 30 min, foi induzida uma curva concentração-resposta cumulativa à fenilefrina (10^{-9} - 10^{-3} M) em anéis aórticos de rato de todos os grupos (JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009).

Os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil da aorta de rato com e sem endotélio funcional dos grupos suplementados com HR-HAc com aquela obtida pela mediada da amplitude máxima das curvas controle.

A reatividade da aorta de rato foi avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logaritmo negativo na base dez da concentração de uma substância que

produz 50% do seu efeito máximo (pD₂) da FEN, para os grupos tratados comparados como grupo controle.

3.10.3 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa de relaxamento em aorta isolada de rato

A integridade do endotélio foi verificada como descrito no item 3.8.2 e em seguida, as preparações foram lavadas e, após 30 min, uma nova contração com 3×10^{-7} M de FEN foi induzida e durante o componente tônico da contração, a ACh (10^{-11} – 10^{-4} M) foi adicionada de maneira cumulativa à cuba (HEYLEN et al., 2008) em preparações aórticas de todos os grupos.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN, e os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante da aorta de rato com endotélio funcional dos grupos tratados com aquela obtida nos grupos controle. A reatividade em aorta de rato foi avaliada pela determinação do E_{max} e do PD₂ da ACh, para os grupos tratados com HR-HAc e comparados como grupo controle.

3.10.4 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa à fen em aorta isolada de rato, na ausência e na presença de L-NAME

A integridade do endotélio foi verificada como descrito no item 3.8.2. Em seguida, as preparações foram lavadas e, após 30min, o órgão foi pré-incubado com L-NAME (10^{-4} M), inibidor competitivo da sintase de óxido nítrico (NOS) (REES et al., 1990; GUEDES et al., 2004; JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009), por 30min e em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa à fenilefrina (10^{-11} – 10^{-3} M) foi induzida em preparações aórticas de todos os grupos.

Os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil da aorta de rato com endotélio funcional dos grupos tratados com HR-HAc com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle, na ausência e na

presença de L-NAME, sendo avaliados os valores de E_{max} e do pD_2 da fenilefrina como parâmetros de eficácia e potência, respectivamente.

3.10.5 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a curva cumulativa à nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta isolada de rato

A integridade do endotélio foi verificada como descrito no item 3.8.2 e em seguida, as preparações foram lavadas e, após 30 min, uma nova contração com 3×10^{-7} M de FEN foi induzida. Posteriormente, após terem sido reestabilizadas as curvas de concentração foram obtidas com NPS nas concentrações 10^{-12} a 10^{-4} M.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversada contração induzida por NPS, e os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante da aorta de rato dos grupos tratados com aquela obtida nos grupos controle.

A reatividade em aorta de rato foi avaliada pela determinação do E_{max} e do pD_2 do NPS, para os grupos tratados com HR-HAc e comparados como grupo controle.

3.11 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

3.11.1 Avaliação de nitrito no plasma

A concentração plasmática de nitrito foi determinada pelo método de Griess, proposto por Green, et al. (1981). Para isso, o reagente de Griess foi preparado utilizando partes iguais de ácido fosfórico 5%, N-1-naftilenodiamina (NEED) 0,1% e sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e água destilada. Para a realização do ensaio, foram adicionados 500 μ L do plasma em 500 μ L do reagente de Griess, após 10 minutos e a leitura foi feita na faixa de absorvância de 560 nm. Para o branco foram adicionados 100 μ L do reagente em 100 μ L de tampão de fosfato de potássio 10%, e para a obtenção da curva do padrão foram feitas diluições em série (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 μ M) de nitrito de sódio ($NaNO_2$).

3.11.2 Avaliação das concentrações de malondialdeído -MDA

Para identificar as possíveis alterações da matriz lipídica e das membranas celulares decorrentes do efeito indireto da produção de espécies reativas de oxigênio, utilizou-se a técnica da medida de produção de malondialdeído (MDA) proposta por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). A técnica consiste na quantificação da atividade oxidante por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

A determinação da concentração de MDA em cada amostra de plasma foi feita por substituição dos valores de absorbância na curva-padrão de MDA, obtida em função de uma solução padrão (1 µL de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em 70 mL de água destilada) diluída em séries de 250; 500; 750; 1000; 1250; 1500; 1750; 2000; 2250; 2500; 2750 e 3000 µL de água destilada.

3.11.3 Capacidade antioxidante total (DPPH) do plasma

O procedimento foi baseado no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) na qual a alíquota de 1,25 mg de DPPH que foi diluída em 100 mL de etanol, mantida sobre frigifoção e protegida da luz (com papel alumínio ou vidro âmbar). Em tubos apropriados para centrifuga foram adicionados 3,9 mL da solução de DPPH em seguida acrescentou-se 100 µL do plasma obtidos conforme o item acima. Os tubos foram agitados no vórtex e deixados em repouso por 30 minutos. Em seguida foram centrifugados a 10.000 força g à temperatura de 20°C por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a realização da leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da oxidação, onde:

$$AOA = 100 - ([DPPH \cdot R]_T / [DPPH \cdot R]_B \cdot 100)$$

Sendo $[DPPH \cdot R]_t$ e $[DPPH \cdot R]_B$ correspondentes à concentração de DPPH• remanescente após 30 minutos, avaliadas na amostra (T) e no branco (B) preparado com água destilada.

5.11.4 Análise de perfil lipídico e glicêmico

Lipoproteínas, triglicerídeos e glicose foram analisadas através de um kit comercial da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Para o colesterol total, um volume de 10 µl de amostra foi adicionado a 1 mL do reagente de trabalho utilizando-se tubos ependorfs. Em seguida os tubos foram colocados em banho Maria por 10 minutos. Finalmente, foi feita a leitura em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220/Brasil), com um comprimento de onda de 500 nm. Para análise do colesterol HDL, 250 µl da substância precipitante fornecida com o kit foi adicionado a 250 µl de amostra em tubos de ensaio. Em seguida, este preparo foi centrifugado a 3.500 força g por 20 minutos. Imediatamente após a centrifugação, o soro contendo apenas HDL foi retirado e colocado em tubos ependorfs. A partir deste momento, o mesmo procedimento e reagente já descrito para análise do colesterol total foram utilizados. Para avaliação dos triglicerídeos, 10 µl de amostra foram adicionadas a 1 mL do reagente de trabalho e incubados em banho Maria à 37 °C por 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura em comprimento de onda de 505 nm. Para determinação da concentração de glicose, 10 µl de amostra foram adicionados a 1 mL de reagente de trabalho e incubados a 37° por 5 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 340 nm.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média mais desvio padrão para composição de fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos e o erro padrão da média (e.p.m.) para as análises de reatividade vascular. As diferenças entre as médias foram comparadas estatisticamente utilizando o teste *t* independente para comparar os extratos hidroalcoólicos e quando CE_{50} e E_{max} foram comparadas entre dois grupos. Quando as comparações envolveram mais de dois grupos, foi adotado o teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, quando necessário. Para todos os testes, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} e pD_2 foram determinados por regressão não linear (Neubiget al., 2003). A análise estatística foi

realizada utilizando o GraphPad Prism[®] 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

REFERÊNCIAS

AJAYA, M.; GILANI, A.; MUSTAFAA, M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**. v. 129, p. 603–612, 2003.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1987.

ALVAREZ-CHAVEZ LM, VALDIVIA-LOPEZ MD, ABURTO-JUAREZ MD, Tecante A. Chemical characterization of the lipid fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). **Int J Food Prop**; v. 11, p:687–97, 2008.

AYDIN, Y.; et al., Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medical*, v. 73, p.1365-1371, 2007

BARRETO, S. M; et al. Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community in Southeast Brazil – The Bambuí Health and Ageing Study. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**; v.77, n.6 p:576-81, 2001.

BASTOS, J. F.; et al., M.R. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *BasicalClinical Pharmacology and Toxicology*, v. 106, p.331-337, 2010.

BATES, J. N. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol.*, v. 42, sup., p. S157-S165, Dec. 1991.

BEZERRA G.P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 149, p 62–69, 2013

BLOCH KV, RODRIGUES CS, FISZMAN R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. **Rev Bras Hipertens**. vol.13 n. 2 p: 134-143, 2006

BRAGA, F. C. et al. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v.6, n.6, p. 447-452, 2000.

BRANDÃO, R.M.; BRUM, P. C. Exercício físico como tratamento não farmacológico da hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**. v.10, p.134-139, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.* v 28 p: 25–3, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**. v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BRITO, Aline de Freitas. Treinamento de força e suplementação alimentar com *Spirulina platensis* modulam a reatividade vascular da aorta de ratos Wistar saudáveis dependente do no e da atividade antioxidante. 2014. 180 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Fedfoil da Paraíba, João Pessoa, 2014.

CATTFOILL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CAPITANI, V. SPOTORNO, S.M. NOLASCO, A.N.D.M. C. “Physicochemical and functional characterization of by- products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina,” **LWT—Food Science and Technology**, vol. 45, no. 1, pp. 94–102, 2012.

CHANG, Y. K.; et al. Development of Extruded Snacks Using Jatoba (*Hymenaea stignocarpa* Mart) Flour and Cassava Starch Blends. **Journal Science Food Agric.** v. 78, n.1, p. 59-66, 1998.

CHICCO, A. G. et al. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in a-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. **British Journal of Nutrition.** v.101, p.41-50,2009.

CHAO-YIN CHEN, ANN C. BONHAM; Postexercise Hypotension: Central mechanisms **Exerc Sport Sci Rev.**; v.38, n.3, p:122–127, July, 2010.

CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, ET AL. **Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** Hypertension, n. 42, p. 1206–52., 2003.

CORNELISSEN VA, BUYS R, SMART NA. Endurance exercise beneficially affects ambulatory blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J Hypertens.** Apr; v.31, n 4, p:639-48, 2013.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York* **Academy of Science.** v. 854, p. 435-42, 1998

CARTAXO, S.L., SOUZA, M.M.A., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** v.131, p.326–342, 2010.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DAS, D. K.; MUKHERJEE, S.; RAY, D. Resvfoitrol and red wine, healthy heart and longevity. **Heart Failure Reviews**, v.15, n.5, p.467–477, 2010.

