

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

KÍVIA SALES DE ASSIS

**ESTUDOS PRELIMINARES DO EFEITO VASORRELAXANTE
DO LIOFILIZADO DO SUCO *Syzygium jambolanum* EM
RATOS**

**João Pessoa
2014**

KÍVIA SALES DE ASSIS

**ESTUDOS PRELIMINARES DO EFEITO VASORRELAXANTE
DO LIOFILIZADO DO SUCO *Syzygium jambolanum* EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**João Pessoa
2014**

A848e Assis, Kívia Sales de.

Estudos preliminares do efeito vasorrelaxante do liofilizado do suco *Syzygium jambolanum* em ratos / Kívia Sales de Assis. - João Pessoa, 2014.

102 f.: il. -

Orientador: Isaac Almeida de Medeiros.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Farmacologia. 2. Polifenóis. 3. *Syzygium jambolanum*.
4. Artéria mesentérica. 5. Vasorrelaxamento. 6. Canais para K⁺.
I. Título.

UFPB/BC

CDU: 615(043)

KÍVIA SALES DE ASSIS

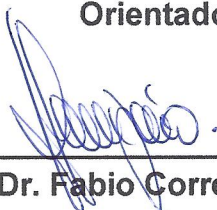
**ESTUDOS PRELIMINARES DO EFEITO VASORRELAXANTE
DO LIOFILIZADO DO SUCO *Syzygium jambolanum* EM
RATOS**

Aprovada em 26/02/14

Banca examinadora



**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador**



**Prof. Dr. Fabio Correia Sampaio
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinador Externo**

**Prof. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno**

Dedicatória

Aos meus pais, **José de Arimatéia Almeida de Assis** e **Maria das Neves Sales de Assis**, exemplos de amor, companheirismo e dedicação para com seus filhos. Sempre nos incentivando, aconselhando e confortando nas horas difíceis. A vocês dedico não só esta dissertação como a minha vida. Muito obrigada. Amo vocês.

Às minhas irmãs **Katyuscia Sales de Assis** e **Kelyonara Maria Sales de Assis**, bem como minha Tia **Maria Lúcia de Sales** sempre torcendo e rezando por mim.

À meu sobrinho e afilhado **Pedro Henrique**, tia ama.

À meu esposo, **Gustavo César de Souto Ramos Oliveira**, sempre ao meu lado em todos os momentos desse mestrado, em especial neste último ano.

Agradecimientos

Á **Deus** e a **Nossa Senhora**, por sempre conduzirem os meus passos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela oportunidade conferida desde a minha iniciação científica, confiança em mim depositada, compreensão diante das dificuldades e paciência nos momentos difíceis, me orientando no crescimento durante esses 6 anos de aprendizado no laboratório.

Aos professores da banca **Fabio Correia Sampaio** e **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, que aceitaram de forma muito solícita o meu pedido para contribuir com este trabalho.

À **Profª. Dra Islania Araújo** pelo incentivo, ajuda e contribuições para a realização deste trabalho.

Á **Priscilla Maria, Valéria, Mônica, George e Fátima** que além de serem meus companheiros de experimento durante este ano, foram também com eles que compartilhei as minhas dúvidas e certezas.

Em especial a **Valéria, Priscilla Maria, Mônica** e a **Natália**, torcendo sempre pela minha vitória e me ajudando não só na parte experimental, mas também nos momentos turbulentos da pesquisa, com palavras de conforto e amizade.

A **Tays Amanda** que tanto me ajudou não só nos experimentos *in vivo*, mas também com palavras de conforto e incentivo, e ao seu esposo **Júlio** por nos acompanhar durante os experimentos nos finais de semanas.

À **Leônidas Mendes** que juntamente com **Natália** foram meus amigos desde a graduação e como sempre, esteve disposta a me ajudar.

A **Abraão Filho** e a **Thais Josy** os quais tive o prazer de ter sido aluna de iniciação científica e ter aprendido muito com os seus ensinamentos não só em relação a protocolos experimentais mas ensinamentos de amizade os quais vou levar para o resto da vida.

A todos do laboratório de **Farmacologia cardiovascular**: Anaís Bezerra, Diglene, Ellen Oliveira, Fátima, José George, Kananda, Lisandra, Luara, Maria do Carmo de Alustau, Marília, Mathania, Mônica, Natália, Priscilla Crispiniano, Priscilla Maria, Rayanne, Suênia, Tays Amanda, Valéria, Walma, Thais Porto e aos professores Dr. Robson Veras e Dra. Fabíola Furtado, por toda a ajuda, pela partilha de conhecimentos.

A **José Crispim Duarte** pela amizade, pela força e pela disposição de estar sempre pronto a ajudar, não importando a situação.

As funcionárias **Dona Maria** e **Mônica Rodrigues** com quem tive o prazer de dividir vários inícios de manhãs nos meus dias de experimento.

E aos funcionários **Luís Cordeiro da Silva** e **Adriano Cordeiro** pelo trabalho realizado no biotério nos dando suporte para trabalhar.

A **Hélia** (PRPG) pela eterna gentileza e doçura para conosco, sempre disposta

À minha turma de mestrado, em especial a **Carol, Sávio, Lílian, Elida, Salete** e **Ana Luísa**, que serão meus companheiros no doutorado. Só nós sabemos o qual especial foi essa conquista.

À **Coordenação** e aos **funcionários do Programa de Pós-graduação** em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela seriedade e competência que exerce seus trabalhos.

Ao **CNPq, CAPES, CBIotec** e **UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

Resumo

RESUMO

ESTUDOS PRELIMINARES DO EFEITO VASORRELAXANTE DO LIOFILIZADO DO SUCO DA *Syzygium jambolanum* EM RATOS

ASSIS, K.S.

Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2014)

Vários estudos epidemiológicos têm sugerido uma associação entre dietas ricas em polifenóis e um menor risco de doenças cardiovasculares. Dentre as frutas ricas em polifenóis encontra-se a *Syzygium jambolanum*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo liofilizado do suco da fruta *Syzygium jambolanum* (LSFSJ), utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. O LSFSJ apresentou um alto teor de polifenóis ($988,55 \pm 5,41$ mg de Ác. Gal/100g) e presença de flavonoides e esteroides. Em ratos normotensos, o LSFSJ (5; 10; 30, 50 e 100 mg/kg, i.v.) induziu hipotensão e observou-se uma bradicardia na dose máxima. Em anéis de artéria mesentérica superior de rato, pré-contraídos com fenilefrina (FEN) ($1 \mu\text{M}$), o LSFSJ ($1 - 5000 \mu\text{g/mL}$) induziu relaxamento dependente de concentração na presença ($E_{\text{máx}} = 105,3 \pm 3,54 \%$; $CE_{50} = 1172,7 \pm 116,1 \mu\text{g/mL}$) e ausência do endotélio ($E_{\text{máx}} = 106,4 \pm 4,5 \%$; $CE_{50} = 1506,5 \pm 148,1 \mu\text{g/mL}$). Esses dados sugerem que a resposta induzida pelo LSFSJ parece ser independente dos fatores liberados pelo endotélio. Todos os experimentos seguintes foram realizados na ausência do endotélio. A resposta do LSFSJ na contração induzida por solução despolarizante de tyrode com 60 mM de KCl ($E_{\text{máx}} = 28,7 \pm 2,8 \%$) foi significativamente menor do que a resposta do LSFSJ na contração induzida por FEN. Para investigar o envolvimento dos canais para potássio foram utilizadas solução despolarizante de tyrode com 20 mM de KCl ou TEA em diferentes concentrações. A resposta do LSFSJ na contração induzida por solução despolarizante de tyrode com 20 mM de KCl foi significativamente atenuada ($E_{\text{máx}} = 75,9 \pm 6,0$). A resposta induzida pelo LSFSJ também foi significativamente atenuada na presença de TEA nas concentrações de 1 mM ($E_{\text{máx}} = 62,5 \pm 9,8 \%$); 3 mM ($E_{\text{máx}} = 40,9 \pm 3,8 \%$) e 5 mM ($E_{\text{máx}} = 10,3 \pm 3,7 \%$). Para investigar os subtipos de canais para potássio envolvidos na resposta foram utilizados: 4-aminopiridina, bloqueador seletivo dos canais K_V , glibenclamida ($10 \mu\text{M}$), bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} , BaCl_2 ($30 \mu\text{M}$), bloqueador seletivo dos canais K_{IR} e iberiotoxina (100 nM) ou TEA (1 mM), bloqueador seletivo dos canais BK_{Ca} . Na presença dos diferentes bloqueadores dos canais para potássio, simultaneamente, observamos uma atenuação significativa do efeito do LSFSJ ($E_{\text{máx}} = 23,9 \pm 3,4 \%$), esse efeito também foi observado na presença de 4-aminopiridina ($E_{\text{máx}} = 33,6 \pm 5,9 \%$), na presença de BaCl_2 ou glibenclamida também observamos uma atenuação do efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 73,5 \pm 6,9 \%$; $E_{\text{máx}} = 72,3 \pm 4,3 \%$) respectivamente. Contudo a incubação de iberiotoxina ($E_{\text{máx}} = 94,2 \pm 8,1 \%$) não promoveu alteração da resposta produzida pelo LSFSJ. Também investigamos o envolvimento dos canais Ca_V na resposta induzida pelo JSJ através do influxo de cálcio no qual não observamos alterações no efeito máximo contudo houve sua potencia foi alterada, além disso um ativador dos canais Ca_V do tipo-L, o S(-)-Bay K 8644, também foi utilizado o que demonstrou uma possível participação destes canais no efeito vasorrelaxante do JSJ. Em conclusão o JSJ causa hipotensão e vasorrelaxamento em ratos, e esse efeito vasorrelaxante envolve majoritariamente três subtipos de canais para potássio o K_V , o K_{ATP} e o K_{IR} sem descartar uma possível participação dos canais para Ca^{2+} .

Palavras-chave: *Syzygium jambolanum*, Polifenóis, Artéria mesentérica, Vasorrelaxamento, Canais para K^+

Abstract

ABSTRACT

PRELIMINARY STUDY OF THE VASORELAXANT EFFECT INDUCED BY *Syzygium jambolanum* LYOPHILIZED JUICE IN RATS

ASSIS, K.S.

Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Master's Thesis, CCS/UFPB (2014)

Various epidemiological studies have suggested an association between diets rich in polyphenols and a lower risk of cardiovascular disease. *Syzygium jambolanum* is rich in polyphenols, and thus, the objective of this work was to evaluate the cardiovascular effects induced by lyophilized *Syzygium jambolanum* fruit juice (LSFSJ) using *in vivo* and *in vitro* techniques. LSFSJ presented a high polyphenols content (988.55 ± 5.41 mg of Gal Acid / 100g), and the presence of flavonoids and steroids. In normotensive rats, LSFSJ (5, 10, 30, 50 and 100 mg / kg, i.v.) induced hypotension and bradycardia at the maximal dose was observed. In superior mesenteric rat artery rings pre-contracted with phenylephrine (FEN) (1 μ M), LSFSJ (1 - 5000 μ g / mL) induced concentration-dependent relaxation in the presence (MR = $105.3 \pm 3.54\%$ (EC_{50} = 1172.7 ± 116.1 μ g / mL) and absence of endothelium (MR = $106.4 \pm 4.5\%$, EC_{50} = 1506.5 ± 148.1 μ g / mL). These data suggest that the LSFSJ-induced response appears independent from endothelium released factors. All subsequent experiments were performed in the absence of endothelium. The LSFSJ contraction response induced by depolarizing tyrode solution with 60 mM KCl (MR = $28.7 \pm 2.8\%$) was significantly lower than the LSFSJ response in FEN induced contraction. To investigate the involvement of potassium channels, depolarizing tyrode solution with 20 mM KCl or TEA at different concentrations was used. The LSFSJ response in contraction induced by depolarizing tyrode solution with 20 mM KCl was significantly attenuated (MR = 75.9 ± 6.0). The LSFSJ-induced response was also significantly attenuated in the presence of TEA at concentrations of 1 mM (MR = $62.5 \pm 9.8\%$); 3mM (MR = $40.9 \pm 3.8\%$) and 5mM (MR = $10.3 \pm 3.7\%$). To investigate potassium channel subtypes involved in the response, 4-aminopyridine, a selective blocker of K_V channels, glibenclamide (10 μ M), a selective blocker of K_{ATP} channels, $BaCl_2$ (30 μ M), a selective blocker of K_{IR} and iberiotoxin channels 100 nM) or TEA (1mM), a selective blocker of BK_{Ca} channels were used. In the simultaneous presence of differing potassium channel blockers, we observed significant attenuation of the LSFSJ effect (MR = $23.9 \pm 3.4\%$), this was also observed in the presence of 4-aminopyridine (MR = $33.6 \pm 5.9\%$), and in the presence of $BaCl_2$ or glibenclamide, we also observed an attenuation of the maximum effect respectively (MR = $73.5 \pm 6.9\%$, MR = $72.3 \pm 4.3\%$). However, incubation with iberiotoxin (MR = $94.2 \pm 8.1\%$) did not promote alteration in the response produced by LSFSJ. Through calcium influx we also investigated the involvement of Ca_V channels in the JSJ-induced response; in which there were no changes in maximal effect. However, its potency was altered. Also, an activator of L-type Ca_V channels, the S (-) - Bay K 8644, was used; and demonstrated possible participation of these channels in the vasorelaxant effect of JSJ. In conclusion, JSJ causes hypotension and vasorelaxation in rats, and this vaso-relaxing effect mainly involves three subtypes of potassium channels: K_V , K_{ATP} and K_{IR} without ruling out possible participation of the channels for Ca^{2+} .

Key words: *Syzygium jambolanum*, Polyphenols, Mesenteric artery, Vasorelaxation, K^+ Channels

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh - Acetilcolina
ATP – Adenosina Trifosfato
BK_{Ca} – Canais de K⁺ de Grande Condutância Ativados por Cálcio
Ca_v – Cálcio Dependentes de Voltagem
Ca_vL - Canais para cálcio sensível à voltagem tipo L
CE₅₀ – Concentração de uma substância responsável por 50% do E_{máx}
CMLV – Célula Muscular Lisa Vascular
DC – Débito Cardíaco
DPPH[•] - 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético
E_{máx} – Efeito máximo
e.p.m. - Erro padrão da média
FC – Frequência Cardíaca
FEN – Fenilefrina
K_{ATP} – Canais para K⁺ sensíveis ao ATP
K_{IR} – Canais para K⁺ Retificadores de Entrada
K_v – Potássio Dependentes de Voltagem
LSFSJ – Liofilizado do Suco da Fruta *Syzygium Jambolanum*
NPS – Nitroprussiato de Sódio
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAM – Pressão Arterial Média
pD2 - Logaritmo negativo da EC₅₀
PE – Cateter de Polietileno
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RVPT – Resistência Vascular Periférica Total
SK_{Ca} – Canais de K⁺ de Grande Condutância Ativados por Cálcio
TBHP – *The British Herbal Pharmacopoeia*
TEA – Cloreto Tetraetilamônio
UVVis – Ultravioleta Visível
VES – Volume de Ejeção Sistólica
WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION

Observação: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonoides.....	24
Figura 2 - Frutos das <i>Syzygium jambolanum</i>	25
Figura 3 - Ilustração esquemática dos eventos envolvidos na resposta do músculo liso vascular a abertura (esquerda) e bloqueio dos canais para potássio (direita).....	29
Figura 4 - Fluxograma da preparação do liofilizado do suco da fruta <i>Syzygium jambolanum</i>	41
Figura 5 - Representação esquemática de implantação dos cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das drogas.....	45
Figura 6 - Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados.....	46
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LSFSJ sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	47
Figura 8 - Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	48
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da viabilidade do órgão e a integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional.....	49
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LSFSJ (10 – 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre o tônus intrínseco vascular. A) Anéis sem endotélio e B) Anéis com endotélio intacto.....	50
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LSFSJ (10-500µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1µM). A) Anéis com endotélio intacto e B) Anéis sem endotélio.....	51
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).....	52
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 µM), na	

presença de solução despolarizante de tyrode com 20 mM KCl (KCl 20 mM)...	53
Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da ativação direta dos canais para K ⁺ no efeito induzido pelo do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM).....	54
Figura 15 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 μg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença dos diferentes bloqueadores de canais para potássio.....	55
Figura 16 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de 1 mM de 4 – AP.....	56
Figura 17 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de 10 μM de glibenclamida.....	57
Figura 18 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de 30 μM de BaCl ₂	58
Figura 19 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de Iberotoxina (100 nM).....	59
Figura 20 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl ₂ (10 ⁻⁶ - 3x10 ⁻² M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio.....	60
Figura 21 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do LSFSJ (10 – 5000 μg/mL) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (100 nM).....	61
Figura 22: Registros originais representativos das respostas do LSFSJ(10 – 5000 μg/mL) em anéis pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença (A) ou ausência (B) do endotélio.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeitos do LSFSJ (1, 10, 30, 50 e 100 mg/kg i.v.) sobre: A) PAM (%), B) FC (%) em ratos normotensos não anestesiados..... 65
- Gráfico 2** – Efeito do LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) sobre o tônus basal em anéis da de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto ou endotélio ausente..... 66
- Gráfico 3** – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença ou ausência do endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM)..... 67
- Gráfico 4** – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM) ou pré-contraídos com KCl 60 mM..... 68
- Gráfico 5** – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM) ou pré-contraídos com KCl 20 mM..... 69
- Gráfico 6** - Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 µM), na ausência e na presença de TEA 1 mM, TEA 3 mM ou TEA 5 mM..... 70
- Gráfico 7** – Curva concentração-resposta induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 µM), na ausência e na presença de 4-AP (1 mM), glibenclamida (10 mM), BaCl₂ (30 mM) and TEA (1mM), simultaneamente..... 71
- Gráfico 8** – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo o LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 µM), na ausência e na presença de 4-aminopiridina 1 mM 72
- Gráfico 9** – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 µM), na ausência e na presença de glibenclamida 100 nM..... 73
- Gráfico 10** – Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré contraídos com FEN 1 µM na presença de BaCl₂ e na ausência..... 74

Gráfico 11 - Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 µM), na ausência e na presença de iberotoxina 100 nM.....	75
Gráfico 12 – Curvas cumulativa para CaCl ² na presença de concentrações isoladas do LSFSJ, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional (n=4).....	76
Gráfico 13 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM) ou pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644.....	77

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior.....	34
Quadro 2 – Composição da solução despolarizante de Tyrode com 20 mM KCl para artéria mesentérica superior.....	35
Quadro 3 – Composição da solução de Tyrode com 60 mM KCl para artéria mesentérica superior.....	35
Quadro 4 – Composição da solução de Tyrode livre de cálcio para artéria mesentérica superior.....	35
Quadro 5 – Composição da solução de Tyrode com KCl a 60 mM nominalmente sem cálcio para artéria mesentérica superior.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - - Análise fitoquímica do LSFSJ. (+) presente, (++) presente/média positividade, (+++) presente/ grande positividade e (-) ausente 63

Tabela 2 - Representação dos valores da determinação de teor de polifenóis totais no LSFSJ..... 63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVO	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
2.2.1 Ensaio <i>in vivo</i>	32
2.2.1 Ensaio <i>in vitro</i>	32
3 MATERIAL	34
3.1 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS.....	34
3.2 SUBSTÂNCIAS E MEIOS UTILIZADOS.....	35
3.3 OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	36
4 ANIMAIS	38
5 MÉTODOS	40
5.1 PREPARAÇÃO DO LIOFILIZADO DO SUCO DA FRUTA <i>Syzygium jambolanum</i>	40
5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	41
5.2.1 Pesquisa de alcaloides	42
5.2.2 Pesquisa de esteroides	42
5.2.3 Pesquisa de taninos	42
5.2.4 Pesquisa de flavonoides	43
5.2.5 Pesquisa de saponinas	43
5.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	43
5.3.1 Obtenção dos extratos	43
5.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais	43
5.3.3 Atividade antioxidante	44
5.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	45
5.4.1 Medida direta da PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados	45
5.4.2 Efeito induzido pelo LSFSJ sobre a PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados	46
5.5 EFEITOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	47
5.5.1 Preparações dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	47
5.5.2 Investigação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica	

sobre o tônus vascular intrínseco.....	49
5.5.3 Avaliação da atividade do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com FEN.....	50
5.5.4 Avaliação do efeito do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com solução despolarizante com 60 mM de KCL.....	51
5.5.5 Avaliação do efeito do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com solução despolarizante com 20 mM de KCl.....	52
5.5.6 Avaliação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA)	53
5.5.7 Avaliação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes bloqueadores dos canais para potássio.....	54
5.5.8 Avaliação da participação de canais para K⁺ sensível a voltagem (K_v) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	55
5.5.9 Avaliação da participação de canais para K⁺ sensível a ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato.....	56
5.5.10 Avaliação da participação de canais para K⁺ retificadores de entrada (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	57
5.5.11 Avaliação da participação de canais para K⁺ de grande condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	58
5.5.12 Efeito do LSFSJ sobre as concentrações induzidas por CaCl₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	59
5.5.13 Avaliação do efeito relaxante do LSFSJ sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis mesentéricos de ratos.....	60
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
6 RESULTADOS.....	63
6.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	63
6.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	63
6.3 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>.....	64
6.6.1 Efeito induzido pelo LSFSJ sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	64
6.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>.....	65
6.4.1 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sobre o tônus vascular intrínseco.....	65
6.4.2 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato	

pré-contraídos com FEN.....	66
6.4.3 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCL.....	68
6.4.4 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 20 mM de KCL.....	69
6.4.5 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA).....	70
6.4.6 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes bloqueadores de canais para potássio.....	71
6.4.7 Avaliação da participação de canais para K^+ sensível a voltagem (K_V) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	72
6.4.8 Avaliação da participação de canais para K^+ sensível a ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	73
6.4.9 Participação de canais de K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	74
6.4.10 Avaliação da participação dos canais para potássio de grande condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) na resposta relaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos.....	75
6.4.11 Verificação do efeito do LSFSJ sobre a curva cumulativa para o $CaCl_2$ em artéria mesentérica de ratos.....	76
6.4.12 Efeito do LSFSJ sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em artéria mesentérica de ratos.....	76
7 DISCUSSÃO.....	78
8 CONCLUSÃO.....	89
9 PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade de vida e bem-estar têm se tornado uma preocupação cada vez mais presente na sociedade; e com isso, cresce também a busca por terapias naturais. Atualmente o consumo de frutas na alimentação humana tem deixado de ser somente um prazer para tornar-se uma necessidade, não só em função dos seus nutrientes, como fibras, minerais e vitaminas, mas também devido aos seus compostos bioativos (BORGUINI, 2006), como a vitamina C, os polifenóis e os carotenoides (LEONG; SHUI, 2002). A Organização Mundial de Saúde preconiza o consumo mínimo diário de 400 g *per capita*, o equivalente a 5 porções de 80 g em média por dia, de frutas e hortaliças frescas para o alcance de seu efeito saudável e protetor de doenças crônicas (WHO, 2003).

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado, com uma produção que supera os 40 milhões de toneladas, perdendo apenas para a China e Índia. Estima-se que a produção mundial de frutas tropicais atingirá 82 milhões de toneladas em 2014, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2014). A produção de frutas tropicais no Brasil é possível graças à extensão territorial, à posição geográfica e às condições de clima e solo privilegiadas, o que torna a fruticultura presente em todas as regiões do país.

O Nordeste tem dado grande contribuição para os avanços obtidos com a fruticultura nacional. O desenvolvimento agrícola nesta região se apoia nas condições climáticas, caracterizadas pela elevada insolação durante todo o ano; e solos com boa aptidão para a irrigação, que ajudam a promover a qualidade da produção irrigada de frutas. Estas se adéquam não só às exigências dos consumidores da Europa e da América do Norte, destino das frutas exportadas, mas também às exigências do mercado interno (LACERDA et al., 2004).

As frutas, além de possuírem uma importância socioeconômica, elas são ricas fontes de vitaminas, minerais e fibras, além de conterem uma variedade de substâncias bioativas, tornando-se alimentos nutricionalmente importantes da dieta (MELO, 2008). Dentre os compostos bioativos, destacam-se os fenólicos, que representam a principal classe de metabólitos secundários presentes nas plantas e

encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os polifenóis (taninos) (SHAHIDI e NACZK, 2004).

Os flavonoides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A, B e C (Figura 1), e ocorrem naturalmente nos alimentos e vegetais, sendo, portanto, componentes usuais da dieta humana (KARAKAYA, 2004; HERTOOG et al., 1992). A sua estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), dihidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas.

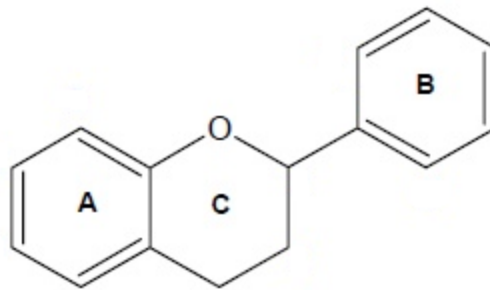


Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonoides.
Fonte: Ângelo; Jorge, 2007

Os polifenóis recentemente têm recebido grande atenção devido a sua capacidade antioxidante (reagindo com radicais livres e quelando metais) e suas possíveis implicações benéficas na saúde humana, como na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000). Vários estudos epidemiológicos têm sugerido uma associação entre dietas ricas em polifenóis e um menor risco de doenças cardiovasculares, promovendo uma redução de 9% na mortalidade causadas por estas doenças. (AUGER et.al., 2011).

Uma planta que é considerada uma rica fonte de polifenóis, incluindo casca, folha, semente e fruto, é a *Syzygium jambolanum* (RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004). A *Syzygium jambolanum* é uma árvore nativa dos trópicos, particularmente da Índia, bem como da Tailândia, Filipinas e Madagascar. A planta foi introduzida em muitas regiões tropicais como no leste e oeste da Índia e da África, e também no Brasil, sendo encontrada em diversos estados das regiões sudeste, sul, nordeste e norte. Em algumas regiões subtropicais como na Flórida e

na Califórnia, nos Estados Unidos, na Argélia e em Israel também podem ser encontrada (ROSS, 1999; ALBERTON et al., 2001; MAHMOUD et al., 2001; GROVER et al., 2001; PEPATO et al., 2004; VEIGAS et al., 2007).

Os principais sinônimos da *Syzygium jambolanum* são *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Myrtus cumini* L e *Syzygium cumini* (L.). É popularmente conhecida como jambolão, oliveira, cereja, jamelão, jalão, jambol, jambu, jambul, azeitona-do-nordeste, murta e ameixa roxa (LORENZI; MATOS, 2002). A árvore da espécie é de grande porte (10 metros de altura), com folhas simples e frutos cor roxo-escuro, com uma única semente coberta de polpa comestível, mucilaginoso, doce, mas adstringente (Figura 2)



Figura 2 - Frutos da *Syzygium jambolanum*. Fonte: <http://felixplantas.com.br>

Os frutos do jambolão são pequenos, de 2 a 3 centímetros de tamanho, com uma forma oval e coloração que varia de vermelho a preto quando maduros. São vendidos secos e sem sementes nos mercados dos Estados Unidos e em países da Europa. Os frutos maduros são também usados para a produção de bebidas saudáveis, sucos e geléias (BALIGA et al., 2011). Os frutos apresentam em sua composição vitamina C, ácido gálico, taninos, antocianidinas, incluindo cianidina, petunidina, malvidina- glicosídeo e carotenóides, como a trans-luteína e a trans- β -caroteno (BANERJEE; DASGUPTA, 2005; FARIA et al., 2011).

O jambul ou jambolão, há muitos anos tem sido utilizado na medicina tradicional indiana para o tratamento de diversas doenças como por exemplo, diabetes mellitus e como bactericida. Dados na literatura demonstram que essa planta possui propriedades hipoglicêmicas, hipotensoras, diuréticas cardiotônicas,

adstringentes, antiinflamatórias, antioxidante, neuroprotetora, antipiréticos, anticonvulsivantes, anti-hemorragicos, antiulcerosos, hepatoprotetora, carminativos e radioprotetora (MIGLIATO et al., 2007; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

Em maio de 2006 o Ministério da Saúde autorizou a Portaria n.º 971 que permite a implementação de Práticas Integrativas e Práticas Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). Posteriormente, foram criados a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2007). Em 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), contendo 71 plantas, dentre elas está a *Syzygium jambolanum* (BRASIL, 2009).

Estudos mostram que extratos preparados a partir das sementes do jambolão podem atuar como agentes quimiopreventivos contra o estresse oxidativo e o dano genômico (ARUN et al., 2011), protegem contra a toxicidade sistêmica do metil-mercúrio em ratos (ABDALLA et al., 2011), além de possuírem efeitos anti-inflamatórios (CHAUDHURI; GOMES; BHATTACHARYA., 1990).

A casca da árvore é outra parte do jambolão que também é aproveitada para fins terapêuticos. Ela é utilizada no tratamento de bronquite, inflamação na garganta e asma (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007). Estudos mostram que o extrato etanólico da casca do jambolão possui significativa atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (MURUGANANDAN et al., 2001).

O extrato aquoso das folhas possuem ações farmacológicas como atividade anti-inflamatória (LIMA et al., 2007) e antibacteriana (SHAFI et al., 2002), o extrato hidroalcoólico das folhas apresenta atividade hipoglicemiante, que tem sido investigada experimentalmente através de modelos *in vivo* (SCHOENFELDER et al., 2010), *in vitro* (BONA et al., 2010) e em modelos clínicos (TEIXEIRA et al., 2006).

Extratos preparados a partir dos frutos demonstraram ter efeitos anti-proliferativo e pró-apoptótico contra células cancerígenas de mama, mas não contra células normais de mama (LI et al., 2009), além de possuir atividade antioxidante *in vitro* (FARIA et al., 2011) e atividade anti-hiperglicêmica (SHARMA et al., 2006). A utilização dos frutos do *Syzygium jambolanum*, como oficial ou farmacopeico, é

apresentada pela *The British Herbal Pharmacopoeia* (1983) na forma de extrato seco ou hidroetanólico na proporção de 1:1 em 25% de álcool.

Sobre o sistema cardiovascular estudos realizados com o extrato hidroalcoólico das folhas secas de *Syzygium jambolanum* D.C. demonstraram atividade hipotensora em ratos normotensos e sua fração clorofórmica apresentou um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraídas com cálcio (Ribeiro., 2007). Entretanto pouco se sabe sobre as ações farmacológicas do suco deste fruto sobre o sistema cardiovascular.

O sistema cardiovascular humano é constituído por uma bomba (coração), interligado a uma série de tubos de distribuição e coleta (vasos sanguíneos), preenchidos com plasma e células (sangue). É devido a esta extensiva rede de conexões que as funções celulares, como: regulação da temperatura corporal, manutenção do balanço de fluidos, fornecimento de O₂, crescimento, desenvolvimento, absorção de nutrientes essenciais, remoção celular e de metabólitos, promovem a manutenção da homeostase celular (BERNE et al., 2009; DEVIHA; RENGARAJAN; HUSSAIN, 2013; PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000).

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial, uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico; necessitando da ação integrada de outros sistemas como o renal, neural e endócrino. (CAMPAGNOLE SANTOS; HAIBARA, 2001). A pressão arterial média (PAM) é determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT), expressa pela equação: $PAM = DC \times RVPT$ (HALL, 1999). Alterações homeostáticas no DC são resultantes de variações na frequência cardíaca (FC), no volume de ejeção sistólica (VES) ou em ambos (COWLEY, 2006). Já a resistência vascular periférica é controlada pelo tônus vascular das pequenas artérias e arteríolas (JACKSON, 2000).

O tônus vascular desempenha um importante papel na regulação e manutenção da pressão arterial (SONKUSARE et al., 2006). A regulação do tônus da célula muscular lisa vascular (CMLV) é determinada pela interação entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras geradas por estímulos variados, tais como: hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea (JACKSON, 2000a; CRIBBS, 2006). Todos estes sinais são integrados no miócito vascular para

determinar a atividade contrátil do músculo, estabelecendo assim o diâmetro e a resistência dos vasos sanguíneos (JACKSON, 2000a).

O estado de contratilidade vascular das células musculares lisas, dentro da parede dos vasos sanguíneos, é regulado pela concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Os vasoconstrictores agem elevando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bem como, aumentando a aparente sensibilidade ao Ca^{2+} dos processos contráteis na célula muscular lisa. Por outro lado, os vasodilatadores exercem efeitos opostos na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (LEDOUX et al., 2006). Os canais iônicos são importantes reguladores da contratilidade do músculo liso, pois funcionam como moduladores do potencial de membrana plasmática e das concentrações de Ca^{2+} no meio intracelular (KEVIN; NELSON, 2005).

Os canais para potássio são os canais iônicos dominantes na membrana plasmática das células musculares lisas, e a corrente através destes canais contribui substancialmente para o potencial de membrana destas (JACKSON, 2005c), sendo de grande importância na regulação do tônus da musculatura lisa (JACKSON, 2000a; JACKSON, 2001b).

A abertura de um canal para potássio provoca um efluxo de íons K^+ por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular (SOBEY, 2001). Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais para cálcio dependentes da voltagem (Ca_v) e conseqüente diminuição da entrada de íons Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento vascular (vasodilatação) (FARACI; HEISTAD, 1998; SOBEY, 2001). De forma inversa, o fechamento de um canal para potássio causa um estado de despolarização, levando a uma abertura de canais para cálcio dependentes da voltagem, aumentando assim a concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e vasoconstrição (Figura 3).

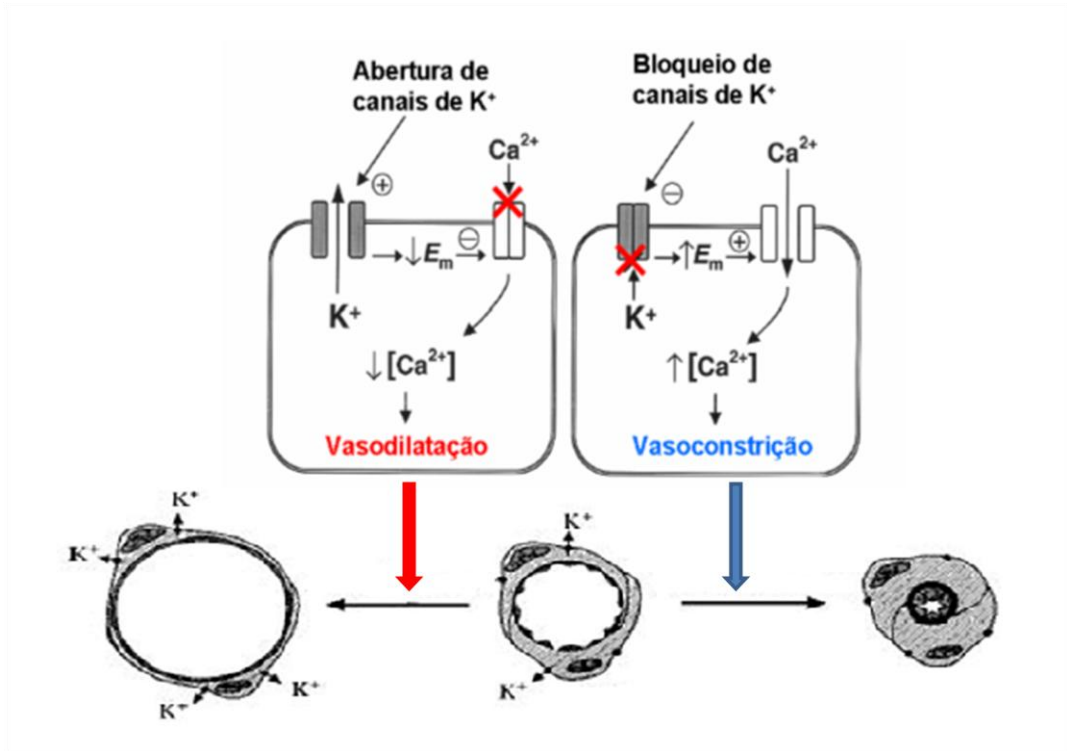


Figura 3 - Ilustração esquemática dos eventos envolvidos na resposta do músculo liso vascular a abertura (esquerda) e bloqueio dos canais para potássio (direita). Fonte: Adaptado de SOBEY, 2001; JACKSON, 2000.

A relação existente entre o influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes da voltagem e o potencial de membrana pode ser tal que variações de 3mv (despolarização ou hiperpolarização) pode aumentar ou diminuir o influxo (NELSON; QUAYLE, 1995; FARACI; HEISTAD, 1998). Pode-se deste modo concluir que a hiperpolarização da membrana através da abertura de canais iônicos, como os de potássio, constitui um mecanismo poderoso na diminuição da pressão arterial, mediante vasodilatação provocada.

Nas células musculares lisas vasculares são identificados diferentes subtipos de canais para K^+ , entre eles: canais para K^+ abertos por voltagem (K_V); canais para K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca}); canais para K^+ de grande condutância ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}); canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}); canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (THORNELOE; NELSON, 2005). Portanto, ativadores diretos de canais para K^+ ou compostos que regulem sua atividade ou sua expressão têm grande interesse terapêutico, já que as doenças cardiovasculares representam um grave problema de saúde pública e ainda constituem a principal causa de morte no mundo. De acordo com a OMS, mais de

30% dos óbitos registrados no ano de 2008 em todo o mundo foram devidos a diversas formas de eventos cardiovasculares (WHO, 2011).