DUTTA, K.; et al. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

FORJAZ CL, et al., Factors affecting post-exercise hypotension in normotensive and hypertensive humans. **Blood Press Monit**, 2000;

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288: 5789, p. 373-376, 1980.

GARG, M. L., WOOD, L. G., SINGH, H., & MOUGHAN, P. J. Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. **Journal of Food Science**, v. 71, p.66-71, 2006.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GERAIS, F. D. M. et al. Hipertensão arterial no Brasil : estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n. 1, p. 35-45, 2006.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981

HAGBERG, J. M.; PARK, J. J.; BROWN, M. D. The Role of Exercise Training in the Treatment of Hypertension. **Sports Med** v. 30, n.3, p.193-206, set., 2000.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro Del estilo de vida. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica**. v.18, n.1, p. 12-4, 1999.

HU, C.; et al, D. Determination of carotenoids in Dunaliella salina cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract . **Food Chemistry**, London, v. 109, p. 439-446, 2008.

IMAI, T., et al., K. Heartwood extractives from the Amazonian trees Dipteryx odorata, Hymenaea courbaril, and Astronium lecontei and their antioxidant activities. **Journal Wood Science**. v. 54, p.470-475, 2008.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular : regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

ISHIBASHI, M., et al. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants Hymenaea parvifolia and Wulffia baccata. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** . v.9, p.15, 2157-2160, 1999.

JARDIM, P. C. V. et al. Hipertensão arterial e alguns fatores de risco em uma capital brasileira. **Arq Bras Card**. v.88, n.4, p. 452-457, 2007.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (Hymenaea courbaril) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**. v. 105, p. 485-490, 2007.

JESUINO, C. V. Avaliação anti-hipertensiva e proteção da reatividade vascular do extrato de *Hibiscus acetosella* Welw ex Hiern. 2013 Trabalho de conclusão de curso em ciências farmacêuticas. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2013.

LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n.9, p. 852-860, 2004.

LESNIAK, K.T. et al. Exercise and hypertension. **Curr Opin Cardiol**; v.16 p:356-9, 2001

LATERZA, M. C.; RONDON, M.; NEGRÃO, C. E. Efeito anti-hipertensivo do exercício. **Rev Bras Hipertens**, v.14, n.2, p.104-111, 2007.

LLOYD-JONES D, et al., **Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee**. Circulation 2009.

LÓPEZ-JARAMILLO, P. et al. Inflammation and hypertension: are there regional differences?. **International Journal of Hypertension**, v.2013, p. 1-12, 2013.

MARINELI, R. D. S. et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1304–1310, dez. 2014.

MALTA, D.C. et al. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in Saúde Brasil. **Ministério da Saúde, Brasília**. 2009. p. 337–362.

MAGALHÃES, P. J. C.; et al. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 172-177, 1998

MODENA MG, et al., Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. **J Am Coll Cardiol**. 2002.

MONTES, L. V.; et al. G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 7, p. 61-67, 2009.

MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, 24: 1, 105-111, 2001.

MOLINA, M. C. B et al. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 743-50, 2003.

NEVES, M. F. et al. Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, p. 1-6, 2012

NOGUEIRA, R.T., GIACOMINI, R.A., SHEPHERD, G.J., IMAMURA, P.M. A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v13, p.389–391, 2002.

NOWOTNY K. et al., Advanced Glycation end Products and oxidative stress in type 2 Diabetes Mellitus. *Biomoleculares*. **Biomoleculares** vol.5 n.1 p:194-222; . 2015.

OLIVEIRA, A. Tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial . **Revista Bioquímica da Hipertensão**. São Paulo – SP, 2011.

OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **OECD guideline for testing of chemicals** nº 423, 2001.

OKAFOR, O.; et al. Modulatory effect of pineapple peel extract on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1. n. 1 p. 12-14, 2011

PAREDES-CARBAJAL, et al. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. **Life Sciences**, v.61, n. 15, p. 211-219, 1997

PAREDES-CARBAJAL, et al. Effects of the ethanolic extract of *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. **Journal of Ethnopharmacology**, L, v. 75, n. 1, p. 37-44, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D.; et al., Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 24, p.341-350, 2010.

PEIXOTO-NEVES, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 24, p.341-350, 2010.

POUDYAL, H. *et al.* Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. **J Nutr Biochem**.v.23,n.2, p.153-162, 2012.

QUEIROZ, T.M.; MONTEIRO, M.M.O.; BRAGA, V.A. Angiotensin –II derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n.105, p. 1-6, 2013.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

REYES-CAUDILLO, A. TECANTE, AND M. A. VALDIVIA-LOPEZ, “Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds,” **Food Chemistry**, vol. 107, no. 2, pp. 656–663, 2008.

RIGATTO, K. V.; BOHLKE, M.; IRIGOYEN, M.C. Sistema renina-angiotensina:

da fisiologia ao tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 3, 2004.

RODRIGUES ORSI et al. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**. vol.143 p: 81–90, 2012 .

ROSÁRIO, T.M., et al. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. **Arq Bras Cardiol**. v.93, n.6, p. 672–678, 2009.

ROVEDA F., et al., The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. **J Am Coll Cardiol**.; v.42, n.5, p:854-60, 2003.

SHERWIN, C. M.; et al. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, p. 291-305, 2003.

SALES A. C. C. Efeito de suplementação com aveia, linhaça, gergelim, semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus em ratos. 2011. 97f. Dissertação (mestrado em alimentos e nutrição). Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol** v.95, p.1-51, 2010.

SOUZA; Brito, A.R. **Manual de ensaios toxicológicos “in vivo”**. Ciências médicas. Unicamp, Campinas 15–22, 1994.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 37, n. 2, p. 127-35, 2003.

SINGLETON, V.L., ROSSI JR., J.A.,. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 16, p144–158, 1965.

SOCORRO et al. Avaliação da atividade anti-hipertensiva do extrato de *Arrabidaea chica verlot* em ratos espontaneamente hipertensos. **Rev.Cien. Saúde**. v. 16, n. 2, jul./dez. 2014.

TATSCH, E.; et al. simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 348-350, 2011.

TOSCANO, L. B. efeitos da suplementação de chia (*salvia hispanica* l.) sobre a pressão arterial, estresse oxidativo, inflamação e modulação autonômica cardíaca em indivíduos hipertensos: um estudo de intervenção. 2014. 71f Dissertação (Mestrado em nutrição). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic Biol Med.**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

WANNAMETHE SG et al. Association of vitamin C status, fruit and vegetables intakes, and markers of inflammation and hemostasis. **American Journal of Clinical Nutrition.** v 83, n. 3, p. 357-74, 726-3, 2006.

VEGGI P. C. et al. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids.** v. 89, p. 68–77 69, 2014.

UKSAN, V., et al., et al. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). **European Journal of Clinical Nutrition**, v 64, p.436-438, 2010.

VUKSAN, V., et al. Supplementation of conventional thfoipy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. **Diabetes Care**, v.30, p.2804-2810, 2007.

WANNAMETHEE SG et al. Associations od vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostatis. **American Journal of clinical Nutrition.** V. 83 n 3 p:567-74, 2006.

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

WHO, A Global Brief on Hypertension, World Health Organization, 2013.

WILCOX, C. S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension?. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology - American**, v. 289, n.4, p.913-935, 2005.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

ZHANG B, SAKAI T, MIURA S ET AL. Association of angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism with the depressor response to mild exercise thfoipy in patients with mild to modfoite essential hypertension. **Clin Genet**; v. 62 p:328-33, 2002

ANEXO 1: Certidão de aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA).

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 11 de Junho de 2015.
CEUA nº **010/2015**.

Ilmo(a): **Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva**
Departamento de Educação Física – CCS – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **02/06/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **EFEITOS DO EXTRATO DA CASCA DO CAULE E CONCENTRADO DA POLPA DO FRUTO DE JATOBÁ SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS SHR.**

Com previsão de empregar **30 ratos SHR.**

Animais do **Biotério do Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **11/06/2015 a 11/06/2016.**

Atenciosamente,

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

ANEXO 2: Triagem comportamental do HR-HAcna dose de 2000mg/kg (v.o).
(Adaptado de Almeida et al., 1999).

SNC ESTIMULANTE	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Hiperatividade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsão					
Piloereção					
SNC DEPRESSOR	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Sedação					
Ataxia					
Catatonía					
Analgesia					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
Dispneia					
OUTROS COMPORTAMENTOS	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Ambulação					
Escalar					
Contorções abdominais					
Hemorragia					
Automutilação					
Vômito					

(0) Sem efeito (-) Efeito diminuído (+) Efeito aumentado

ARTIGO

**Potencial antioxidante e efeito na reatividade vascular do extrato da casca
do *Hymenaea rubriflora* D.**

PERIÓDICO: Industrial Crops and Products

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

ISSN: 0926-6690

FATOR DE IMPACTO: 2.035

Potencial antioxidante e efeito na reatividade vascular do extrato da casca do *Hymenaea rubriflora* D.

Keyth Sulamitta de Lima Guimarães^a; Bagnólia Araújo da Silva^{a,b}; Iara Leão Luna de Souza^{a,b}; Isabelle de Lima Brito^c; Bárbara Cavalcanti Barros^{a,b}; Rubens Teixeira de Queiroz^d; Ângela Maria Tribuzy de M. Cordeiro Brito^c; Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves^a; Alexandre Sérgio Silva^a *

^a Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, João Pessoa -PB (UFPB).

^b Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB (UFPB).