As doenças cardiovasculares compreendem um grupo de doenças do coração (cardiomiopatia, disfunção isquêmica do coração, insuficiência cardíaca congestiva) e dos vasos sanguíneos (doença arterial coronariana, hipertensão e aterosclerose) (KUMAR; SINGH; BAKER, 2007). Elas estão entre as principais causas de hospitalização por doenças crônicas não transmissíveis e ocasionam custos médicos e socioeconômicos elevados para o sistema de saúde brasileiro.

Diante de todas essas considerações, sabendo-se que a *Syzygium jambolanum* foi recentemente inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009), baseando-se que este fruto é rico em polifenóis e que estes por sua vez apresentam uma forte atuação sobre as doenças cardiovasculares, é de grande importância a realização de estudos que analisem as ações farmacológicas desta fruta sobre o sistema cardiovascular, a fim de descobrir alternativas terapêuticas eficazes, seguras e de baixo custo.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito cardiovascular induzido pelo liofilizado do suco da fruta *Syzygium jambolanum* (LSFSJ) em ratos, por meio de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*, buscando elucidar os possíveis mecanismos implicados nestes efeitos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

2.2.1 Ensaio *in vivo*

Estudar os efeitos do LSFSJ, sobre a Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos não anestesiados.

2.2.2 Ensaio *in vitro*

- Avaliar a ação do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.
- *Investigar a participação* dos canais para K^+ nas respostas vasculares induzidas pelo LSFSJ.
- *Investigar a participação* dos subtipos de canais para K^+ nas respostas vasculares induzidas pelo LSFSJ
- Investigar a participação dos canais para Ca_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ

Material

3 MATERIAL

3.1 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de magnésio (MgCl₂), glicose (C₆H₁₂O₆) bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄). Todos estes sais foram obtidos da VETEC. Abaixo segue o quadro com as descrições da referida solução (Quadro 1).

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,4
Glicose	5,6

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior. Fonte: TANAKA et al., 1999

Na solução de Tyrode com 20 mM e 60 mM de KCl, foi realizado uma substituição equimolar do Na⁺ pelo K⁺, ajustando isosmoticamente a solução, conforme os quadros abaixo (Quadro 2 e 3, respectivamente):

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,4
Glicose	5,6

Quadro 2 – Composição da solução depolarizante de Tyrode com 20 mM KCl para artéria mesentérica superior. Fonte: TANAKA et al., 1999

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,4
Glicose	5,6

Quadro 3 – Composição da solução de Tyrode com 60 mM KCl para artéria mesentérica superior. Fonte: TANAKA et al., 1999

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,4
Glicose	5,6
EGTA	1,0

Quadro 4 – Composição da solução de Tyrode livre de cálcio para artéria mesentérica superior. Fonte: TANAKA et al., 1999

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,4
Glicose	5,6

Quadro 5 – Composição da solução de Tyrode com KCl a 60 mM nominalmente sem cálcio para artéria mesentérica superior. Fonte: TANAKA et al., 1999

3. 2 SUBSTÂNCIAS E MEIOS UTILIZADOS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), brometo de tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), iberiotoxina, cloreto de bário di-hidratado ($BaCl_2$), ácido 3-piridinacarboxílico-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-metil Ester (S(-) Bay K8644), acetonitrila, ácido fórmico, Folin-Ciocalteu, ácido gálico, di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH). Todos foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). Sal sódico de heparina (Roche Chemical Company, Rio de Janeiro, Brasil), tiopental sódico (Cristália, São Paulo, SP, Brasil)

Todas as substâncias foram dissolvidas em água destilada exceto a glibenclamida que foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e o S(-) Bay K8644 que foi dissolvido em etanol absoluto e diluídos em água destilada. As soluções foram mantidas de 0 a 4°C e somente retiradas no momento do experimento.

3. 3 OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

Os frutos da *Syzygium jambolanum* foram coletados no município de Marcação - PB, Brasil (06°46'12.1"S 35°01'28.7"W) e identificada pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Garcia Campo. Os frutos passaram por um processo de seleção no qual foram descartados os que apresentaram danos. Após esta triagem, passaram por um processo de lavagem e sanitização. O método de preparação está descrito no item 5.1.

Animais

4. ANIMAIS

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250 – 300 g provenientes do Biotério Prof. George Thomas, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), mantidos sob condições controle de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas) e tendo livre acesso à água e alimentação (ração Purina[®]). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB, com certidão nº 1405/13.

Métodos

5 MÉTODOS

5.1 PREPARAÇÃO DO LIOFILIZADO DO SUCO DA FRUTA *Syzygium jambolanum* (LSFSJ)

Após higienização e sanitização, os frutos tiveram as sementes removidas, sendo a casca juntamente com a polpa triturados (Philips Walita Juicer RI1858 Prata - 650W). Após trituração, o líquido obtido foi peneirado, sonicado durante 16 minutos e centrifugado (Hermle Centrífuga Universal Z326K - HERMLE Labortechnik GmbH) a 15 °C por 4800 rpm durante 1 hora. O sobrenadante foi congelado a -80 °C por 24 horas e em seguida foi liofilizado (Free Zone® Liter Benchtop Freeze Dry Systems) à temperatura de -40°C e pressão de 0,024 mbar, durante 48 horas com posterior trituração em processador doméstico tipo Mixer (Mixer Robot UP - Mallory - 170W) e congelado a -20 °C até o dia do experimento (Figura 4).

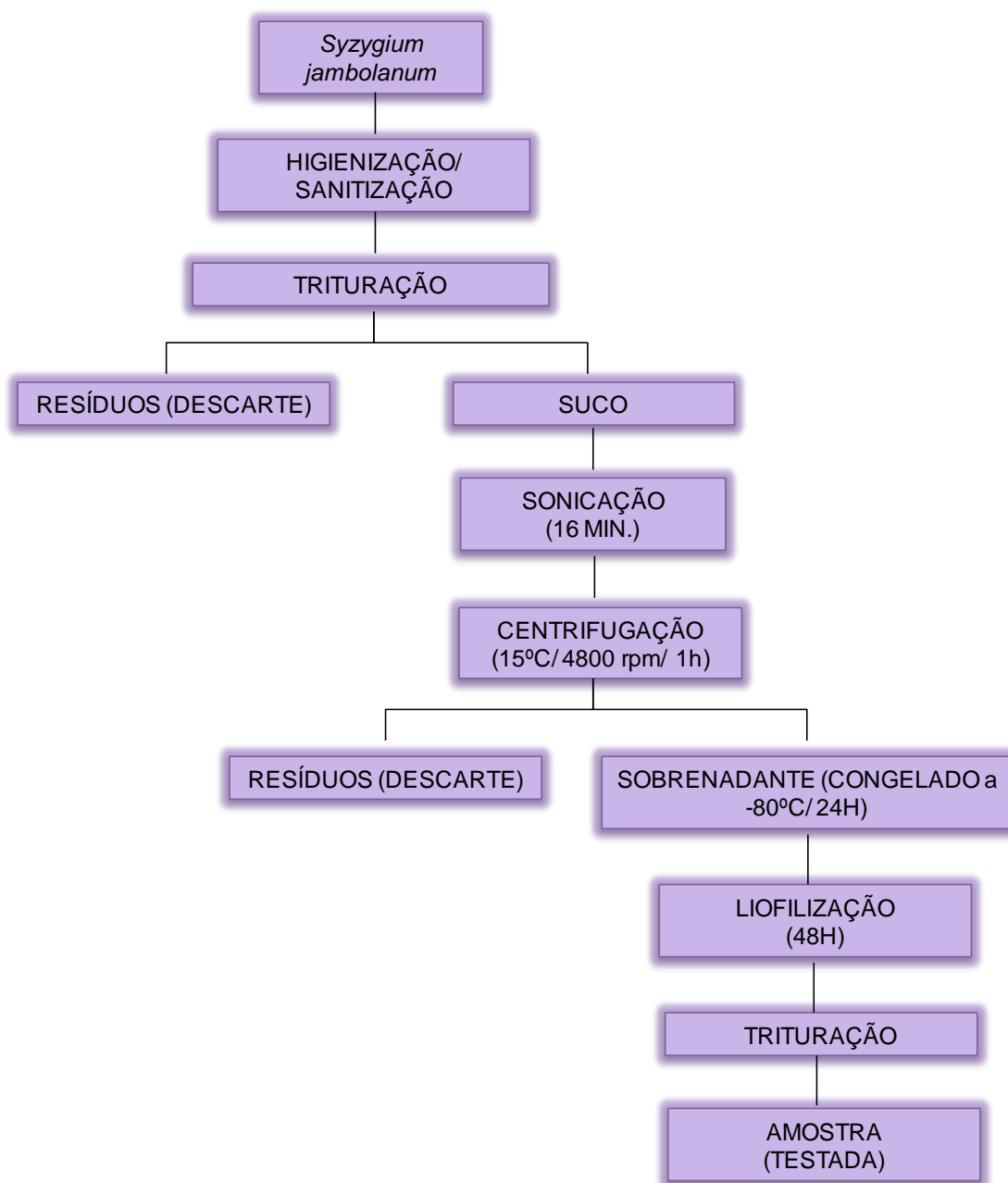


Figura 4 - Fluxograma da preparação do liofilizado do suco da fruta *Syzygium jambolanum*.(Lam) DC

5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O LSFSJ foi submetido a triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários, taninos, saponinas, esteroides, alcaloides e flavonoides de acordo com Trease e Evans (1989) e Harborne (1998), com modificação.

5.2.1 Pesquisa de alcaloides

Pesou-se 3 mg do LSFSJ e diluiu em 10 ml de água de destilada, alcalinizando-se com 0,8 mL (6 gotas) de NaOH 1%, adicionou-se 12 mL de solução água destilada: CHCl₃ (1:1), filtrou-se com algodão e em seguida separou-se a camada clorofórmica em ampola de separação. Acidificou-se a solução clorofórmica com 6 mL de HCl 1%, agitando-se e deixando decantar até apresentar-se límpido, distribuiu-se em tubos de ensaio a solução ácida sobrenadante. Adicionou-se separadamente aos tubos os reagentes Bouchardat, Mayer, Dragendorff e ácido sílico tungstico, a presença de alcaloides foi avaliada de acordo com a presença de precipitado (TREASE, EVANS 1989; HARBORNE 1998).

5.2.2 Pesquisa de esteroides

Pesou-se 3 mg do LSFSJ e diluiu em 10 ml de água de destilada, adicionou-se 2,5 mL de CHCl₃ agitou-se e distribuiu-se em tubos de ensaio: 0,12; 0,25 e 0,5 mL. Em cada tubo adicionou-se 2 mL de CHCl₃ e 1 mL de anidrido acético, agitou-se e adicionou-se 2 mL de H₂SO₄ em cada tubo agitando devagar, os resultados foram comparados com padrão de colesterol e um padrão negativo (TREASE, EVANS 1989; HARBORNE 1998).

5.2.3 Pesquisa de taninos

Pesou-se 3 mg do LSFSJ adicionou-se 10 mL de água destilada, filtrou-se com algodão. Distribuiu-se em seis tubos de ensaio, adicionando nos três primeiros gelatina 0,5% e nos outros três FeCl₃ 2% . Na Reação da gelatina a formação de precipitado indica a presença de taninos. Na Reação com sais de ferro o desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados (TREASE, EVANS 1989; HARBORNE 1998).

5.2.4 Pesquisa de flavonoides

Em ampola de separação adicionou-se 3 mg do LSFSJ, 15ml de água destilada agitando e deixando em repouso. Adicionou 15 mL de CHCl_3 e deixou-se em repouso até a separação das camadas desprezou-se a camada clorofórmica, evaporou-se o restante até a secura e adicionou-se 13 mL de MeOH dissolvendo-se, distribuiu-se em dois tubos de ensaio e adicionou-se ao primeiro tubo 0,5ml de HCl a 10% e uma fita de magnésio, deixando-se reagir. O resultado positivo pode ser observado pela coloração rósea. O segundo tubo foi submetido a secagem em banho-maria e adicionou-se 5 gotas de acetona e 0,05 mg de ácido oxálico e a mesma quantidade da ácido bórico, secou-se novamente em banho-maria por 5 minutos, e adicionou-se 10ml de Éter etílico, observando em luz Ultravioleta (UV) a presença de fluorescência (TREASE, EVANS 1989; HARBORNE 1998).

5.2.5 Pesquisa de saponinas

Dissolveu-se 3 mg do LSFSJ em 10 mL de água destilada, em tubo de ensaio, agitou-se por um minuto e deixou-se em repouso por dez minutos. O teste é considerado positivo quando a espuma permanece após o repouso (TREASE, EVANS 1989; HARBORNE 1998).

5.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 Obtenção dos extratos

Os extratos aquosos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Slinkard e Singleton, 1977, para determinação dos compostos fenólicos totais. Para isto pesou-se 50 mg LSFSJ e adicionou-se 10 mL de Milli-Q, obtendo-se uma solução de 5 mg/mL.

5.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito por Slinkard e Singleton (1977), com modificações. Uma alíquota de 300 μL de extrato aquoso (5 mg/mL) foi transferida para um tubo de ensaio contendo 60 μL de reagente Folin-Ciocalteu e 2,460 μL de água Milli-Q. A mistura foi agitada durante 1 minuto antes de serem adicionados 180 μL de Na_2CO_3 (15 %). Os conteúdos da mistura foram agitados e mantidos no escuro durante 2 horas. A absorbância foi medida a 760 nm num espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-2550, Kyoto, Japão), juntamente com o controle contendo somente água e os reagentes. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância da amostra versus uma curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico (0,001 – 0,020 mg/mL, em etanol) e expressa como miligramas de equivalentes de ácido gálico por extrato seco (mg GAE/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do LSFSJ foi determinada pelo ensaio com o DPPH[•] de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995), com modificações.

Foi preparada uma solução alcoólica contendo 0,006 mM de DPPH e armazenada à 20 ° C até a sua utilização. Em tubos de ensaios devidamente etiquetados foram adicionados quantidades apropriados do LSFSJ, em seguida foram adicionadas quantidades apropriadas de etanol e 2.700 μL da solução de DPPH. Para as amostras do LSFSJ misturou-se em volumes variados (150, 180, 210 e 240 μL) resultando em diferentes concentrações (250, 300, 350 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente. O controle consistia de 300 μL de etanol e 2.700 μL da solução de DPPH. A solução de 3 mL em tubos de ensaio foi agitada em banho ultrassônico por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, a absorbância do DPPH e do LSFSJ foram realizadas em espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-2550, Kyoto, Japão) a 517 nm. A capacidade antioxidante foi expressa como a concentração de

antioxidante necessária para reduzir a quantidade original de radicais livres de 50 % (EC_{50}), e os valores expressos em μg de LSFSJ/mL DPPH.

5.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

5.4.1 Medida direta da PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal dos animais foi realizada, separando a musculatura para localização do feixe vasculonervoso, seguido da dissecação e exposição da artéria e veia femorais (Figura 5). Cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um seguimento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na aorta abdominal e veia cava inferior via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

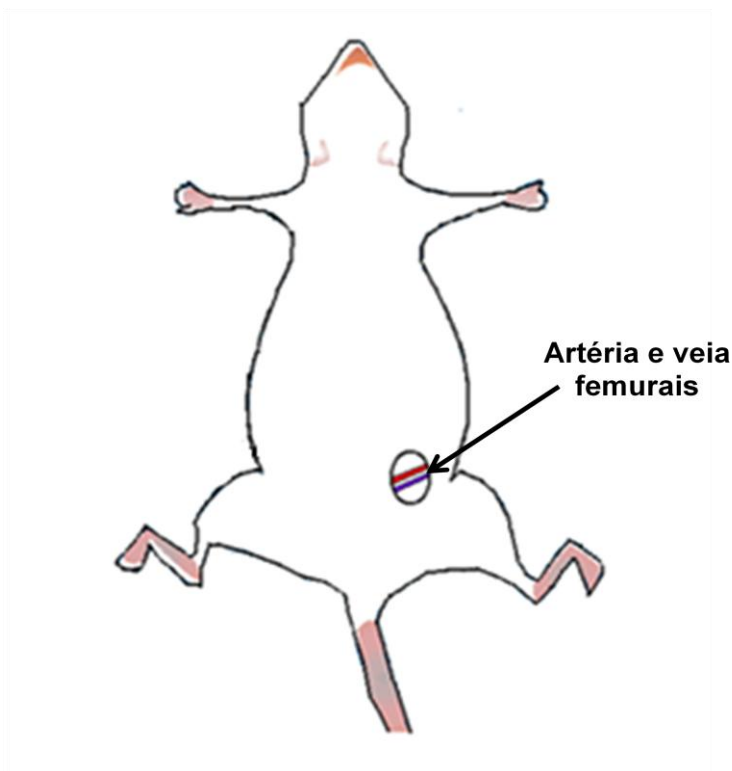


Figura 5 - Representação esquemática de implantação dos cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das drogas. Fonte: adaptado QUEIROZ, 2011

Após um período de 24 h, a PAM e FC foram aferidas pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, BELLA VISTA, NSW, AUSTRALIA) (Figura 6). O software de aquisição e análise de dados foi LabChart versão 5.0. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a pressão de pulso, PAM e FC. O cateter venoso foi utilizado para a administração das drogas. Todos os experimentos foram realizados em ratos não anestesiados.



Figura 6 – Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados.
Fonte: ALMEIDA, M. M., 2014

5.4.2 Efeito induzido pelo LSFSJ sobre a PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, foi administrado Nitroprussiato de Sódio (NPS) (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), um doador clássico de NO, para verificar a correta implantação do cateter venoso.

Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos, doses do LSFSJ (5, 10, 30, 50, 100 mg/kg i.v.) foram administradas de forma randômica. Cada dose só foi administrada após o retorno da FC e PAM aos valores basais. Os valores de PAM, FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração do

LSFSJ (Figura 7). As variações foram expressas em porcentagem para cada dose, calculadas por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Resposta PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM depois} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

$$\text{Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC depois} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

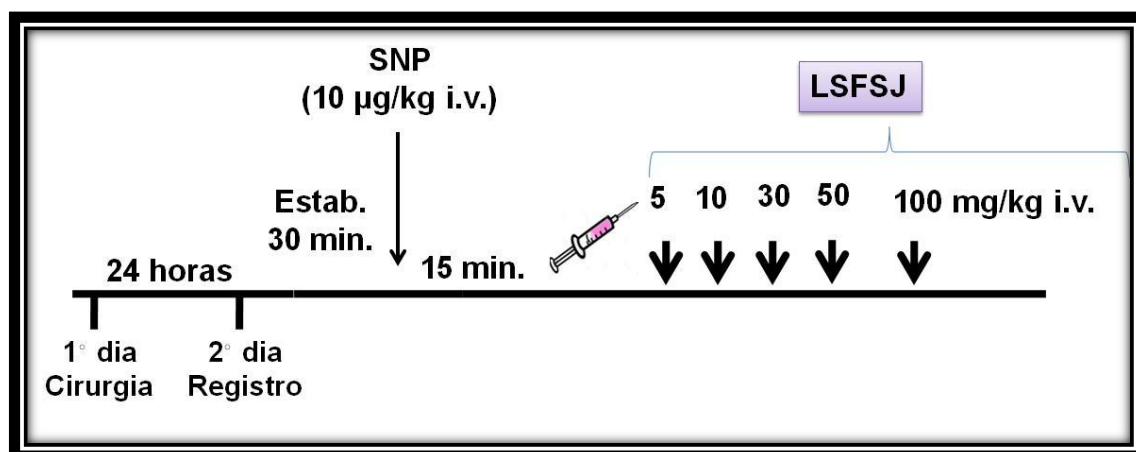


Figura 7 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LSFSJ sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.