^c Laboratório de Combustíveis e Materiais, João Pessoa-PB (UFPB)

^d Departamento de Sistemática e Ecologia, João Pessoa-PB (UFPB)

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo quantificar a capacidade antioxidante e a ação na reatividade vascular do extrato hidroalcolólico da casca do caule do *Hymenaea rubriflora* Ducke (HR-HAc) em aorta torácica de ratos. Quantificou-se a presença de compostos fenólicos a capacidade antioxidante pelo método DPPH. Investigou-se o efeito vasorrelaxante do HR-HAc, assim como a toxicidade aguda para a realização da suplementação de ratos Wistar com o HR-HAc nas doses de 25 (G25), 50 (G50) e 150 mg/kg (G100) e grupo controle (GC) por quatro semanas (8 animais/grupo). O HR-HAc apresentou alta concentração de compostos fenólicos (274, 63 mg ác.gál/g) e atividade antioxidante (5076,50 $\mu\text{mol Tx/g}$). O HR-HAc relaxou a aorta de rato pré-contráida de maneira dependente de concentração. A suplementação aguda do HR-HAc apresentou baixa toxicidade, enquanto que a suplementação crônica mostrou aumento da potência relaxante da acetilcolina (Ach) em G50 ($\text{pD}_2 = 7,8 \pm 0,1$) enquanto que a eficácia contrátil em aorta sem endotélio foi reduzida em G100 ($E_{\text{max}} = 40,4 \pm$

* Programa de Pós-graduação em ciências da Nutrição, Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e à Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. [Tel:+55 83 98525796](tel:+558398525796) e-mail: alexandresergiosilva@yahoo.com.br

5,1%). A curva cumulativa a fenilefrina (FEN) na presença de L-NAME mostrou diminuição na potência contrátil em aorta de rato com endotélio em G25 e G50 quando comparado GC na presença e ausência L-NAME ($pD_2 = 6,4 \pm 0,1$, $6,4 \pm 0,1$ e $6,9 \pm 0,1$, respectivamente), assim como a eficácia contrátil da FEN foi reduzida nos grupos G25, G50 e G100 quando comparado ao GC. Conclui-se que o HR-HAc tem alta capacidade antioxidante, promove relaxamento vascular e inibição contrátil, modulando positivamente a via do óxido nítrico em orta de vaso.

Palavras-chave: *Hymenaea rubriflora* Ducke. Vasorrelaxante. Nutracêutico

ABSTRACT

1 Introdução

O gênero *Hymenaea* trata-se de uma leguminosa típica do cerrado brasileiro, também conhecida como jutaí ou jatobá do cerrado (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987). Este vegetal que ocorre no nordeste do Brasil, sendo evidenciado em um estudo etnofarmacológico desenvolvido por Cartaxo et al.(2010), por ser culturalmente consumido pela população para diversas finalidades terapêuticas, como: anemias, problemas renais, dores de garganta e doenças de vias respiratórias.

Alguns estudos *in vitro* evidenciam propriedades antioxidantes do *H. courbaril*, pela capacidade de sequestrar os radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e anti-inflamatória pelo isolado do ácido graxo linolênico, assim como a presença de compostos fenólicos com promissor efeito terapêutico (BEZERRA et al., 2013; VEGGI et al., 2014).

A presença de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórios na casca, caule ou polpa do *Hymenaea courbaril* suportam a hipótese de que este produto pode apresentar a capacidade vasorelaxante (BEZERRA et al., 2013; VEGGI et al., 2014). Entretanto, apesar destas evidências prévias, não há estudos que apresentaram a eficácia da suplementação da casca do caule de espécies do gênero *Hymenaea* na função vascular. Por outro lado, foi demonstrado efeito espasmolítico em traquéia de ratos hiperresponsivos e ação imunomoduladora sobre leucócitos e neutrófilos dos mesmos em um estudo com o isolado fenólico astilbin, obtido do extrato da casca do caule do *Hymenaea courbaril* (BEZERRA et al., 2013). Com base na premissa do relaxante em traqueia, pressupõe-se que o *Hymenaea rubriflora* também pode induzir

relaxamento em leito vascular.

Diante desta perspectiva, o presente trabalho tem por objetivo quantificar o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico da casca do caule do *Hymenaea rubriflora* Ducke e avaliar sua ação na reatividade vascular a agentes contráteis e relaxantes de aorta torácica de ratos.

2 Metodologia

2.1 Obtenção e preparo do extrato da casca do caule de *Hymenaea rubriflora*

A espécie *Hymenaea rubriflora* Ducke foi coletada no Município de Cuité em Estado da Paraíba em agosto de 2015, posteriormente realizada a identificação botânica da espécie. Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB)/UFPB sob o código de identificação JPB nº 61262.

A casca do caule foi previamente aquecida em estufa a 50°C. Em seguida, submetida ao processo de trituração utilizando inicialmente um *mixer* comercial seguido de trituração em cuba de porcelana, para então se obter um produto final com 20g de partículas homogêneas abaixo de 0,35 mm. Em seguida, as amostras foram levadas a extração usando como solvente em uma mistura de etanol-água (1:1) em ultrassom com frequência de 42 kHz por 2 h, sendo a proporção de pó em relação ao volume de solvente de 5% (m:v), obtendo-se um rendimento de 25%.

Após o período de extração, o material foi filtrado à vácuo em papel de filtro comum para retirada do material particulado restando o filtrado com solução extrativa conforme metodologia empregada por Bezerra et al (2013).

Para a obtenção do extrato seco a solução extrativa foi levada a rota evaporação a 45°C até que o volume fosse reduzido à metade do volume inicial da mistura de extração. Em seguida, o extrato livre de etanol e água foi congelado em freezer – 80°C por 24 h e posteriormente liofilizado a 0,024 mBar por 24 h, obtendo-se por fim o extrato seco, caracterizado como extrato hidroalcoólico da casca do caule (HR-HAc) de *Hymenaea rubriflora* D., conservado em freezer comum à – 22°C até a utilização nos experimentos.

2.2 Determinação dos fenólicos totais e da atividade antioxidante do HR-HAc

O teor de fenólico total foi determinado, pelo método colorimétrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ROSSI, 1965), posteriormente, foi realizada leitura a 760 nm em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2550, UV-

Vis. Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato (GAE/g) ($r^2 = 99,39$).

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH. Os resultados foram expressos em mmol de Trolox por grama do extrato seco (mmol Trolox / gextrato).

2.3 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB. Os animais foram mantidos em gaiolas com dois animais cada, com uma dieta balanceada *ad libitum*, a base de ração (Presence[®]), livre acesso à água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06 às 18h. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais *Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies* (SHERWIN et al., 2003), submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IPerFarM sob certidão CEUA de nº 010/15.

2.4 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do HC-HAc

Após a administração do HC-HAc, diferentes parâmetros comportamentais foram observados durante as 4 primeiras horas, dentre eles anormalidade em relação a agressividade, postura, reação à manipulação, aos movimentos e aparência externa, além de dificuldades de respiração e relutância ao movimento adaptado de Almeida et al., (1999).

Para a avaliação da toxicidade aguda, seguiu-se a metodologia descrita pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) nº 423/2001 (OECD, 2001). Foi administrada uma dose única de 2000 mg/kg do HC-HAc, seguido de observação dos animais por 14 dias com a finalidade de verificar se haveria alguma morte e assim determinar, aproximadamente, a dose do extrato com letalidade de 50% dos animais testados (DL_{50}).

2.5 Protocolo de suplementação

Para o protocolo de suplementação, utilizou-se 32 ratos divididos em quatro grupos com diferentes doses do extrato, conforme descrito adiante:

- GC (n=8): grupo controle
- G25 (n=8): grupo suplementado com o extrato HR-HAc na dose de 25mg/kg por gavagem;
- G50 (n=8): grupo suplementado com o extrato HR-HAc na dose de 50 mg/kg por gavagem;
- G100 (n=8): grupo suplementado com o extrato HR-HAc na dose de 100 mg/kg por gavagem.

A suplementação ocorreu durante quatro semanas, sempre ao meio dia, tomando por base o estudo de Bezerra et al. (2013). Os animais do grupo controle receberam 1mL/kg de solução salina durante as quatro semanas.

2.6 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foram adquiridos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi adquirido da Fmaia (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que foi mantida sob refrigeração.

A fenilefrina (FEN) foi adquirida da Pfizer (EUA). A acetilcolina (ACh) e o nitroprussiato de sódio (NPS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de suas soluções-estoque (10^{-2} M), que foram mantidas a 4 °C em refrigerador, quando necessário, essas soluções-estoque foram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas a cada protocolo experimental. A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

2.7 Eutanásia e preparo dos anéis de aorta de rato

Os animais foram eutanasiados com o auxílio de uma guilhotina, em seguida a aorta foi isolada por laparoscopia, imersa em solução de Krebs, e gaseificada com mistura carbogênica ajustando o pH a 7,4 e a temperatura a 37 °C. A composição da

solução de Krebs é a seguinte (mM): NaCl (118,0), KCl (4,55), MgSO₄ (5,7), CaCl₂ (2,52), KH₂PO₄ (1,1), NaHCO₃ (25,0) e glicose (11,0). Os anéis aórticos (2-3 mm) foram expostos a um período de estabilização de 60 min com uma tensão de repouso de 2 g. Durante a estabilização, a solução foi trocada a cada 15 min para evitar a interferência de metabólitos. Após a estabilização, foi induzida uma contração com FEN (3×10^{-7} M) e após a fase tônica da contração ser atingida, a ACh (10^{-6} M) foi adicionada as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADKI, 1980). O endotélio vascular foi considerado íntegro quando observado um relaxamento igual ou superior a 50% (AJAYA et al., 2003). A remoção do endotélio foi confirmada pela ausência do relaxamento induzido pela ACh ou quando o relaxamento foi igual ou inferior a 10%.

Para registrar as contrações isométricas, os anéis aórticos foram conectados a transdutores de força isométricos (modelo TIM-05) acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. O sistema continha uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas (AVS Projetos, São Paulo, Brasil).

2.8 Efeito do HR-HAc sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis aórticos na ausência e na presença do endotélio

Os anéis aórticos foram obtidos com descrito previamente. Após a verificação da integridade do endotélio e durante a fase tônica da contração induzida pela FEN (3×10^{-7} M), o HR-HAc foi adicionado à cuba de maneira cumulativa em diferentes preparações. O relaxamento foi expresso com a porcentagem reversa da contração inicial induzida pela fenilefrina e a concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (CE₅₀) foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta do HC-HAc, em ambos anéis com e sem endotélio funcional. Os valores de CE₅₀ foram expressos na forma de pD₂ (logaritmo negativo de base dez do valor da CE₅₀).

3.9 Efeito do HR-HAc sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença do L-NAME e da indometacina

Os anéis aórticos foram montados conforme descrito anteriormente. Após a verificação da presença do endotélio e antes da segunda contração induzida pela FEN (3×10^{-7} M), as preparações foram incubadas por 30 min com L-NAME (10^{-4} M), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS) (REES et al., 1990) ou

indometacina (10^{-5} M), uma inibidora não seletiva de ciclooxigenase (COX) (SIGTHORSSON et al., 2000). Em seguida, na presença dos bloqueadores, foi induzida uma contração com FEN. Logo, o HR HAc foi adicionado à cuba de maneira cumulativa nas diferentes preparações. O relaxamento foi expresso com a porcentagem reversa da contração inicial induzida pela FEN. A CE_{50} foi obtida por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta do HC-HAc na presença ou ausência dos inibidores.

3.10 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre o relaxamento induzido pela ACh ou pelo NPS em aorta isolada de rato

A curva cumulativa de relaxamento foi realizada com ACh (10^{-11} – 10^{-4}) em anéis providos de endotélio ou NPS (10^{-14} – 10^{-6} M) para anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN (3×10^{-7} M). Os anéis sem endotélio foram lavados, esperou-se mais 30 minutos para estabilização. O relaxamento foi expresso com a percentagem reversa da contração induzida por FEN.

3.11 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a resposta contrátil induzida pela FEN em aorta isolada de rato

Após montagem, estabilização e teste da integridade do endotélio vascular, os anéis foram lavados e esperou-se 30 minutos. Em seguida, foi induzida uma curva concentrações- resposta cumulativa à FEN (10^{-9} – 10^{-3} M) nos anéis com e sem endotélio (JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009). Em seguida, as preparações foram lavadas e, após 30 min, o L-NAME (10^{-4} M) foi incubado por um período de 30 min e em seguida foi induzida uma nova curva concentrações-resposta à FEN. A reatividade foi avaliada pelos valores de efeito máximo (E_{max}) da CE_{50} (pD_2) da FEN.

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média e desvio padrão para composição de fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos e o erro padrão da média (e.p.m.) para as análises de reatividade vascular. As diferenças entre as médias foram comparadas estatisticamente utilizando o teste *t* independente para comparar os extratos hidroalcoólicos e quando CE_{50} e E_{max} foram comparadas entre dois grupos. Quando as comparações envolveram mais de dois grupos, foi adotado o teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, quando necessário. Para todos os testes, as diferenças foram

consideradas significantes quando o $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} e pD_2 foram determinados por regressão não linear (NEUBIGET al., 2003). A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism[®] 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4 Resultados

4.1 Determinação dos fenólicos totais e da atividade antioxidante do extrato HR-HAc

O extrato HR-HAc apresentou composição de fenólicos (274, 63 mg ác gál/g), assim como identificou-se que o HR-HAc apresentou alta capacidade em sequestrar o radical livre estável DPPH com 5076,50 $\mu\text{mol Tx/g}$.

4.2 Efeito do HR-HAc sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis aórticos na ausência e na presença do endotélio

O HR-HAc (0,1-729 $\mu\text{g/mL}$) relaxou a aorta de rato pré-contráida com fenilefrina (3×10^{-7} M) de maneira dependente de concentração na presença ($CE_{50} = 5,0 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 74,3 \pm 5,3\%$) como na ausência do endotélio funcional ($CE_{50} = 8,7 \pm 1,8$ $\mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 28,0 \pm 4,9\%$) (figura 2, $n = 5$). A responsividade da aorta foi reestabelecida 30 minutos após a reação do HR-HAc da cuba (dados não mostrados).

4.3 Efeito do HR-HAc sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença do L-NAME e da indometacina

O relaxamento induzido pelo HR-HAc ($CE_{50} = 5,0 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$) na aorta com endotélio funcional pré-contráida com FEN foi atenuado cerca de 28 vezes, na presença do L-NAME ($CE_{50} = 142,4 \pm 21,6$ $\mu\text{g/mL}$) com redução do E_{max} ($74,3 \pm 5,3$ vs $50,1 \pm 4,0\%$, respectivamente) (figura 3, $n = 5$). Entretanto, não foi observado alteração no relaxamento induzido pelo extrato na presença da indometacina ($CE_{50} = 2,9 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 82,4 \pm 5,3\%$) (figura 4, $n = 5$).

4.4 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre o relaxamento induzido pela ACh ou pelo NPS em aorta isolada de rato

A curva de relaxamento induzida pela adição cumulativa de ACh em aorta de rato com endotélio funcional pré-contráida com FEN (3×10^{-7} M) foi similar para os anéis de ratos controle e tratados com dose de 25 mg/kg de HR-HAc ($pD_2 = 6,9 \pm 0,1$; $E_{\text{max}} = 100\%$ e $pD_2 = 6,7 \pm 0,2$; $E_{\text{max}} = 99,9 \pm 0,1\%$, respectivamente) (Figura 5A, $n =$

5). Entretanto, a potência relaxante da ACh foi aumentada nos animais suplementados com HR-HAcnas doses de 50 mg/kg ($pD_2 = 7,8 \pm 0,1$; $E_{max} = 95,6 \pm 1,1\%$) e 100 mg/kg ($pD_2 = 7,6 \pm 0,1$; $E_{max} = 97,4 \pm 0,8\%$), sendo a maior potência relaxante da ACh encontrada na aorta dos ratos suplementados com o extrato na dose de 50 mg/kg quando comparado com a dose de 100 mg/kg (Figura 5A, $n = 5$). A suplementação com o HR-HAc não alterou a eficácia vasorrelaxante da ACh evidenciada pelos valores de E_{max} .

A curva de relaxamento induzida pela adição cumulativa de NPS em aorta de rato na ausência endotélio funcional pré-contráida com FEN (3×10^{-7} M) proveniente de ratos controle ($pD_2 = 9,0 \pm 0,2$; $E_{max} = 100\%$) (Figura 5B, $n = 5$) foi desviada para a esquerda sem alteração na eficácia relaxante nos animais suplementados com o HR-HAcnas doses de 25 mg/kg ($pD_2 = 10,9 \pm 0,1$; $E_{max} = 100\%$), 50 mg/kg ($pD_2 = 11,3 \pm 0,2$; $E_{max} = 100,3 \pm 0,3\%$) e 100 mg/kg ($pD_2 = 12,1 \pm 0,04$; $E_{max} = 100,2 \pm 0,2\%$) (Figuras 5B, $n = 5$), sendo a maior potência relaxante do NPS encontrada na aorta dos ratos suplementados com o extrato na dose de 100 mg/kg quando comparado com a dose de 50 mg/kg ($pD_2 = 12,1 \pm 0,04$ vs. $11,3 \pm 0,3$, respectivamente).

4.5 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a resposta contrátil induzida pela FEN na ausência do endotélio funcional em aorta isolada de rato

A potência contrátil frente à FEN em aorta de rato sem endotélio funcional não foi alterada nos animais suplementados com o HR-HAcnas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, uma vez que, não houve diferença estatística entre os valores de pD_2 para o GC ($pD_2 = 7,1 \pm 0,08$) quando comparado aos valores de pD_2 dos grupos G25, G50 e G100 ($pD_2 = 6,6 \pm 0,08$; $6,7 \pm 0,05$ e $6,7 \pm 0,2$, respectivamente) (Figura 6B). A eficácia contrátil da FEN não foi alterada nos grupos G25 e G50 ($E_{max} = 95,2 \pm 5,0$ e $76,1 \pm 8,2\%$, respectivamente) quando comparado ao GC ($E_{max} = 100\%$), porém, foi reduzida pela suplementação com o extrato na dose 100 mg/kg ($E_{max} = 40,4 \pm 5,1\%$) (Figura 6B).

4.6 Efeito da suplementação com HR-HAc sobre a resposta contrátil induzida por FEN na ausência e na presença de L-NAME em aorta isolada de rato

A curva concentrações-resposta cumulativa à FEN na presença do L-NAME foi desviada para a esquerda no grupo GC quando comparada ao GC na ausência do L-NAME ($pD_2 = 7,3 \pm 0,02$ e $6,9 \pm 0,1$, respectivamente), caracterizando o aumento da reatividade contrátil da aorta de rato com endotélio funcional (Figuras 7, $n = 5$). No entanto, a suplementação com o extrato nas doses de 25 e 50 mg/kg deslocou para a

direita a curva concentrações-resposta cumulativa à FEN na presença do L-NAME quando comparado ao GC na ausência do L-NAME ($pD_2 = 6,4 \pm 0,1$ e $6,4 \pm 0,1$, respectivamente) (Figuras 7, $n = 5$), demonstrando uma diminuição da potência contrátil da FEN em aorta de rato com endotélio. Além disso, não se observou diferença entre a potência contrátil da FEN nos grupos G100 e GC na ausência do L-NAME ($pD_2 = 6,7 \pm 0,1$ vs. $6,9 \pm 0,1$, respectivamente) (Figura 7, $n = 5$). A eficácia contrátil da FEN foi reduzida em todos nos grupos G25, G50 e G100 quando comparado aos grupos GC e GC na presença do L-NAME ($E_{max} = 61,4 \pm 5,2$; $74,4 \pm 5,3$; $76,9 \pm 3,7$; 100 e 100%, respectivamente).

5 Discussão

Este estudo evidenciou que o extrato hidroalcólico da casca do caule do *Hymenaea rubriflora* apresentou alta concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, corroborando com estudo semelhante, no qual foi identificada a presença de compostos fenólicos na espécie *courbaril* (VEGGI, 2014). O HR-HAc apresentou concentrações superiores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, quando comparado a extratos de outros vegetais como a *Baccharis trimera* (carqueja) (MOREIRA et al, 2012) e o *Syzygium cumini* L (jambolão) (VEBER et al, 2014). Os compostos fenólicos têm sido isolado da casca do caule, tronco e frutos do de diferentes espécies do gênero *Hymenaea*, sendo identificados como os *sesquiterpenos*, *diterpenos*, ácidos graxos e oligossacarídeos; (NOGUEIRA et al, 2002; JAYAPRAKASAM et al, 2007). Apesar de serem moléculas estruturalmente simples, exercem atividade terapêutica, elucidada na literatura, destacando-se pela sua ação no sistema cardiovascular, por desempenhar atividades vasorrelaxante, anti-hipertensiva e na diminuição da frequência cardíaca (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; BASTOS et al., , 2010; AYDIN et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007).