5.5 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

5.5.1 Preparações dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para a realização dos experimentos os ratos foram eutanasiados, de acordo com a recomendação publicada no *site* deste comitê, por decapitação em guilhotina.

Após identificação, a artéria mesentérica superior foi retirada através de uma laparotomia e seccionada em anéis de 1 - 2 mm. Os anéis livres de tecido conjuntivo e adiposo foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode (TANAKA et al., 1999), a 37 °C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália), que se encontra acoplado a

um sistema de aquisição de dados (ML870/P com LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália) para o registro das tensões isométricas (Figura 8). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos indesejáveis (ALTURA; ALTURA, 1970).



Figura 8 - Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Fonte: Assis, K., S., 2014

Em todos os protocolos experimentais, após o período de estabilização de 60 minutos, a viabilidade do tecido e a integridade do endotélio foram verificadas através de uma pré-contração do tecido com Fenilefrina (FEN) 10 μM , um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (BYLUND, 1992; BÜSCHER et al., 1999). No componente tônico desta contração, adicionou-se um agonista não seletivo dos receptores muscarínicos, Acetilcolina (ACh) 10 μM com o intuito de avaliar a integridade do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Os tecidos nos quais a ACh reverteu o tônus induzido pela FEN por mais que 90% foram designados com endotélio funcional (Figura 9A) e nos tecidos no qual a ACh causou reversão menor que 10% foram designados com endotélio desnudo (Figura 9B) (BROCHET; LANGTON, 2006). Os anéis sem endotélio foram obtidos

mecanicamente por meio do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. Os anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram descartados.

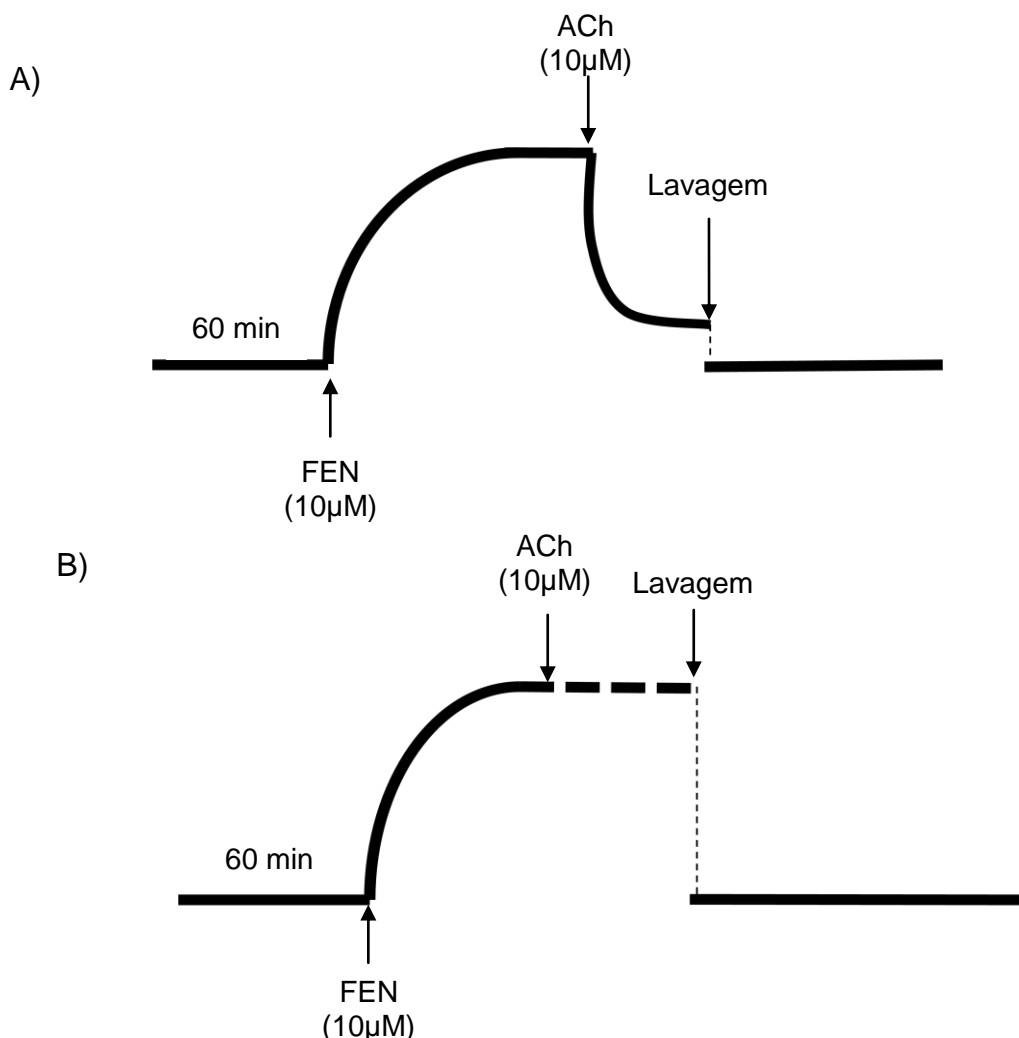


Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da viabilidade do órgão e a integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional.

5.5.2 Investigação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica sobre o tônus vascular intrínseco

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio vascular como descrito no item 5.5.1, as preparações foram lavadas com solução Tyrode até atingirem o tônus basal. A partir deste ponto, concentrações crescentes e cumulativas (10 – 5000 µg/mL) do LSFSJ foram adicionadas às preparações tanto na ausência como na presença do endotélio, ambos no tônus basal, com a finalidade de avaliar o efeito do LSFSJ sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 10A e 10B).

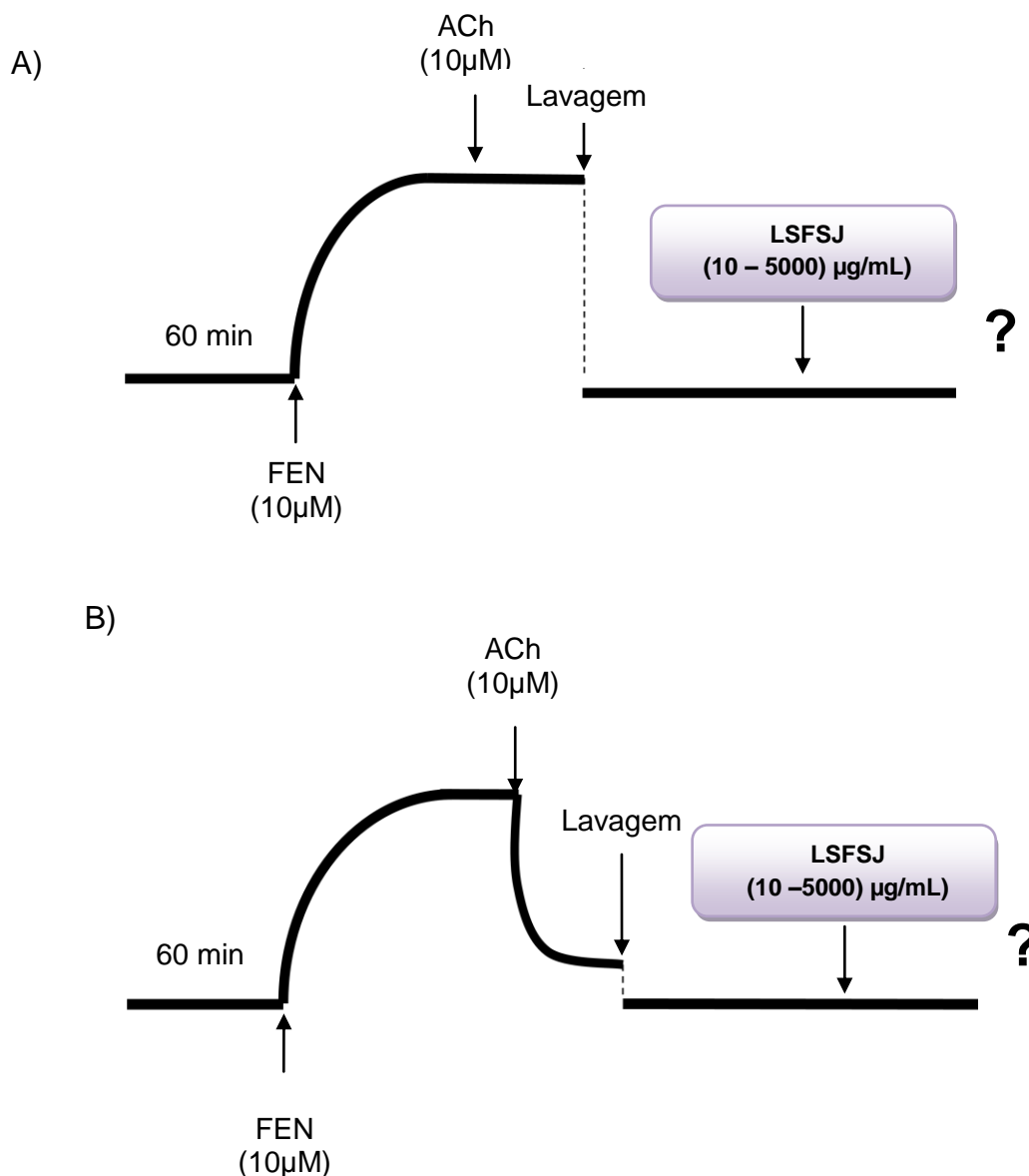


Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de LSFSJ (10 – 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre o tônus intrínseco vascular. A) Anéis sem endotélio e B) Anéis com endotélio intacto.

5.5.3 Avaliação da atividade do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contráidas com FEN

Após a verificação do órgão e da presença ou ausência do endotélio, como descrito no item 5.5.1, as preparações foram submetidas a um processo de estabilização, por aproximadamente 30 minutos, e uma segunda contração de FEN (1 µM) foi induzida, no componente tônico desta contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas (10 – 5000 µg/mL) do LSFSJ a fim de obter uma curva concentração-resposta. O efeito vasorrelaxante do LSFSJ foi avaliado em

anéis com o endotélio funcional (Figura 11A) e em anéis com o endotélio removido (Figura 11B). A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} (concentração de uma substância responsável por 50% do efeito máximo) e o $E_{máx}$ (efeito máximo), respectivamente.

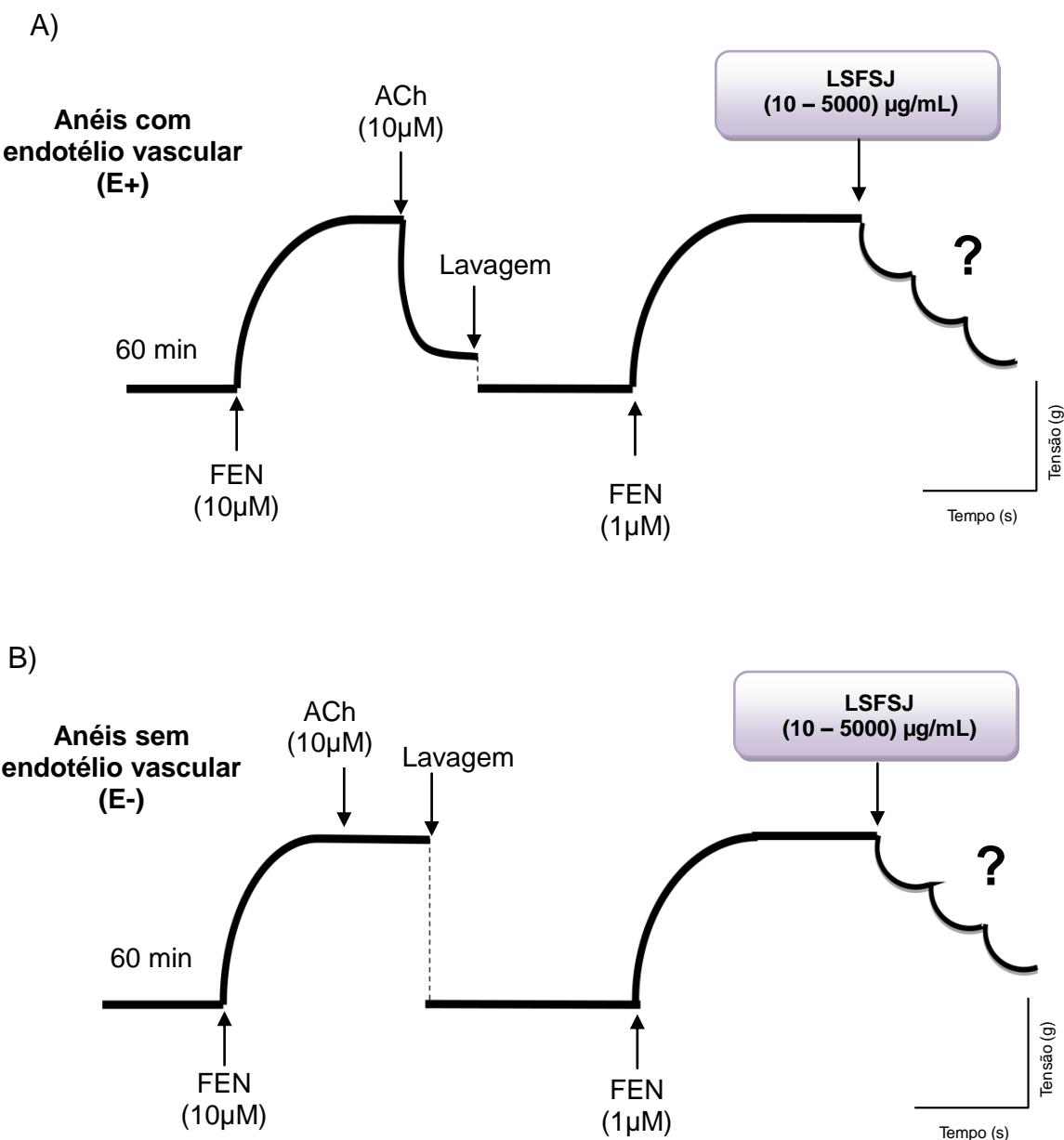


Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M). A) Anéis com endotélio intacto e B) Anéis sem endotélio.

5.5.4 Avaliação do efeito do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com solução despolarizante com 60 mM de KCl

Para investigar a resposta vasorrelaxante do LSFSJ sobre a contração induzido por um agente despolarizante, foi utilizada uma solução com 60 mM de KCl (Quadro 3). O tyrode modificado com 60 mM de KCl, promove uma despolarização da membrana plasmática, levando à ativação dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) e, conseqüentemente, à contração do músculo liso vascular (CHEN; REMBOLD, 1995; KRAVTSOV et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, a solução de Tyrode normal foi substituída por uma solução de Tyrode com 60 mM KCl. No componente tônico desta contração, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do LSFSJ (10 – 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 12). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $\text{E}_{\text{máx}}$, respectivamente.

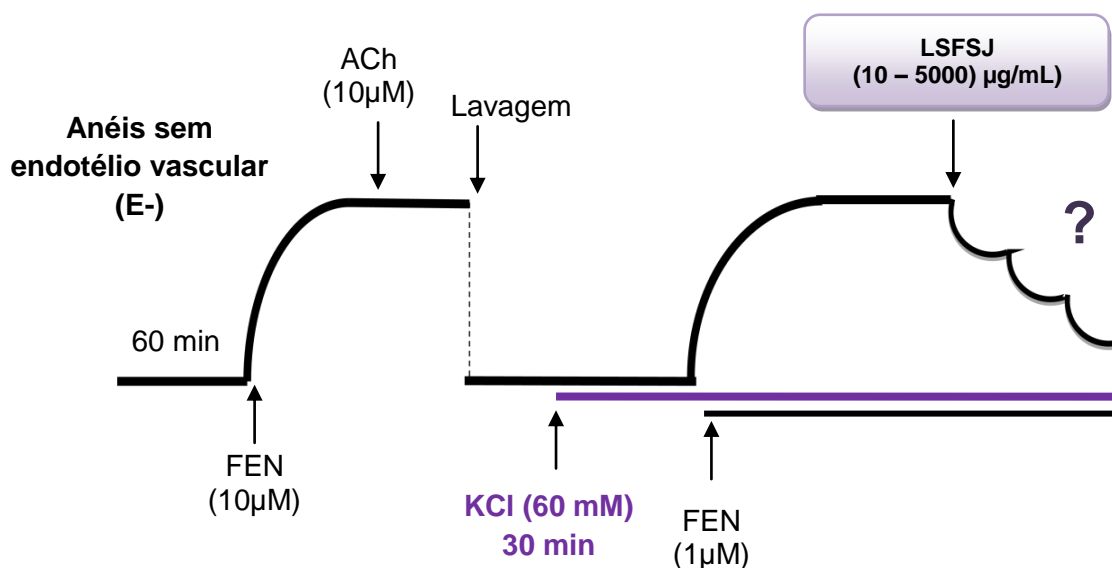


Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).

5.5.5 Avaliação do efeito do LSFSJ sobre anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com solução despolarizante com 20 mM de KCl

Para avaliar a participação dos canais para K^+ no efeito induzido pelo LSFSJ, utilizou-se uma solução de Tyrode modificada com 20 mM de KCl (Quadro 2). O aumento da concentração externa de K^+ de 4 mM para 20 mM, são suficientes para impedir parcialmente o efluxo de K^+ , e atenuar vasorrelaxamentos mediados

pela abertura de canais de K^+ (CAMPBELL; HARDER, 1996; CLARK; FUCHS, 1997).

Após esse período uma contração foi induzida com FEN ($1 \mu\text{M}$) e no componente tônico desta foram colocadas concentrações crescentes e cumulativas do LSFSJ ($10 - 5000 \mu\text{g/mL}$) (Figura 13). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $E_{\text{máx}}$, respectivamente

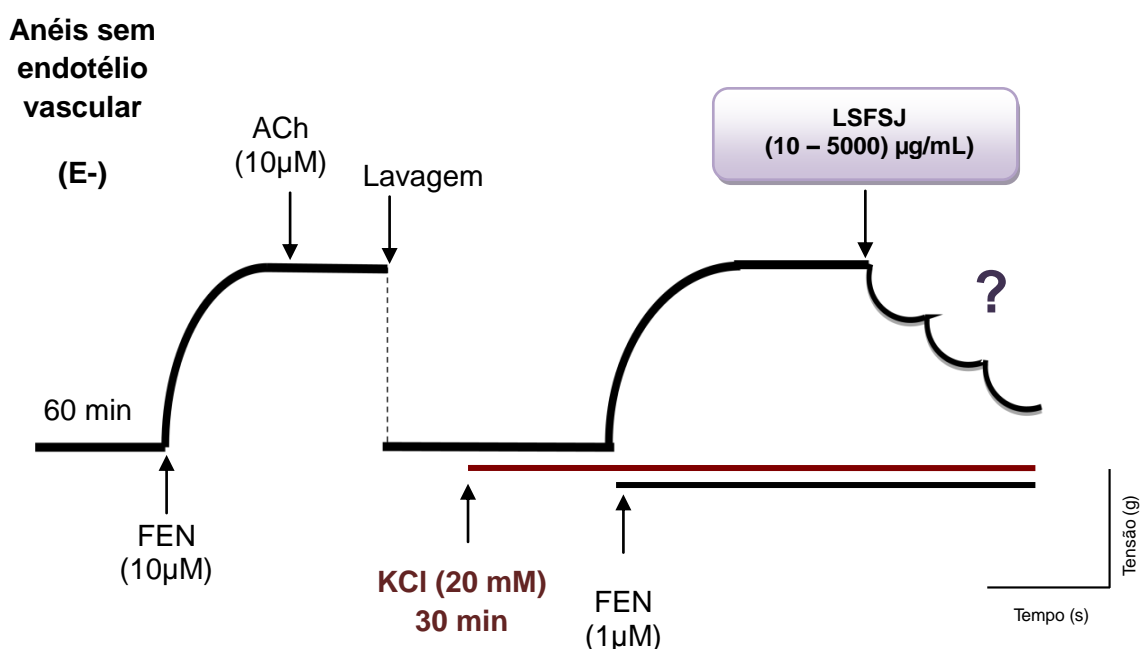


Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ ($10 - 5000 \mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$), na presença de solução despolarizante de tyrode com 20 mM KCl (KCl 20 mM).

5.5.6 Avaliação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA)

Com intuito de confirmarmos a participação dos canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzido LSFSJ, foi utilizado TEA em diferentes concentrações ($1, 3$ e 5 mM) que bloqueiam canais para potássio (ADARAMOYE; MEDEIROS, 2009; RIBEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2011; WANG et al., 2008).

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, as preparações foram incubadas durante 30 minutos com 1 mM , 3 mM ou 5 mM de TEA. Após esse período uma contração foi induzida com FEN ($1 \mu\text{M}$) e no componente tônico desta foram

colocadas concentrações crescentes e cumulativas do LSFSJ (10 – 5000 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 14). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $E_{\text{máx}}$, respectivamente.

**Anéis sem
endotélio vascular
(E-)**

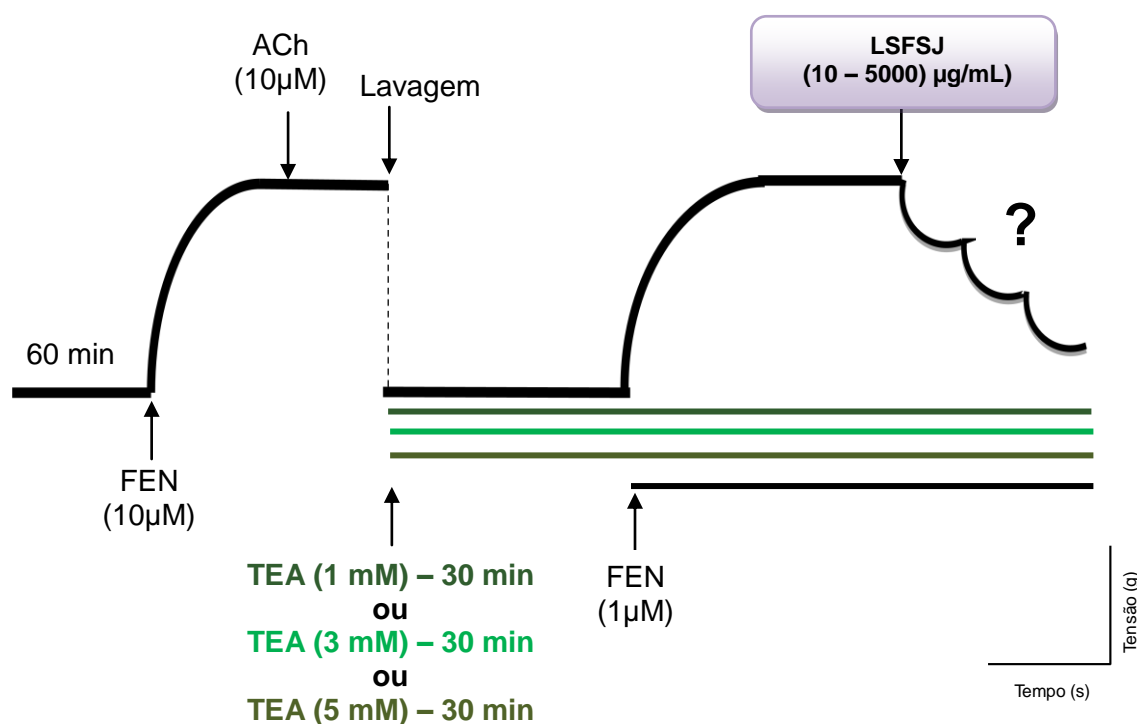


Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contráidos com FEN (1 μM), na presença de 1, 3 ou 5 mM de TEA.

5.5.7 Avaliação do efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes bloqueadores dos canais para potássio

Com intuito de confirmarmos a participação dos canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzido LSFSJ, foram utilizados diferentes bloqueadores dos canais para potássio, simultaneamente.

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, as preparações foram incubadas durante 30 minutos com 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador seletivo dos canais K_V , glibenclâmida (10 μM), bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} , BaCl_2 (30 μM), bloqueador seletivo dos canais K_{IR} e TEA (1 mM), que nesta concentração é

conhecido por bloqueador dos canais BK_{Ca} , esse bloqueadores foram utilizados simultaneamente.

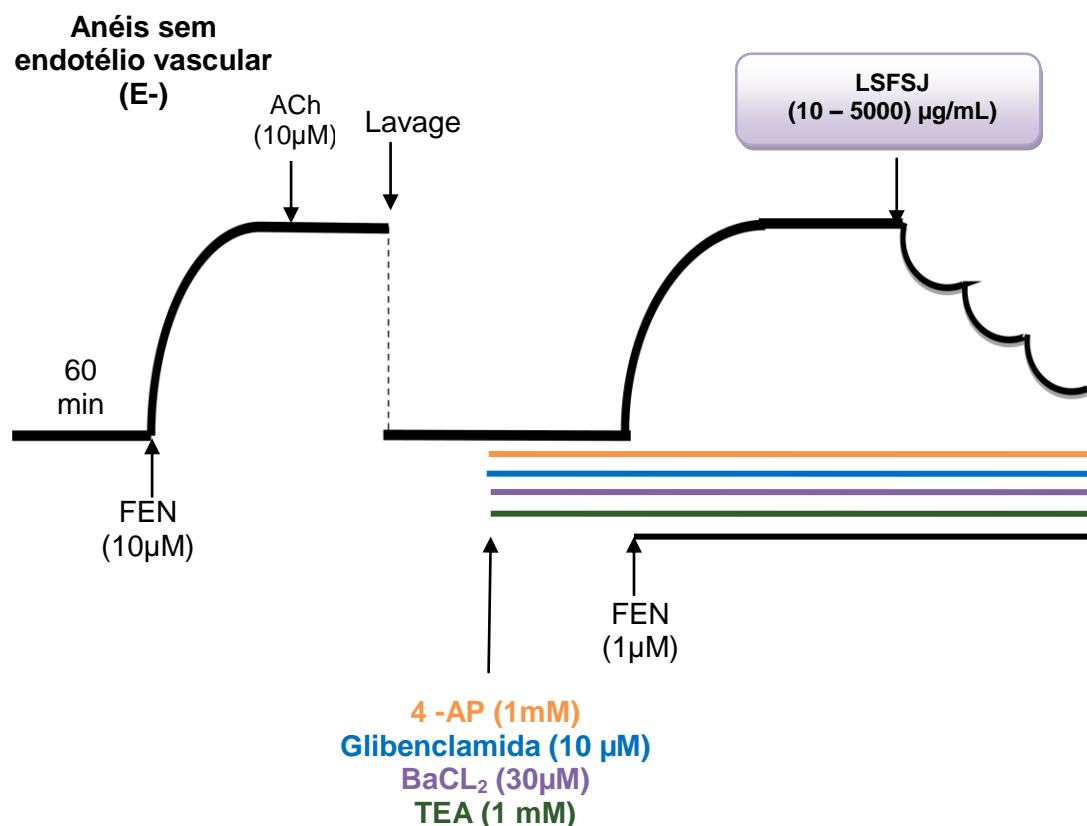


Figura 15 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 µM), na presença dos diferentes bloqueadores de canais para potássio.

5.5.8 Avaliação da participação de canais para K^+ sensível a voltagem (K_v) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Para a verificação do envolvimento dos canais K_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ, utilizou-se o 4-aminopiridina, um inibidor específico desses canais (MENEZES et al., 2007).

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados com 1 mM de 4-aminopiridina, e após 30 minutos de incubação, uma nova contração tônica foi induzida com FEN (1 µM), em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do LSFSJ (Figura 16). A potência e eficácia do

vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

Anéis sem endotélio vascular (E-)

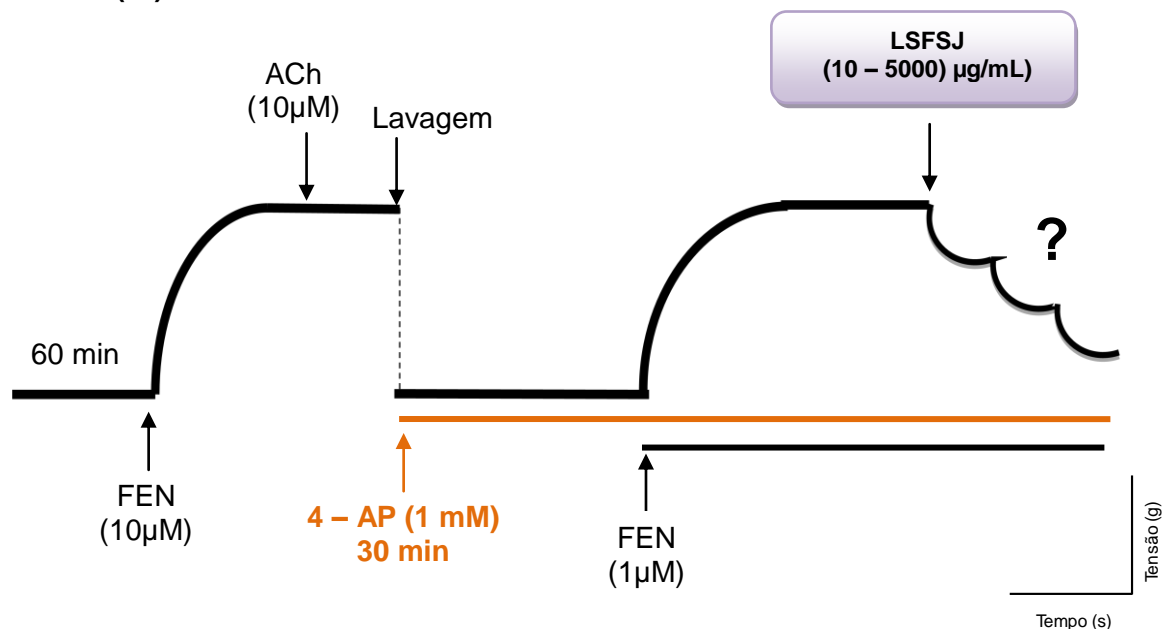


Figura 16 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 µM), na presença de 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP).

5.5.9 Avaliação da participação de canais para K^+ sensível a ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Com o intuito de avaliarmos uma possível participação dos canais para potássio sensíveis a ATP no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ, os anéis foram incubados por 30 minutos com glibeclamida (10 µM), um inibidor desses canais (MENEZES et al., 2007).

Após este procedimento, uma nova contração foi induzida com FEN (1 µM) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do LSFSJ (Figura 17). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

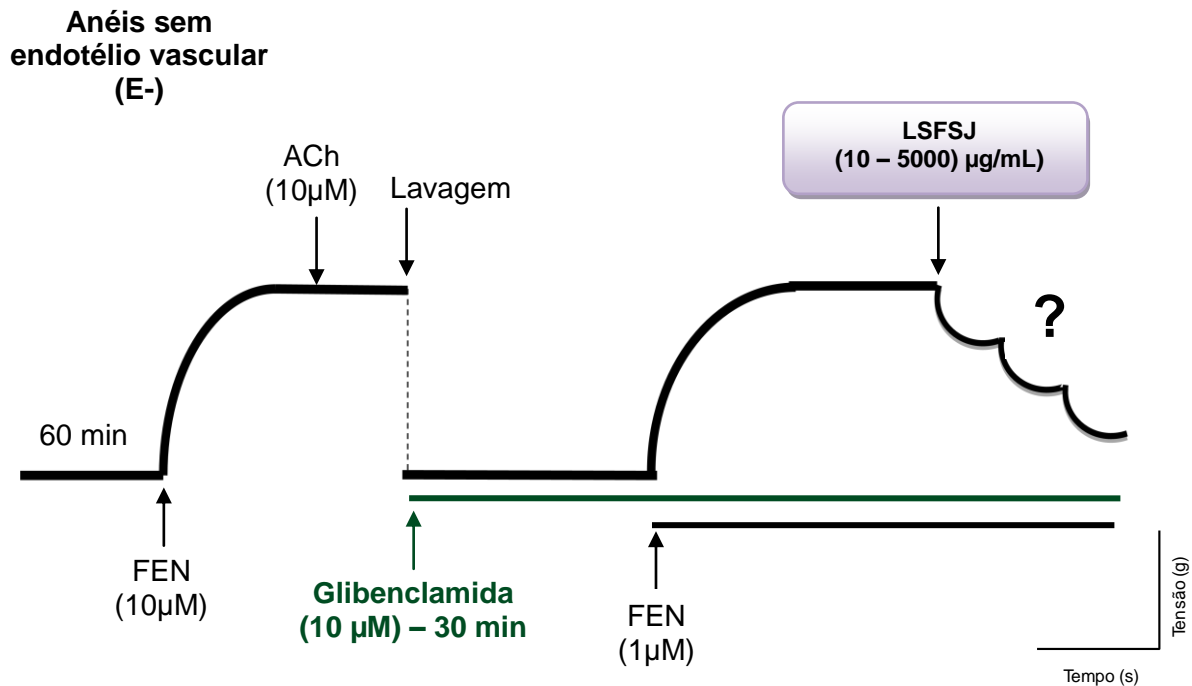


Figura 17 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de 10 μ M de glibenclamida

5.5.10 Avaliação da participação de canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Para investigar a participação de canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) sobre o efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ, utilizou-se $BaCl_2$, um inibidor seletivo dos canais K_{IR} (CHROSSOBOLIS, 2000).

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados com 30 μ M de $BaCl_2$, após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 μ M) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do LSFSJ (Figura 18). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

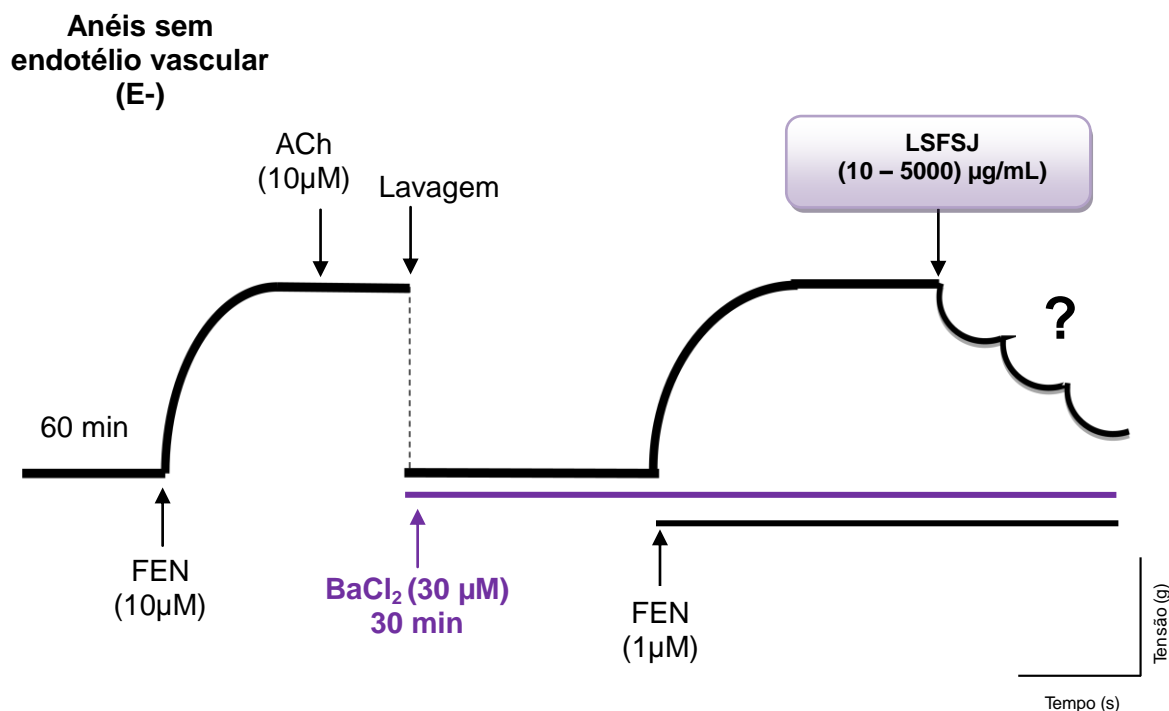


Figura 18 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de 30 μ M de BaCl₂

5.5.11 Avaliação da participação de canais para K⁺ de grande condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

A fim de avaliarmos a participação de canais para K⁺ de grande condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ, utilizou-se a iberiotoxina (100 nM), um bloqueador seletivo dos canais para K⁺ sensível ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) (WHITE et al., 2002; SILVA et al., 2011).

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados com 100 nM de iberiotoxina, Após esse período uma contração foi induzida com FEN (1 μ M) e no componente tônico desta foram colocadas concentrações crescentes e cumulativas do LSFSJ (Figura 19). A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de CE₅₀ e E_{máx}, respectivamente.