Desse modo, mostrou-se pela primeira vez que o HR-HAc apresenta efeito espasmolítico em aorta de ratos com a participação do NO, assim como a suplementação crônica com o HR-HAc promoveu aumento da reatividade relaxante a ACh e diminuição contrátil à FEN. Dados etnofarmacológicos indicam o uso tanto da casca quanto da polpa do fruto de *Hymanea* para o tratamento de algumas enfermidades como anemias, problemas renais, dores de garganta e doenças de vias respiratórias (CARTAXO et al., 2010), entretando estudos com reatividade vascular, aindo não havia sido realizado.

Além do *Hymanea*, vários alimentos são apresentados na literatura pelo seu potencial antioxidante, a exemplo da uva, cujo polifenóis apresenta importante ação cardiovascular, (DAS; MUKHERJEE; RAY, 2010), café e chá mate (GRAHAM, 1992; VAN ACQUIRE, 1996). Alimentos ricos em vitamina C, vitamina E e beta carotenos, agem como sequestrantes de espécies reativas de oxigênio, além de atuar na redução da disfunção endotelial em homens com histórico de doenças cardiovasculares ou diabetes (WANNAMETHEE et al., 2006).

Este estudo revela que o extrato apresentou capacidade vasorrelaxante em aorta de rato saudáveis pré contraída com FEN, sendo esta atividade dependente de fatores relaxantes derivados do endotélio, uma vez que, em aorta sem endotélio ocorreu redução da capacidade relaxante do HR-HAc evidenciado pelo E_{max} e pelo P_{D2} . Assim como na utilização de inibidores da síntese/liberação de prostaciclina, um metabólito vasodilatador dependente de COX (PAREDES-CARBAJAL et al., 2001), observou-se que não houve participação das prostaciclinas no efeito relaxante do HR-HAc, enquanto que na presença de inibidores da síntese/libertação de NO, o L-NAME (PAREDES-CARBAJAL et al., 1997), mostrou relevante participação do NO, porém não exclusivo, tendo em vista que ao incubar-se L-NAME, ainda ocorreu relaxamento dos anéis de aorta de ratos.

O HR-HAc não apresentou toxicidade aguda, quando administrado em dose única de 2000 mg/kg do HR-HAc, seguindo a OEDC nº423 (2001), corroborando com teste de toxicidade da espécie courbaril (BEZERRA, 2013). Desse modo, as doses de 25 (G25), 50 (G50) e 100 (G100) mg/kg ofereciam segurança para a suplementação dos animais, uma vez que até o presente estudo não existiam protocolos de suplementação para este extrato.

Após a suplementação por quatro semanas com HR-HAc, observou-se que a potência relaxante da ACh em aorta de ratos com endotélio funcional foi aumentada nos grupos G50 e G100 (Figura 5A), sendo observada maior potência com a suplementação na dose de 50 mg/kg, sugerindo que o extrato HR-HAc é eficaz na prevenção da disfunção endotelial, mesmo em animais saudáveis.

Verificou-se que o relaxamento promovido em aorta sem endotélio funcional, pelo NPS, um doador de óxido nítrico que apresenta potente ação vasodilatadora com uso clínico para redução da pressão arterial (BATES et al., 1991) foi potencializado em todas os grupos suplementados com o extrato, sendo a maior potência relaxante do NPS alcançada no G100 (Figura 5 B), demonstrando que o HR-HAc aumenta a reatividade

relaxante vascular. O estudo de Bezerra (2013) evidenciou a capacidade do extrato alcoólico do *H. courbaril* na dose de 150mg/kg em inibir aproximadamente 50% da contração induzida por K^+ em anéis traqueais de ratos hipersensibilizados com ovoalbumina. Diante desses resultados, torna-se importante realizar estudos futuros com modelos animais induzidos a patologias que favoreçam o dano endotelial, como a hipertensão, a obesidade e o diabetes mellitus para avaliar a capacidade do HR-HAc na modulação da e atividade vascular (LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2013, SALES, 2011).

Considerando que alterações na contração muscular lisa também estão relacionadas com distúrbios cardiovasculares, induzindo a redução na vasodilatação, aumento da vasoconstrição, inflamação vascular e remodelação estrutural provocando aumento da resistência periférica (WILCOX, 2005). Nesse estudo, observou-se que as doses de 50 e 100 mg/kg promoveram redução na reatividade contrátil a FEN (Figura 6A), reforçando a capacidade da suplementação com o HR-HAc em prevenir o quadro de disfunção endotelial. Além disso, na ausência do endotélio funcional, o extrato reduziu a eficácia contrátil da FEN apenas na dose de 100 mg/kg (Figura 6B), o que demonstra que a inibição da atividade contrátil promovida pelo extrato HR-HAc foi dependente do endotélio vascular. Entretanto, na presença do L-NAME, a potência contrátil da FEN foi semelhante àquela obtida na ausência desse inibidor nos grupos G50 e G100 (Gráficos 7), sugerindo que provavelmente o NO não é o principal responsável pela diminuição da atividade contrátil da aorta.

Estes dados confirmam estudos prévios que mostram a participação de compostos fenólicos na modulação vascular por via endotelial (JENUINO, 2013), do mesmo modo, outros estudos referem que os compostos fenólicos promovem vasodilatação (HU., et al, 2008; SOCORRO et al., 2014;) e até mesmo redução da pressão arterial em modelo animal (SOCORRO et al, 2014) e humanos (TOSCANO, 2014) atuando na melhoria da função endotelial.

Os limites de descoberta deste estudo foram a capacidade vasorelaxante dependente do endotélio e inibição contrátil vascular pelo HR-HAc. A partir destas descobertas, algumas limitações foram identificadas para perspectivas futuras para esta linha de investigação. Compreende-se a necessidade de determinar a participação dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, assim como determinar quanto o efeito vascular encontrado no presente estudo relaciona-se a presença de compostos fenólicos. Para isso, são necessários ensaio moleculares que verifiquem a participação destes compostos na estimulação da produção de óxido nítrico, bem como ensaio histológicos

para se verificar se as estruturas vasculares são influenciadas pelos compostos do *Hymenae*. Finalmente, considerando o evidente efeito relaxante e inibição contrátil, torna-se plausível verificar se este efeito repercute em redução da pressão arterial, de modo que, estudos que tomem como variável a pressão arterial devem ser conduzidos com ratos hipertensos.

6 Conclusão

Os dados deste estudo mostraram que a casca do caule da espécie rubriflora tem alta atividade antioxidante e pela primeira vez mostrou-se que um extrato elaborado a partir deste caule tem capacidade tanto relaxante quanto inibitória da contração vascular em aorta de ratos, sendo esta atividade dependente do endotélio. Diante dos nossos resultados, demonstra-se que a suplementação com HR-HAc pode ser utilizado como tratamento profilático, não farmacológico de doenças cardiovasculares que acometem a reatividade vascular.

Referências.

- Ajaya, M.; Gilani, A.; Mustafaa, M., 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*. 129, 603–612.
- Almeida, S. P.; Silva, J. A.; Ribeiro, J. F., 1987. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Planaltina: EMBRAPA – CPAC.83p.
- Aydin, Y.; et al, 2007. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medical*. 73, 1365-1371.
- Bastos, J. F.; et al., M.R., 2010. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *BasicalClinical Pharmacology and Toxicology*. 106, 331-337.
- Bates, J. N. et al., 1991. Nitric oxide genfoition from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol*. 42, 157-165.
- Bezerra G.P. et al., 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 149, 62–69.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol*. 28, 25–30.

- SHERWIN, C. M.; et al., 2003. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. *Applied Animal Behaviour Science*. 81, 291-305.
- Cartaxo, S.L., Souza, M.M.A., Albuquerque, U.P., 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 326–342.
- Das, D. K.; Mukherjee, S.; Ray, D., 2010. Resvofitol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Failure Reviews*. 15, 467–477.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 5789, 373- 376.
- Graham, H. D., 1992. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem., Columbus*. 40, 801-805.
- Hu C.; et al, D., 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract . *Food Chemistry*, London, 109, 439-446.
- Ishibashi, M., et al., 1999. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9: 15, 2157-2160.
- Imai, T., et al., K., 2008. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecontei* and their antioxidant activities. *Journal Wood Science*. 54, 470-475.
- Jayaprakasam, B. et al., 2007. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chemistry*. 105, 485–490.
- Jesuino, C. V. Avaliação anti-hipertensiva e proteção da reatividade vascular do extrato de *Hibiscus acetosella* Welw ex Hiern., 2013. Trabalho de conclusão de curso em ciências farmacêuticas. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- Lassègue, B.; Griendling, K. K., 2004. Reactive oxygen species in hypertension. *American Journal of Hypertension*. 17: 9, 852-860.
- López-Jaramillo, P. et al., 2013. Inflammation and hypertension: are there regional differences?. *International Journal of Hypertension*, 2013, 1-12.
- Magalhães, et al., 1998. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. *Phytotherapy Research*. 12, 172-177.
- Nogueira, R.T., et al., 2002. A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 13, 389–391.

Neves, M. F. et al., 2012. Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. *International Journal of Hypertension*. 2012, 1-6.

OECD., 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD guideline for testing of chemicals nº 423.

Paredes-Carbajal, M.C.; et al., 1997. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sciences*. 61, 211-219.

Paredes-Carbajal, M.C.; et al., 2001. Effects of the ethanolic extract of *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*. 75, 37-44.

Peixoto N, D.; et al., 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental Clinical Pharmacology*. 24, 341-350.

Queiroz, T.M.; Monteiro, M.M.O.; Braga, V.A., 2013. Angiotensin –II derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. *Frontiers in Physiology*. 4, 1-6.

Singleton, V.L., Rossi JR., J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. 16, 144–158.

Socorro et al., 2014. Avaliação da atividade anti-hipertensiva do extrato de *Arrabidaea chica verlot* em ratos espontaneamente hipertensos. *Rev.Cien. Saúde*. 16, 2.

Toscano, L. T. et al. 2015. Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. **Nutrición Hospitalaria**. 31, 1176-1182.

Van acquire, S. A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 20, 331-342.

Veggi P. C. et al., 2014. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. *J. of Supercritical Fluids*. 89, 68–77 69.

Wannamethe SG et al., 2006. Association of vitamin C status, fruit and vegetables intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 83, 357-74,726-3.