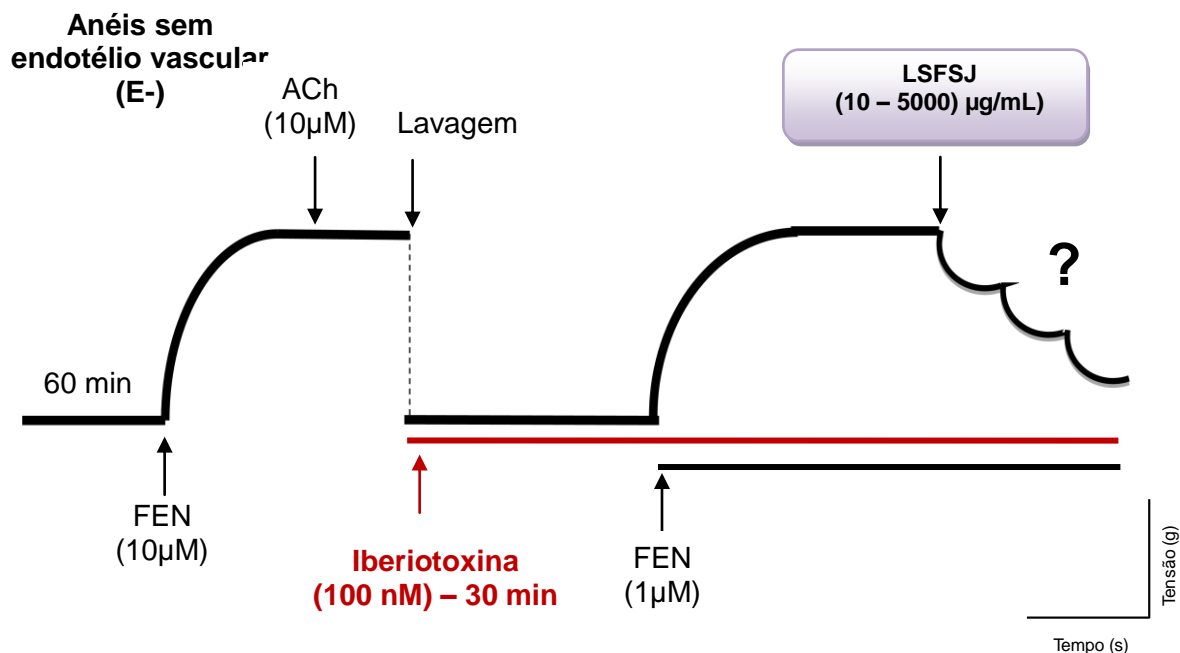


Figura 19 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LSFSJ (10 – 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contráidos com FEN (1 µM), na presença de Iberiotoxina (100 nM).

5.5.12 Efeito do LSFSJ sobre as concentrações induzidas por $CaCl_2$ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional a solução de Tyrode foi substituída por uma solução despolarizante contendo 60 mM de KCl (contração de referência). As preparações foram lavadas com solução Tyrode livre de Ca^{2+} (Quadro 4) e nela mantidas por 15 minutos. Em seguida, os anéis foram expostos a solução despolarizante com 60 mM de KCl nominalmente sem Ca^{2+} (Quadro 5) por 15 minutos, e uma curva concentração-resposta cumulativa foi obtida pela adição cumulativa de $CaCl_2$ (10^{-6} - 3×10^{-2} M) ao meio. O processo foi novamente repetido, sendo que concentrações isoladas do LSFSJ (3000 µg/mL e 5000 µg/mL) foram incubadas as preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca^{2+} e uma nova curva concentração resposta ao $CaCl_2$ (10^{-6} - 3×10^{-2} M) foi obtida (Figura 20). Os resultados foram analisados comparando-se os efeitos máximos ($E_{máx}$) obtidos das curvas com $CaCl_2$ na ausência (controle) e na presença das diferentes concentrações do LSFSJ.

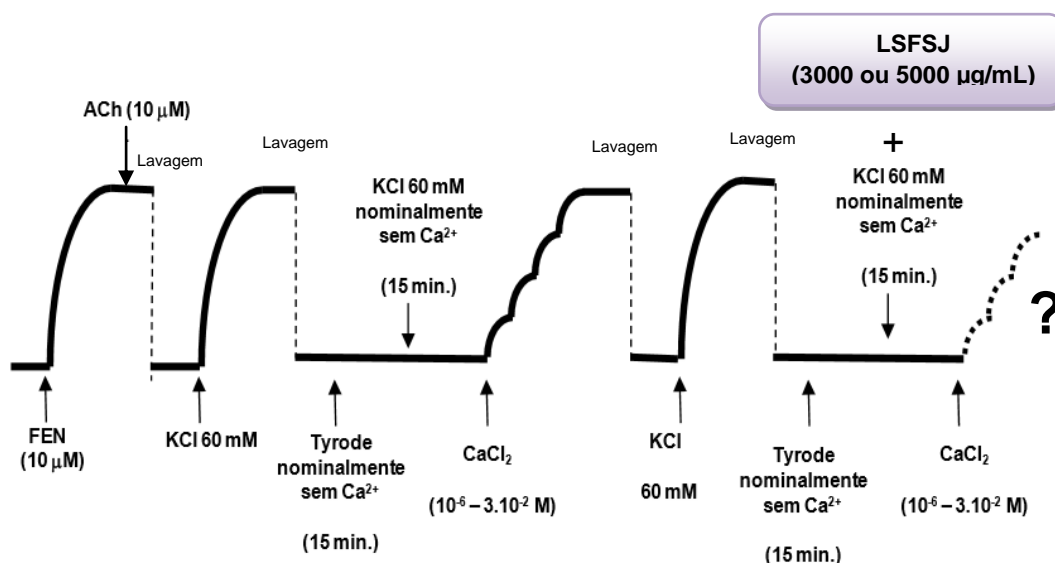


Figura 20 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do LSFSJ sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio.

5.5.13 Avaliação do efeito relaxante do LSFSJ sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis mesentéricos de ratos

Para avaliar o efeito do LSFSJ sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos sem o endotélio funcional, foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANES et al., 1999). Devido uma despolarização parcial ser necessária para obtenção da resposta ao S(-)-Bay K 8644, a resposta contrátil a esse agonista foi obtida em meio a uma solução despolarizante de tyrode com 20 mM de KCl (Quadro 2) (SCHRAMM et al., 1983; DAVIE et al., 1998). Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de tyrode com 20 mM de KCl durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (100 nM) e na fase tônica desta contração, foram adicionadas à cuba concentrações crescentes e cumulativas do LSFSJ (10 – 5000 $\mu\text{g/mL}$) a fim de obtermos uma curva concentração-resposta (Figura 21).

**Anéis sem
endotélio vascular
(E-)**

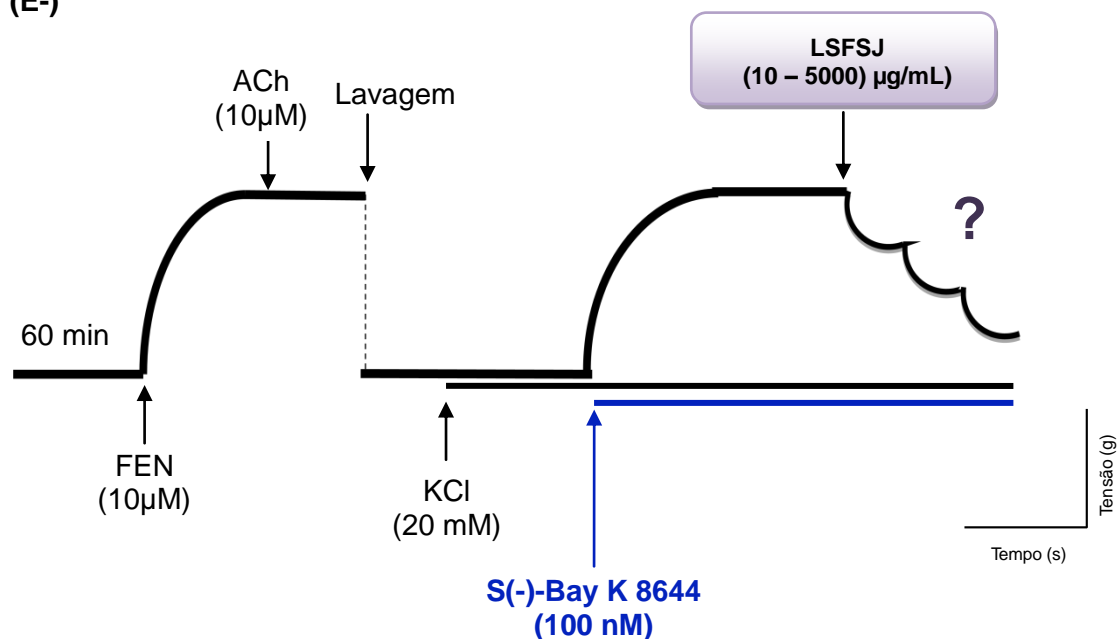


Figura 21 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do LSFSJ (10 – 5000 μg/mL) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (100 nM).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$. As comparações estatísticas entre duas variáveis foram realizadas por meio da utilização do teste t de *Student* não pareado. Para as análises de mais de duas variáveis foi utilizado o teste ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Bonferroni.

Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{m\acute{a}x}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento e de contração), de CE_{50} (concentração de uma substância responsável por 50% do $E_{m\acute{a}x}$) e de pD_2 (logaritmo negativo da CE_{50}) foram obtidos por regressão não linear. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O *screening* fitoquímico do LSFSJ revelou a presença de esteroides e flavonoides (Tabela 1).

Metabólitos secundários	Alcaloides	Esteroides	Taninos	Flavonoides	Saponinas
LSFSJ	-	++	-	+++	-

Tabela 1 - Análise fitoquímica do LSFSJ. (+) presente, (++) presente/média positividade, (+++) presente/ grande positividade e (-) ausente

6.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A curva de calibração obtida das soluções com diferentes concentrações de ácido gálico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 15%, com espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm, apresentou equação $Abs = 0,0739x + 0,0371$ com $R^2 = 0,9978$. A partir dos dados de absorção do LSFSJ com reagente de Folin-Ciocalteu, obteve-se as concentrações de polifenóis apresentadas na (Tabela 2), a média do teor de polifenóis presentes no LSFSJ foi de $988,55 \pm 5,41$ mg de Ác. Gal/100g.

Amostra	Abs	Fenólicos(mg Ác Gál/100g)
1	0,404	992,96
2	0,400	982,14
3	0,402	987,55

Tabela 2 - Representação dos valores da determinação de teor de polifenóis totais no LSFSJ realizado em triplicata

A atividade antioxidante foi demonstrada através da capacidade do LSFSJ em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), esse é um dos

métodos mais utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante. Nesse estudo o LSFSJ apresentou uma CE_{50} de $302.95 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$.

6.3 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

6.3.1 Efeito induzido pelo LSFSJ sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados

Após o período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, a administração *in bolus* e de maneira randômica do LSFSJ (5; 10; 30, 50 e 100 mg/kg) promoveu hipotensão (-5.2 ± 0.6 , -7.9 ± 0.7 ; -10.0 ± 1.2 ; -11.5 ± 1.1 , -15.8 ± 2.8 , respectivamente) e na dose máxima 100mg/Kg observou-se bradicardia ($0,3 \pm 1.5$; 2.0 ± 2.3 ; 0.9 ± 2.0 ; 1.2 ± 2.5 ; -41.6 ± 11.6 ; respectivamente) (Gráfico 1).

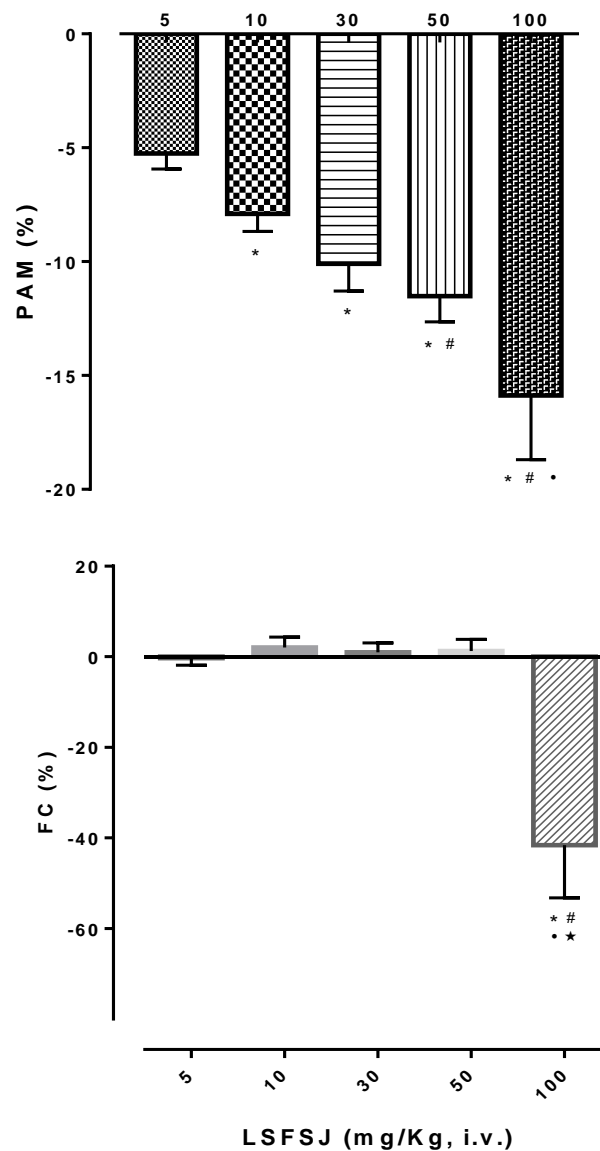


Gráfico 1 – Efeitos do LSFSJ (5, 10, 30, 50 e 100 mg/kg i.v.) sobre: A) PAM (%), B) FC (%) em ratos normotensos não anestesiados (n =6). Os valores foram expressos como a média \pm S.E.M. Foi utilizado teste “two-way” ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni’s post-test, *p < 0,05 (vs. 5 mg/kg), #p < 0,05 (vs. 10 mg/kg), •p<0,05 (vs. 30 mg/kg), ★p<0,05 (vs.50mg/Kg).

6.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

6.4.1 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sobre o tônus vascular intrínseco

A administração cumulativa do LSFSJ (10-5000 μ g/mL), nas preparações de anéis com endotélio intacto ou em anéis com endotélio ausente, não alterou o tônus muscular espontâneo (Gráfico 2).

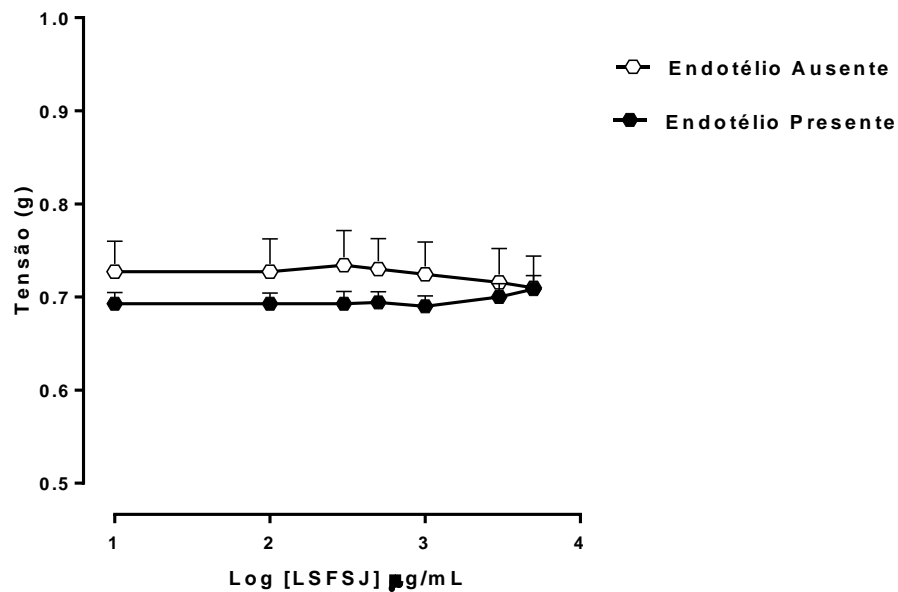


Gráfico 2 – Efeito do LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) sobre o tônus basal em anéis da de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto (●) ou endotélio ausente (○), (n= 7)

6.4.2 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato pré-contraindidos com FEN

Em anéis pré-contraindidos com FEN (1 µM), a adição cumulativa do LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) promoveu um vasorrelaxamento, em anéis com endotélio intacto ($E_{máx} = 105.3 \pm 3.54 \%$; $CE_{50} = 1172.7 \pm 116.1 \mu\text{g/mL}$, $n = 7$), de maneira dependente de concentração. A remoção mecânica do endotélio não alterou a resposta relaxante induzida pelo LSFSJ ($E_{máx} = 106.4 \pm 4.5 \%$; $CE_{50} = 1506.5 \pm 148.1 \mu\text{g/mL}$, $n = 6$) (Gráfico 3).

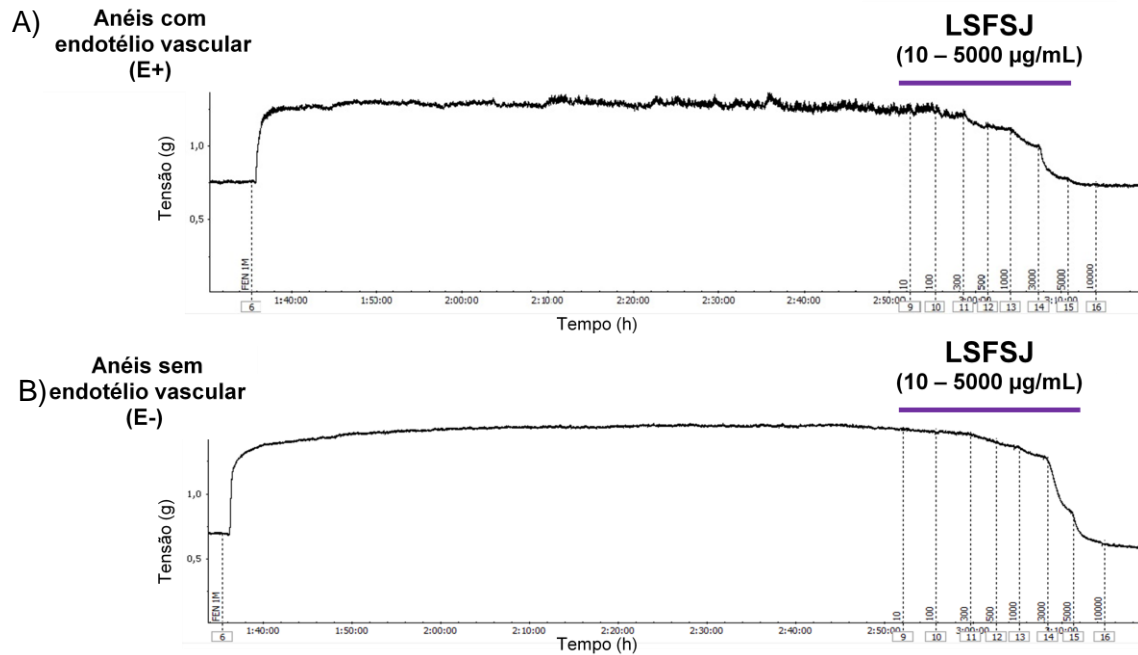


Figura 22: Registros originais representativos das respostas do LSFSJ(10 – 5000 µg/mL) em anéis pré-contraídos com FEN (1 µM), na presença (A) ou ausência (B) do endotélio

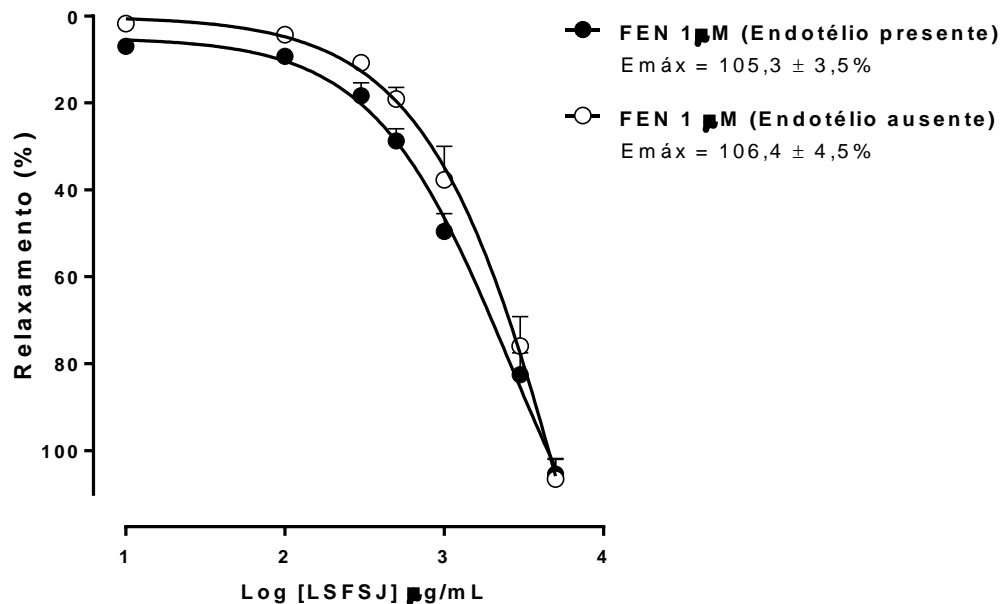


Gráfico 3 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (●) ou ausência (○) do endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM), (n = 7 e 6, respectivamente). Os valores foram expressos como média ± e.p.m.

6.4.3 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl

Em anéis mesentéricos, na ausência do endotélio vascular, pré-contraídos com uma solução despolarizante de 60 mM de KCl, a resposta vasorrelaxante produzida pela adição cumulativa do LSFSJ foi atenuada significativamente ($E_{\text{máx}} = 28.7 \pm 2.8\%$, $n = 6$), quando comparada aos anéis pré-contraídos com FEN ($E_{\text{máx}} = 106.4 \pm 4.5\%$; $n = 6$) (Gráfico 4).

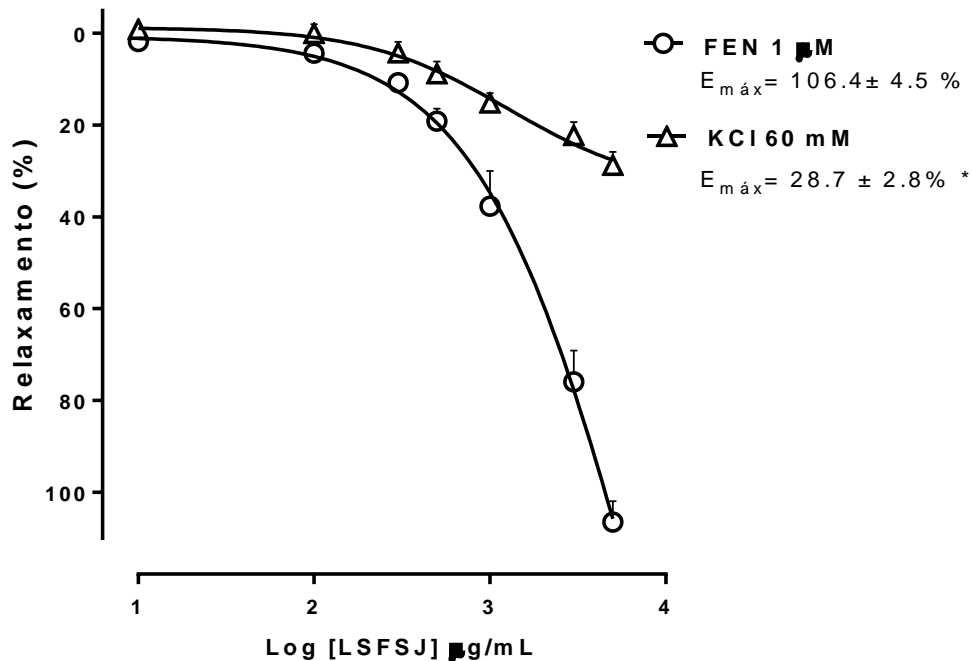


Gráfico 4 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 µg/mL) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM) (○) ou pré-contraídos com KCl 60 mM (△) ($n = 8$ e 6 , respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 µM

6.4.4 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 20 mM de KCl

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 μ M), a pré-incubação por 30 minutos com uma solução Tyrode modificada com 20 mM de KCl promoveu uma atenuação do vasorrelaxamento induzido pela adição cumulativa do LSFSJ, de maneira significativa ($E_{m\acute{a}x} = 75.9 \pm 6.0\%$; $n = 5$), quando comparado com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 106.4 \pm 4.5\%$; $n = 6$) (Gráfico 5).

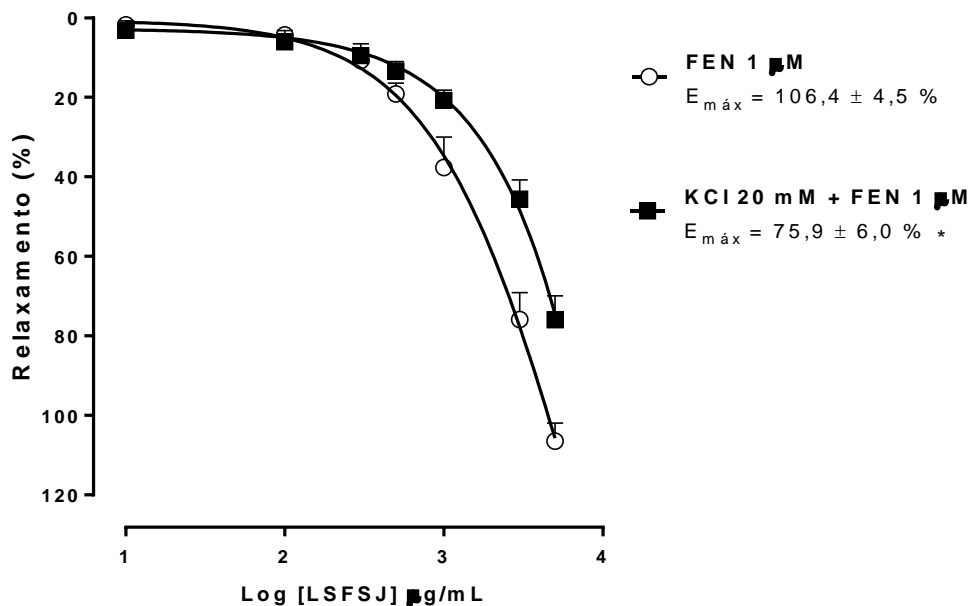


Gráfico 5 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) (\circ) ou pré-contraídos com KCl 20 mM (\blacksquare) ($n = 6$ e 5 , respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μ M

6.4.5 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA)

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 μ M), a pré-incubação por 30 minutos de TEA (1, 3 ou 5 mM), mostrou uma atenuação significativa na curva concentração-resposta produzida pelo LSFSJ, sendo essa atenuação dependente de concentração de ($E_{m\acute{a}x} = 62.5 \pm 9.8\%$; $n = 8$; $40.9 \pm 3.8\%$ %; $n = 7$ e $10.3 \pm 3.7\%$; $n = 5$), respectivamente (Gráfico 6).

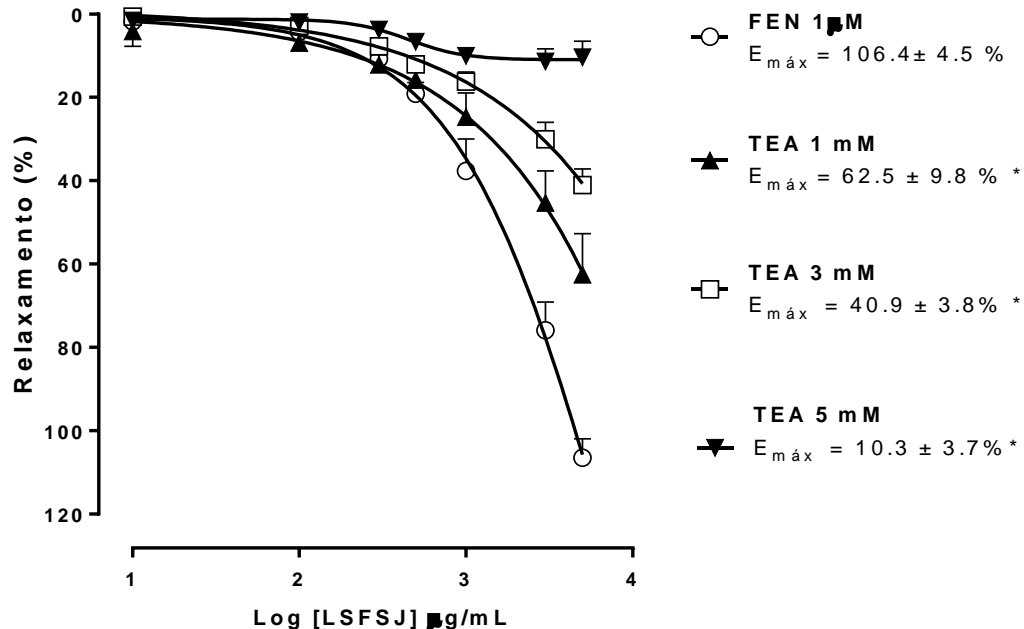


Gráfico 6 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (○) e na presença de TEA 1 mM (▲), TEA 3 mM (□) ou TEA 5 mM (▼) ($n = 6, 8, 7, e 5$, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μ M

6.4.6 Efeito do LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de rato na presença de diferentes bloqueadores de canais para potássio

Para confirmarmos a participação dos canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzido LSFSJ, utilizamos diferentes bloqueadores dos canais para potássio, simultaneamente.

Foram utilizados 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador seletivo dos canais K_V , glibenclamida (10 μ M), bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} , $BaCl_2$ (30 μ M), bloqueador seletivo dos canais K_{IR} e TEA (1 mM), bloqueador dos canais BK_{Ca} nesta concentração, simultaneamente. Nestas condições, a curva concentração-resposta do LSFSJ foi significativamente atenuada, com alterações significativas do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 23.9 \pm 3.4\%$; $n = 5$), quando comparadas com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 106.4 \pm 4.5\%$; $n = 6$) (Gráfico 7)

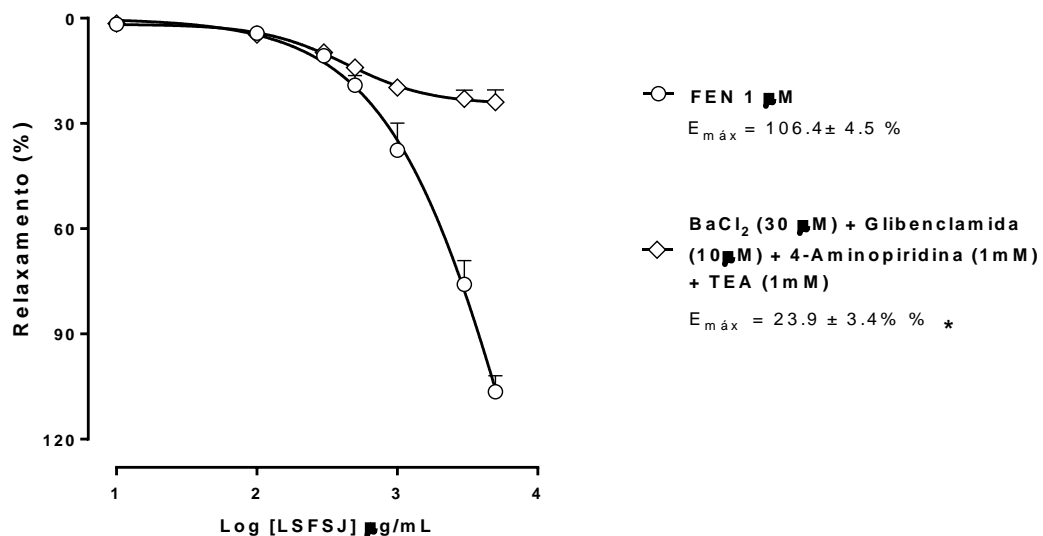


Gráfico 7 – Curva concentração-resposta induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré- contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (○) e na presença de 4-AP (1 mM), glibenclamida (10 mM), $BaCl_2$ (30 mM) and TEA (1 mM) (◇), ($n = 4$), simultaneamente. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μ M

6.4.7 Participação de canais para K^+ sensível a voltagem (K_V) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Para investigar a participação dos canais K_V nos efeitos vasculares induzidos pelo LSFSJ (1 - 5000 $\mu\text{g/mL}$), foram realizados experimentos na presença de 1 mM de 4-Aminopiridina, um bloqueador específico destes tipos de canais (MENEZES et al., 2007). Nestas condições, a curva concentração-resposta do LSFSJ foi significativamente atenuada, com alterações significativas do efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 33.6 \pm 5.9\%$; $n = 5$), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional, na ausência do 4-Aminopiridina e pré-contraídos com FEN (1 μM) ($E_{\text{máx}} = 106.4 \pm 4.5\%$; $n = 6$) (Gráfico 8).

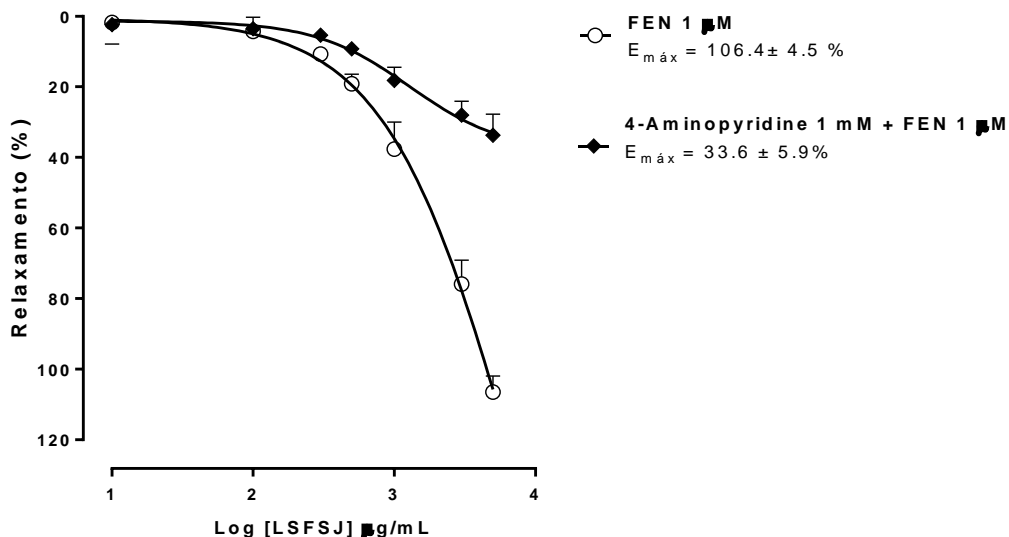


Gráfico 8 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 10000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μM), na ausência (○) e na presença de 4-aminopiridina 1 mM (◆), ($n = 6$ e 5, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μM

6.4.8 Participação de canais para K⁺ sensível a ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M), a pré-incubação por 30 minutos com glibenclamida (10 μ M), um inibidor seletivo dos canais K_{ATP} (MENEZES et al., 2007), atenuou significativamente o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 72.3 \pm 4.3\%$; $n = 7$) quando comparado com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 106.4 \pm 4.5\%$; $n = 6$), como ilustrado no Gráfico 9.

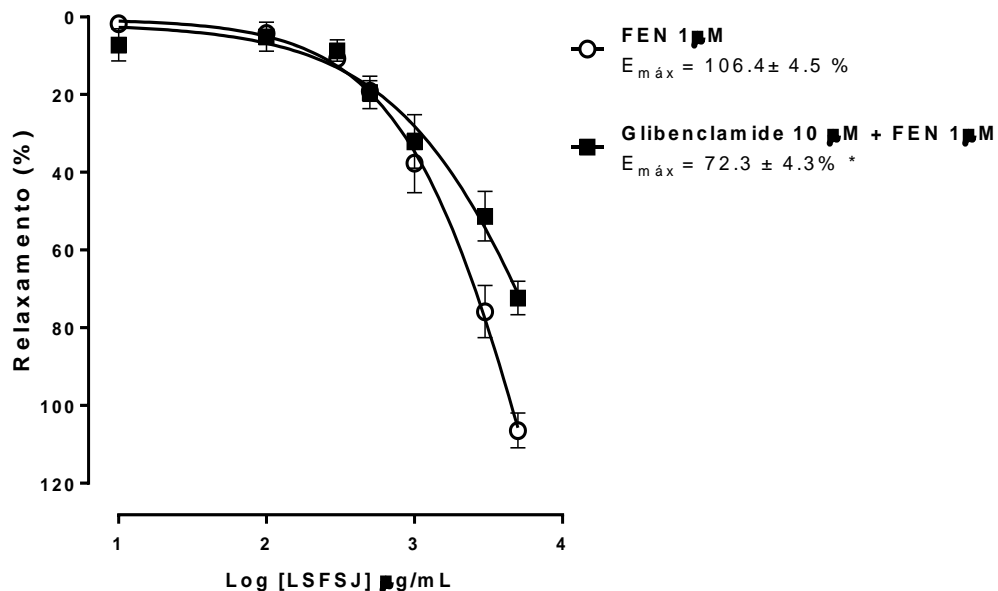


Gráfico 9 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (○) e na presença de Glibenclamida 100 nM (■), ($n = 6$ e 7, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μ M

6.4.9 Participação de canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 μ M), a pré-incubação por 30 minutos com $BaCl_2$ (30 μ M), um inibidor seletivo dos canais K_{IR} (CHROSSOBOLIS, 2000), promoveu uma redução do efeito máximo. Os valores obtidos nessa condição experimental foram: $E_{m\acute{a}x} = 73.5 \pm 6.9 \%$; $n = 7$, os quais foram comparados com os valores obtidos na situação controle ($E_{m\acute{a}x} = 106.4 \pm 4.5 \%$; $n = 6$) (Gráfico 10).