Wilcox, C. S., 2005. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension?. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* – American. 289, 913-935.

Figura 1 Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta de rato na presença (●) e ausência (○) de endotélio funcional. Os símbolos e as barras verticais representam a média e e.p.m. (n = 5). *** $p < 0,001$ (presença vs. ausência de endotélio).

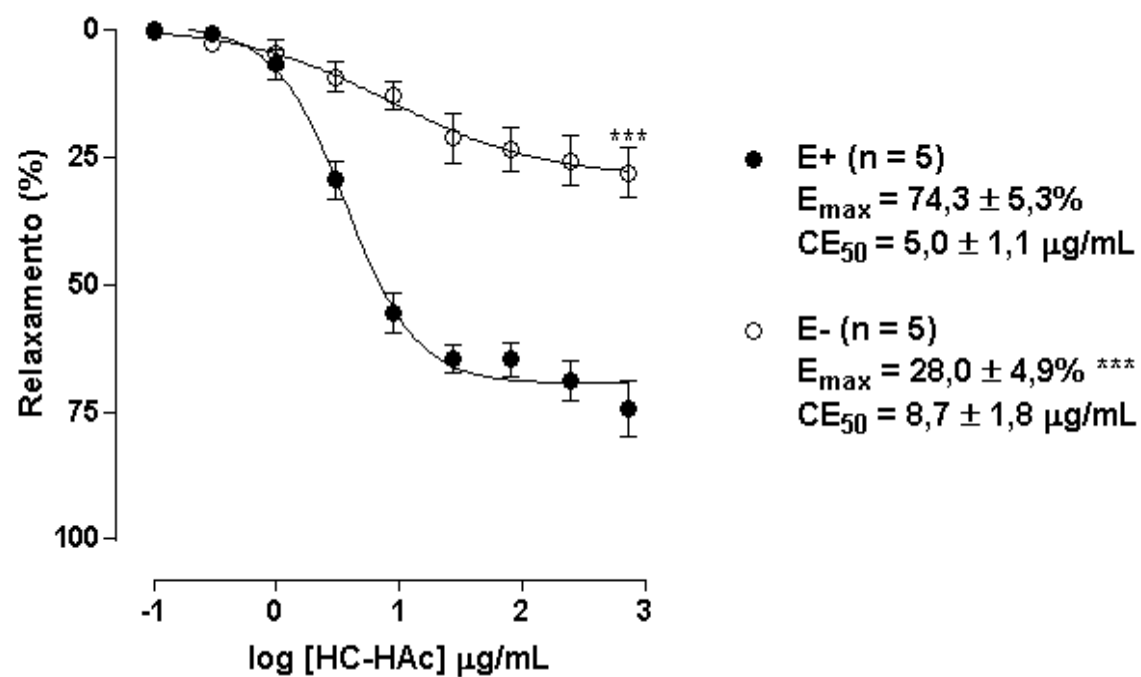
Figura 2 - - Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN em aorta de rato com endotélio funcional na ausência (●) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (○). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m (n = 5). Teste *t*, **p* < 0,05 (controle vs. L-NAME).

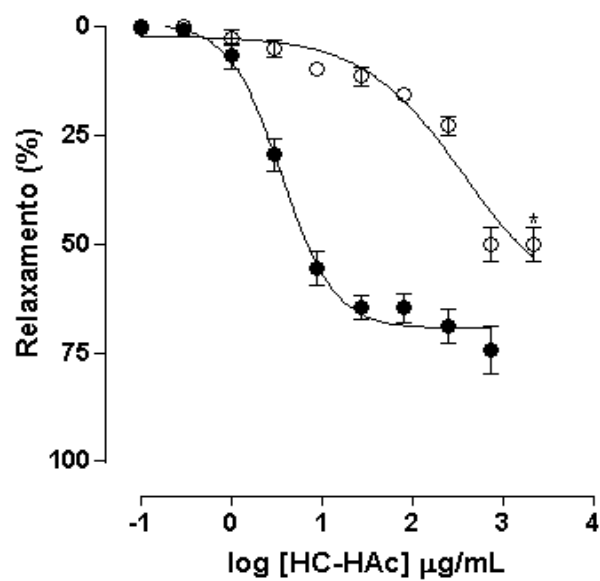
Figura 3 - Efeito vasorrelaxante do HR-HAc nas contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta de rato com endotélio funcional na ausência (●) e na presença de 10^{-5} M de indometacina (○). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m (n = 5).

Figura 4 -Efeito relaxante da ACh (A) e do NPS (B) sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■) e GS100 (□) em aorta isolada de rato. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. $^{**}p < 0,01$ (GC vs. G50 ou G100), $^{\dagger\dagger}p < 0,01$ (G50 vs. G100), $^{###}p < 0,001$ (G25vs. G50 ou G100) e $^{***}p < 0,001$ (GC vs. G25, G50 ou G100).

Figura 5 Efeito contrátil da FEN na presença (A) ou ausência (B) do endotélio nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■) e GS100 (□) em aorta isolada de rato. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ (GC vs. G50), *** $p < 0,001$ (GC vs. G100) e ^{###} $p < 0,001$ (G25 vs. G100).

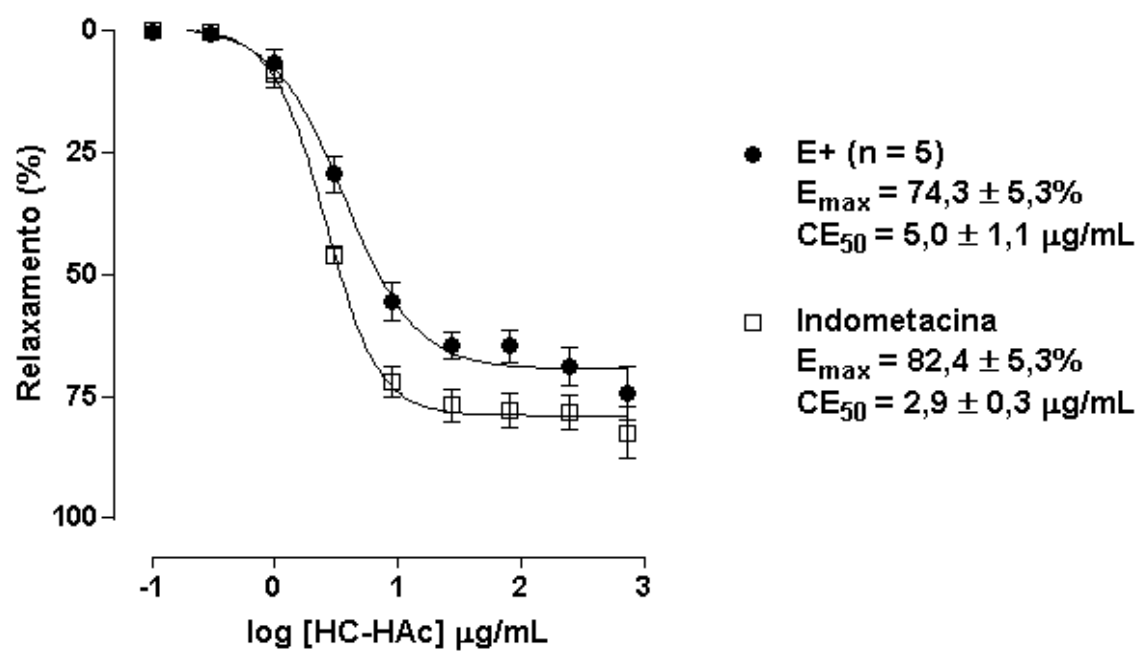
Figura 6 – Efeito contrátil da FEN na presença do L-NAME nos grupos GC (●), GS25 (○), GS50 (■), GS100 (□) e na ausência do L-NAME no grupo GC (△) em aorta isolada de rato. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ (GC vs. GC + L-NAME, G25 ou G50), ^{##} $p < 0,01$ (GC + L-NAME vs. G100) e ^{###} $p < 0,001$ (GC + L-NAME vs. G25 ou G50).

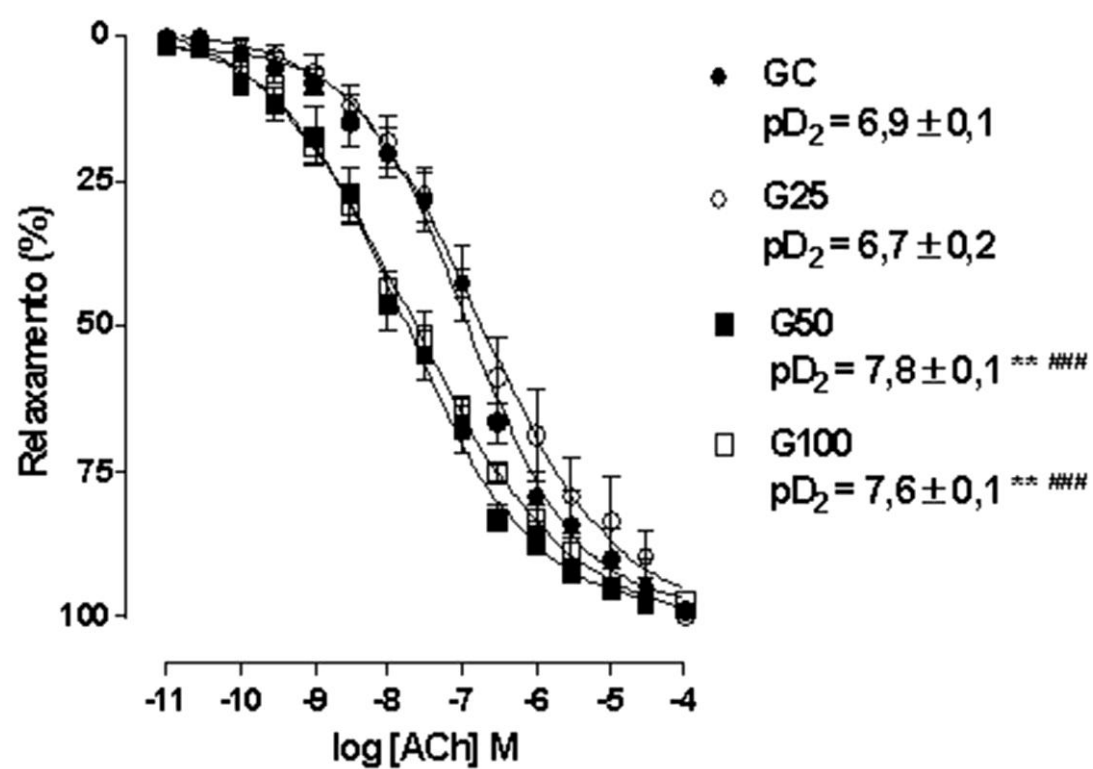


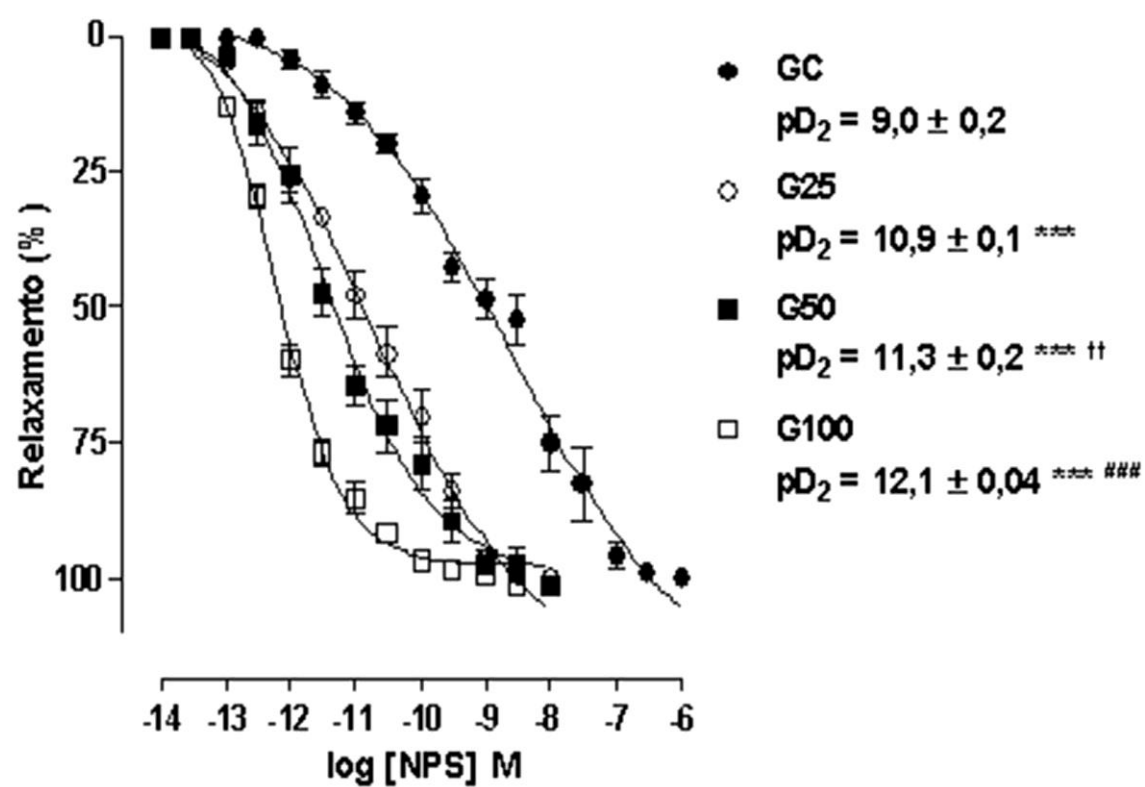


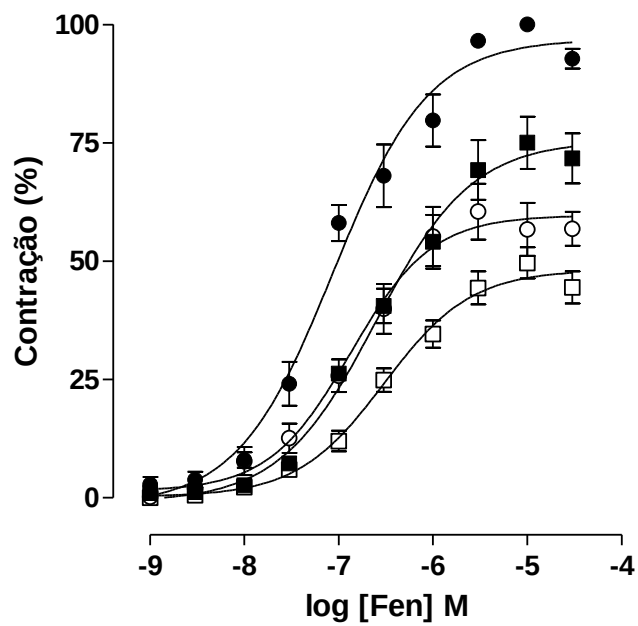
- E+ (n = 5)
 $E_{\max} = 74,3 \pm 5,3\%$
 $CE_{50} = 5,0 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$

- L-NAME (n = 5)
 $E_{\max} = 50,1 \pm 4,0\%$ *
 $CE_{50} = 142,4 \pm 21,6 \mu\text{g/mL}$ ***









● **Controle**

$$E_{\max} = 100\%$$

$$pD_2 = 6,9 \pm 0,1$$

○ **HC-HAc 25 mg/kg**

$$E_{\max} = 61,5 \pm 6,0\% \text{ ***}$$

$$pD_2 = 6,9 \pm 0,06$$

■ **HC-HAc 50 mg/kg**

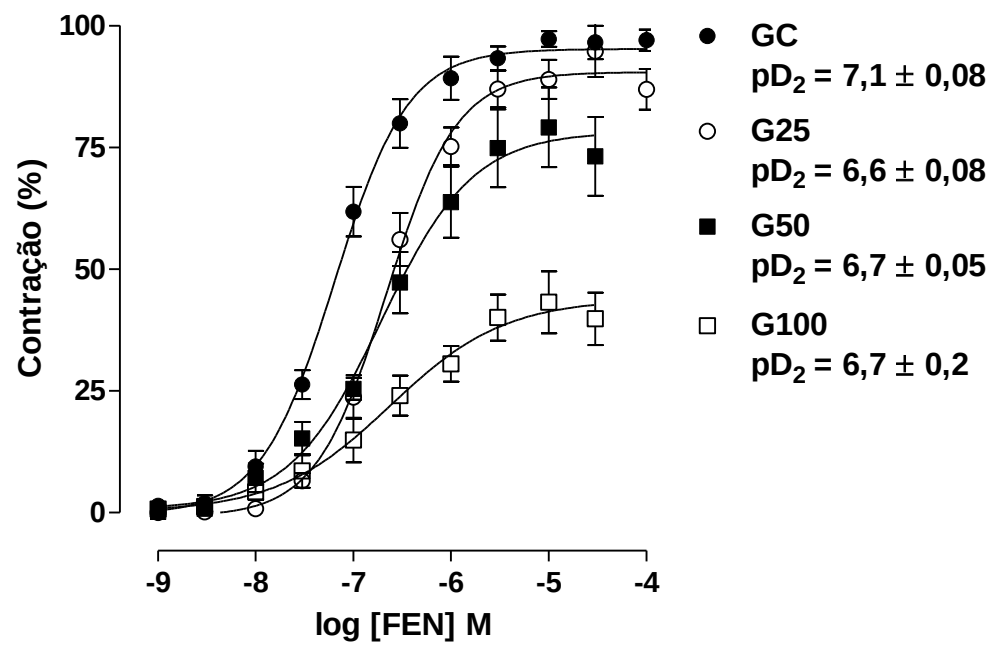
$$E_{\max} = 71,0 \pm 8,5\% *$$

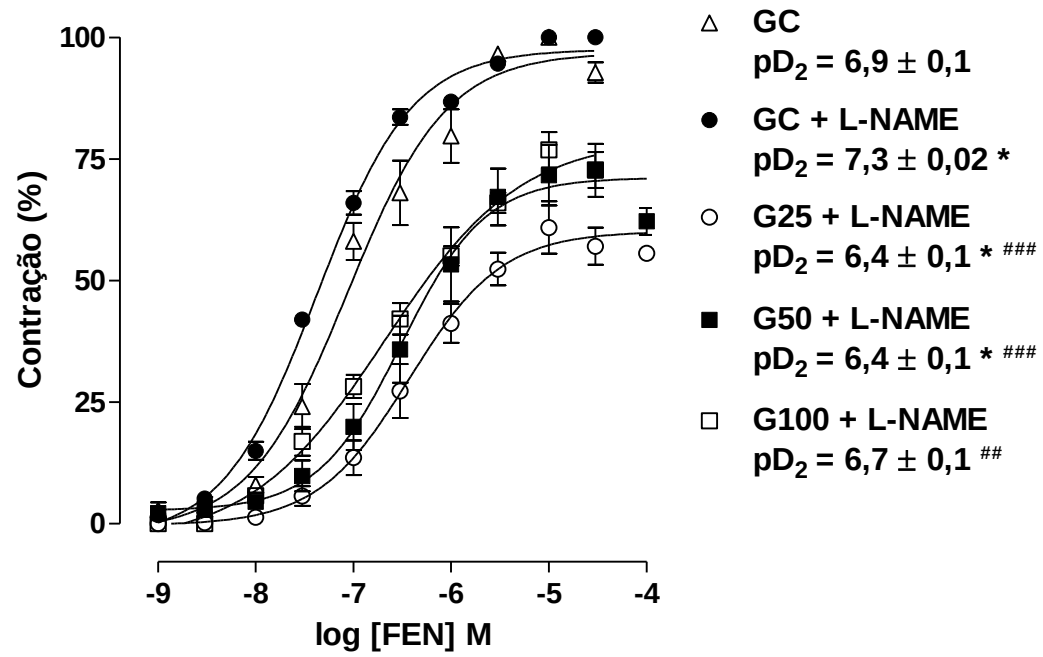
$$pD_2 = 6,6 \pm 0,06 *$$

□ **HC-HAc 100 mg/kg**

$$E_{\max} = 49,6 \pm 3,3\% \text{ ***}$$

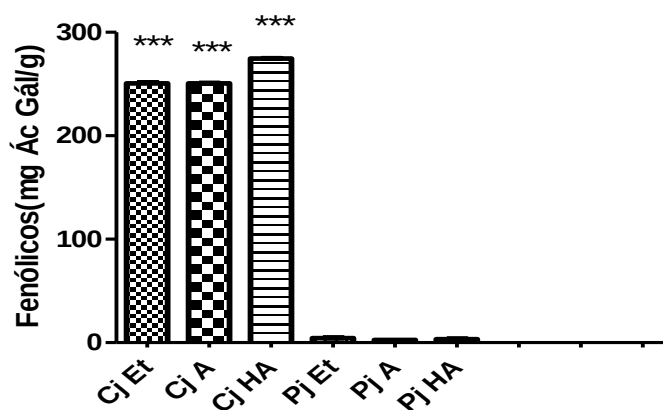
$$pD_2 = 6,5 \pm 0,07 \text{ ***}$$





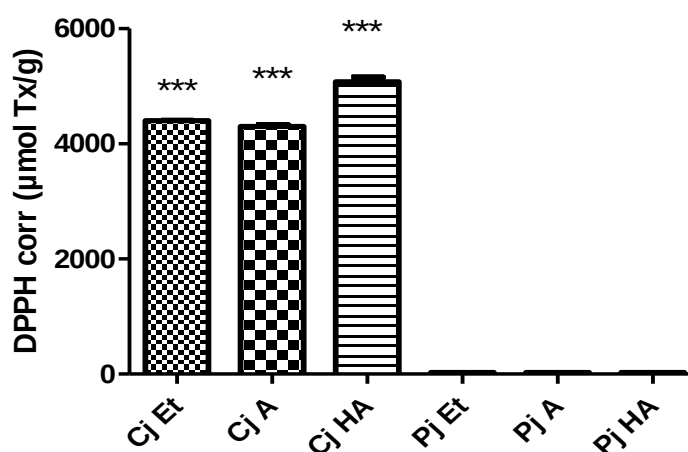
OUTROS RESULTADOS

Figura 1 – Composição de fenólicos totais dos extratos etanólico, aquoso e hiroalcóolico da casca e da polpa de *Hymenaea rubriflora* D.



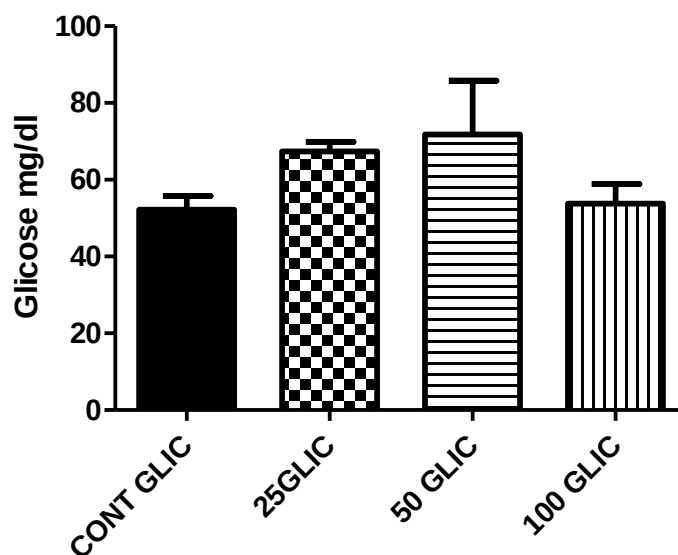
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o desvio padrão, respectivamente (teste em triplicata). *Anova* com *Post Hoc* de Benferroni *** $p < 0,001$.

Figura 2 – Capacidade de seqüestro do radical livre DPPH dos extratos etanólico, aquoso e hiroalcóolico da casca e da polpa de *Hymenaea rubriflora* D.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o desvio padrão, respectivamente (teste em triplicata). *Anova* com *Post Hoc* de Benferroni *** $p < 0,001$.

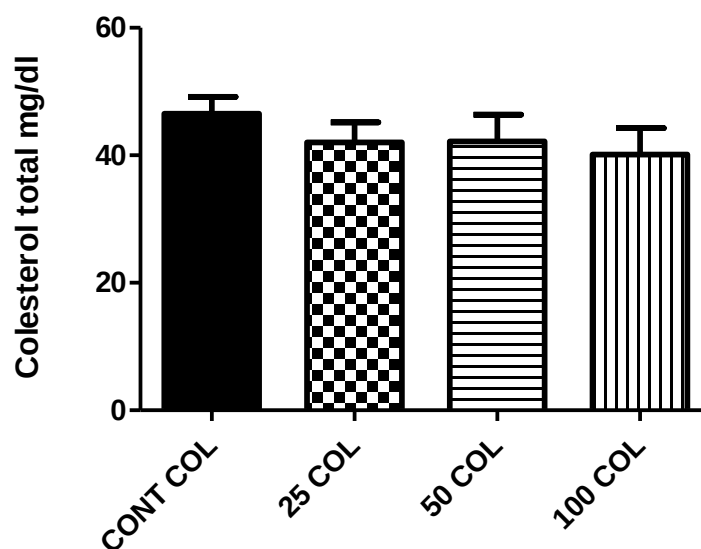
Figura 3 - Concentrações da glicose no plasma sanguíneo, obtido após quatro semanas de intervenção para os grupos GC, G25, G50, G100.

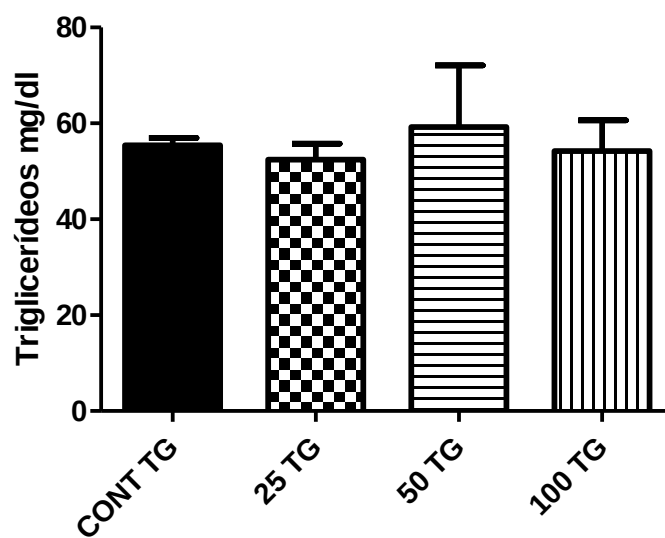


As colunas e as barras verticais representam a média e o d.p.m., respectivamente (n = 8).

Figura 4 - Concentrações de lipídios, colesterol total (**A**) e triglicerídeos (**B**) no plasma sanguíneo, obtido após quatro semanas de intervenção para os grupos GC, G25, G50, G100.

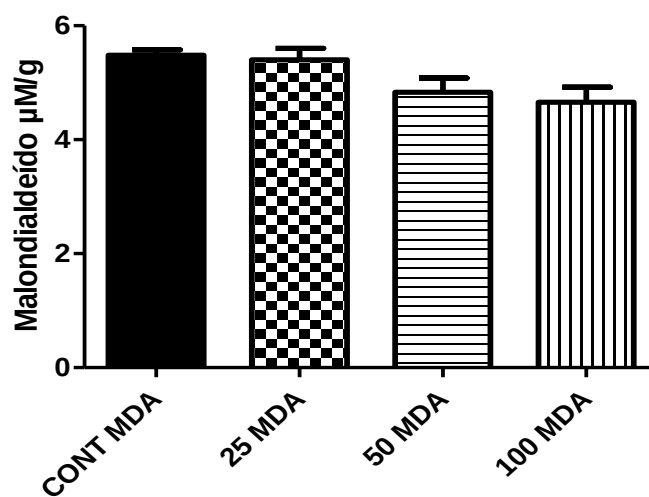
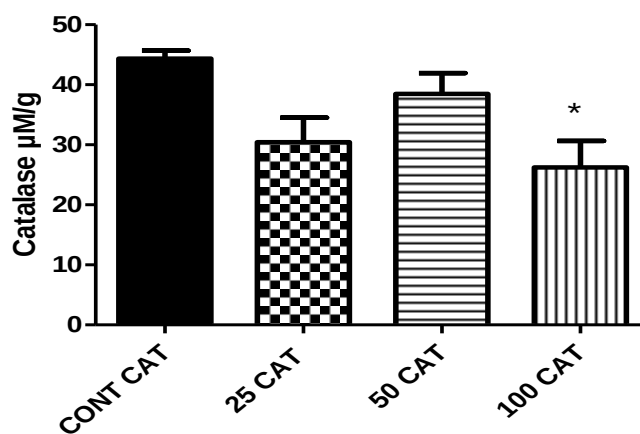
A



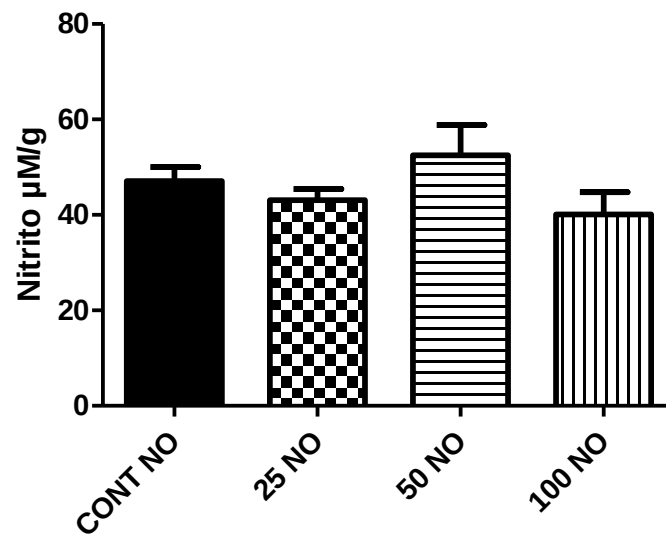
B

As colunas e as barras verticais representam a média e o d.p.m., respectivamente (n = 8).

Figura 5 - Concentrações de Malondialdeído (A), Capacidade antioxidante total (B) e Nitrito (C) no plasma sanguíneo, obtido após quatro semanas de intervenção para os grupos GC, G25, G50, G100.

A**B**

C



As colunas e as barras verticais representam a média e o d.p.m., respectivamente (n = 8). *p < 0,05