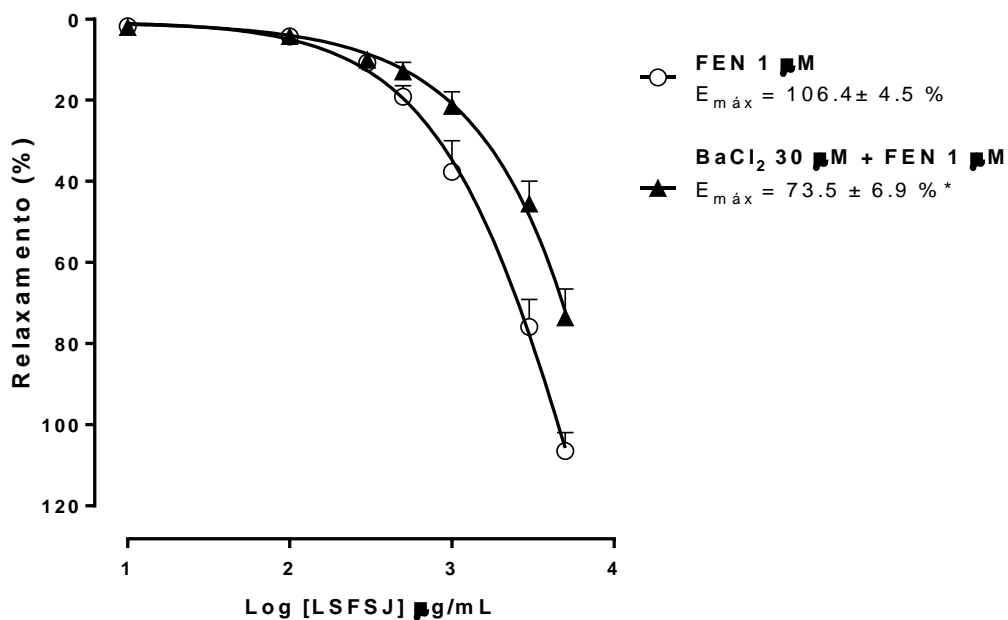


Gráfico 10 - Efeito vasorrelaxante do LSFSJ (10 - 5000 μ g/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré contraídos com FEN 1 μ M na ausência (\circ) ou na presença de $BaCl_2$ (\blacktriangle) ($n = 6$ e 7 , respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μ M

6.4.10 Participação dos canais para potássio de grande condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) na resposta relaxante induzida pelo LSFSJ em anéis de artéria mesentérica de ratos

Quando os anéis de artéria mesentérica foram incubados com iberiotoxina (100 nM), um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (WHITE et al., 2002; SILVA et al., 2011), não houve diferença no efeito máximo do LSFSJ ($E_{m\acute{a}x} = 94.2 \pm 8.1 \%$; $n = 6$) quando comparados com os valores obtidos no controle ($E_{m\acute{a}x} = 106.4 \pm 4.5 \%$; $n = 6$). (Gráfico 11).

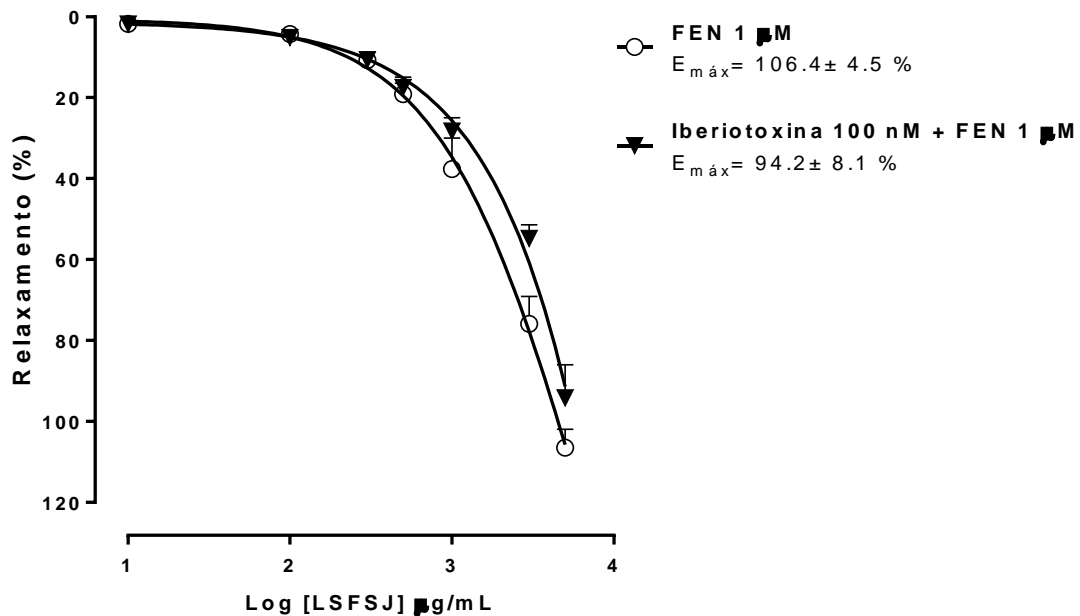


Gráfico 11 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μM), na ausência (○) ou na presença de Iberiotoxina 100 nM (▼), ($n = 6$ e 6, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN 1 μM

6.4.11 Verificação do efeito do LSFSJ sobre a curva cumulativa para o CaCl_2 em artéria mesentérica de ratos

O Gráfico 12 mostra que as curvas concentrações-respostas para o CaCl_2 não tiveram suas respostas alteradas com relação ao efeito máximo, contudo houve um leve deslocamento das curvas para a direita, alterando a sua potência.

Os valores obtidos nessas condições experimentais foram: $E_{\text{máx}} = 97,05 \pm 5,71 \%$; $pD_2 = 3,25 \pm 0,03$; $n = 4$ e $E_{\text{máx}} = 100,51 \pm 2,46 \%$; $pD_2 = 3,19 \pm 0,01$; $n = 4$, para as concentrações de 3000 e 5000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses valores foram comparados com os obtidos na situação controle $E_{\text{máx}} = 100 \pm 0,00 \%$; $pD_2 = 3,47 \pm 0,02$; $n = 4$.

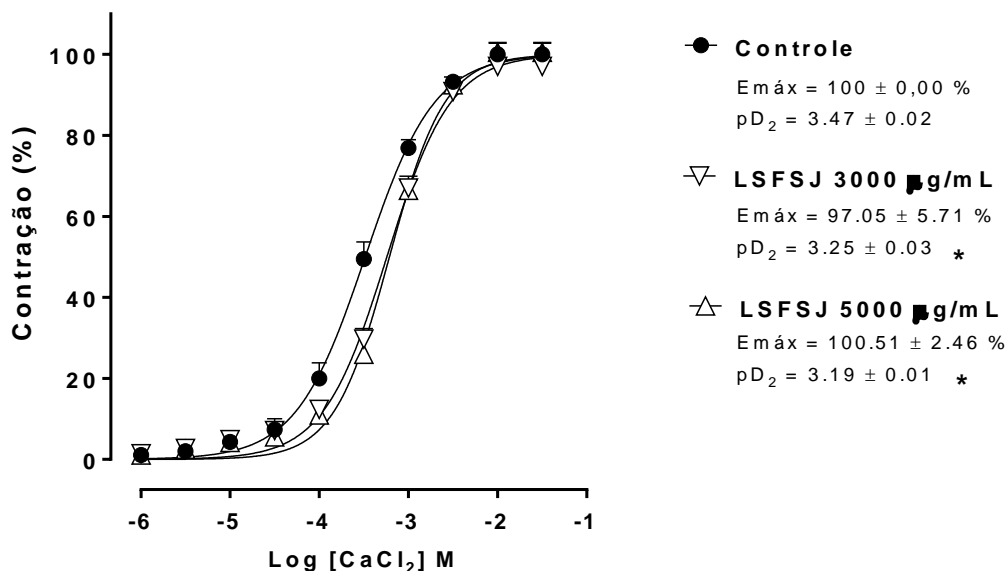


Gráfico 12 – Curvas cumulativas para CaCl_2 na presença de concentrações isoladas do LSFSJ, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional ($n=4$). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs versus controle.

6.4.12 Efeito do LSFSJ sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em artéria mesentérica de ratos

Em preparações de anéis de artéria mesentérica superior, sem endotélio funcional e pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (100 nM) a curva concentração-resposta do LSFSJ foi atenuada, com um efeito máximo significativamente menor

($E_{m\acute{a}x} = 15,0 \pm 6,7 \%$; $n = 6$), quando comparado aos anéis sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) ($E_{m\acute{a}x} = 106,4 \pm 4,5 \%$; $n = 6$) (Gráfico 13).

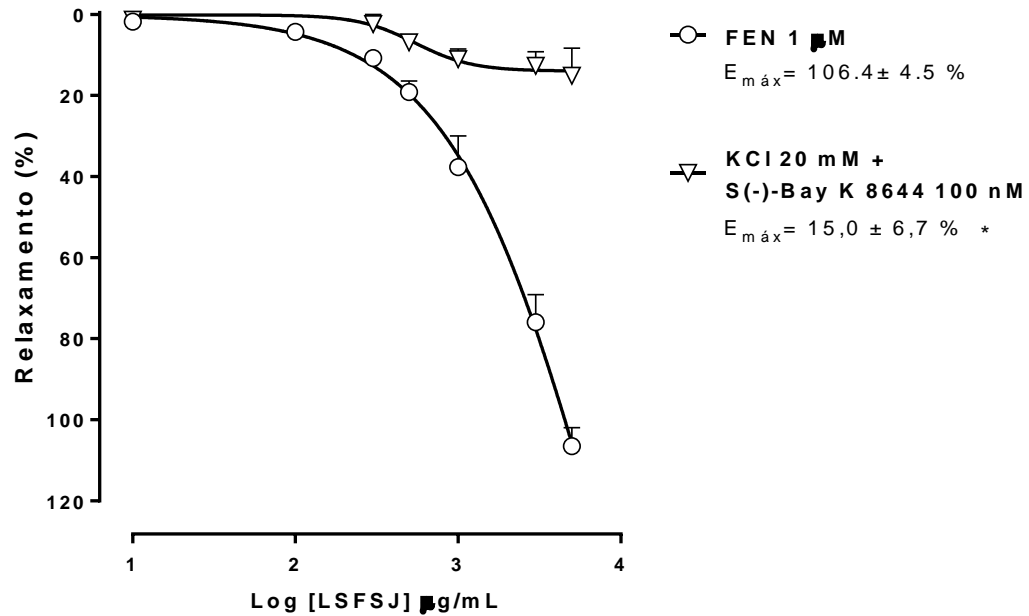


Gráfico 13 – Efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (10 - 5000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis da artéria de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) (○) ou pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (100 nM) (▽) ($n = 6$ e 6, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ vs FEN $1 \mu\text{M}$

Discussão

7 DISCUSSÃO

O estudo desenvolvido ampliou os conhecimentos sobre a ação da fruta *Syzygium jambolanum* no sistema cardiovascular, mostrando que a administração aguda do LSFSJ promoveu hipotensão em ratos normotensos não anestesiados. O efeito hipotensor induzido pelo LSFSJ pode estar relacionado com a diminuição da RVPT, como observado no efeito vasorrelaxante produzido pelo LSFSJ em artéria mesentérica superior isolada de rato. O mecanismo de ação da resposta vasorrelaxante envolve, provavelmente, a ativação de canais para K^+ , provocando hiperpolarização da membrana das células musculares lisas vascular e, conseqüentemente, fechamento dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v).

A busca pela qualidade de vida e bem-estar tem se tornado uma preocupação cada vez mais presente no conjunto da sociedade, resultando na busca crescente por terapias naturais, tanto que o Ministério da Saúde autorizou a implementação de Práticas Integrativas e Práticas Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e que posteriormente, resultou na criação de uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2007). Em 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), contendo 71 plantas, dentre elas está a *Syzygium jambolanum* (BRASIL, 2009).

A *Syzygium jambolanum* tem sido extremamente estudada por possuir várias propriedades medicinais. A casca demonstra atividade carminativa, digestiva, antidiabética, anti-helmíntica e antibacteriana. As folhas possuem uma propriedade antibacteriana e são utilizadas para reforçar os dentes e gengivas. As folhas também têm sido amplamente utilizados para tratar a diabetes, constipação, leucorréia, febre, gastropatia e dermatopatia. Os frutos e sementes são usados para tratar diabetes, faringite, doenças do baço, uretrite e infecção por micoses. (JAGETIA e BALIGA, 2002; PEPATO et al., 2001; PARI e SARAVANAN, 2002; MITRA, 1995).

Contudo, pouco se sabe sobre a ação farmacológica do suco dessa fruta sobre o sistema cardiovascular. Com a finalidade de ampliar tais conhecimentos, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do liofilizado do suco da fruta *Syzygium jambolanum* (LSFSJ) sobre o sistema cardiovascular de ratos, procurando elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos em suas respostas, através da

avaliação dos efeitos do LSFSJ sobre a PA e FC de ratos normotensos não-anestesiados (abordagem *in vivo*), bem como das respostas vasorrelaxantes em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato (abordagem *in vitro*).

Diversos estudos têm demonstrado que a ingestão regular de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos como o vinho tinto, chá, chocolate, frutas e legumes está associada com melhor prognóstico cardiovascular (DI, et al., 2002; MUKAMAL, et al., 2002; SOFI, et al., 2008; DIEBOLT, et al, 2001; MOURA, et al, 2004).

Para detectar algumas classes de metabólitos secundários encontradas no LSFSJ foi realizado o screening fitoquímico, o qual revelou a presença de esteroides e principalmente de flavonoides. Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Pereira (2011) que demonstrou a presença de flavonoides no extrato aquoso da casca e da polpa de *Syzygium jambolanum*, e por Faria et al. (2011), que detectou a presença de esteróides na polpa do extrato aquoso da mesma fruta. Em seguida realizamos o ensaio do teor de polifenóis totais através do reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método colorimétrico descrito por Slinkard e Singleton (1977). Vasco, Ruales & Kamal-Eldin. (2008) analisaram o teor de fenólicos totais de dezessete fruto do Equador, avaliando seus frutos em três categorias: baixo (<100 mg GAE / 100 g, médio (100 a 500 mg GAE / 100 g) e alta (> 500 mg GAE / 100 g) para compostos fenólicos amostras frescas, visto que o teor de fenólicos totais apresentado pelo LSFSJ foi de $988,55 \pm 5,41$ mg Ác Gál/100g, pode se dizer que é um produto com alto teor de fenólicos esse resultado corrobora com os estudos realizados por Rufino et al. (2010) que demonstrou um teor de polifenóis de $1117 \pm 67,1$ mg Ác Gál/100g. Por sua vez a atividade antioxidante mostrada pelo LSFSJ foi expressa como CE_{50} mostrando uma baixa capacidade de quelar o radical DPPH[•], este resultado corrobora apresentada por Reynertson et al (2008), que foi de $389 \pm 36,0$ ug / ml.

Estudos mostram que diversos flavonoides apresentam ação no sistema cardiovascular. Flavonoides encontrados em vinhos e sucos de frutas promovem hipotensão e vasorrelaxamento em artérias (SOARES de MOURA et al., 2002; MADEIRA et al., 2005).

Diante dessas informações, a avaliação da resposta induzida pelo LSFSJ sobre a pressão arterial e frequência cardíaca foi realizada em ratos normotensos

não anestesiados. A administração aguda intravenosa do LSFSJ promoveu hipotensão seguida de taquicardia (Gráfico 1).

A pressão arterial média é o produto da resistência vascular periférica total pelo débito cardíaco. Dessa forma alterações do tônus da musculatura lisa vascular desempenham um importante papel na manutenção da PA (FOLKOW, 1987; MULVANY; AALKJAER, 1990). Com o objetivo de melhor compreender a natureza do efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*, foram utilizados anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato para investigar a resposta do LSFSJ utilizando uma abordagem *in vitro*.

Concentrações crescentes do LSFSJ foram adicionadas sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica e nestas condições o LSFSJ não induziu alterações significativas (Gráfico 2). Em seguida avaliamos o efeito do LSFSJ frente a preparações de anéis de artéria mesentérica pré-contraídas com um agente contracturante a FEN (1 μM), os resultados obtidos mostraram que o LSFSJ foi capaz de induzir vasorrelaxamento dependente de concentração (Gráfico 3).

As substâncias que apresentam ação vasorrelaxante podem exercer essa resposta induzindo relaxamento do músculo liso vascular por atuação nas células musculares lisas vasculares ou nas células endoteliais que, por sua vez, regulam a atividade contrátil das células musculares lisas vasculares.

O endotélio tem uma função importante na manutenção da homeostasia vascular pela síntese e liberação de vários fatores vasodilatadores tais como o óxido nítrico, prostaciclina e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio; e fatores contracturantes, como endotelina (MATOBA et al., 2002; KOZA et al., 2007). Diante dessas considerações, passamos a avaliar a influência do endotélio funcional na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ. Nas preparações em que o endotélio foi mecanicamente removido o efeito vasorrelaxante promovido pelo LSFSJ ocorre de modo semelhante àquele observado nos anéis sem endotélio funcional (Gráfico 3), sugerindo que o LSFSJ exerce seu efeito, provavelmente, por ação direta sobre o músculo liso vascular. A partir desses resultados preliminares, os experimentos subsequentes foram realizados com anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular e submetidos a uma pré-contracção.

A regulação da resposta contrátil do músculo liso é dependente do aumento na concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que ocorre como resultado da

liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, ou ambos (ADAMOVA; OZKAN; KHALIL, 2009; SOMLYO; SOMLYO, 1994). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ facilita a interação do complexo cálcio- 4-Calmodulina $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$, que sofre uma alteração conformacional e ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK ativada irá fosforilar a cadeia leve da miosina, o que favorece o deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina, provocando a contração do músculo liso vascular (JOHNSON; SNYDER, 1995; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009).

A FEN induz contração das células do músculo liso por meio da ativação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos que são acoplados à proteína Gq/11. Quando ativados, esses receptores induzem a ativação da fosfolipase C- β (PLC β) que irá hidrolisar o fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP $_3$) e diacilglicerol (DAG). O IP $_3$ ativa os receptores para IP $_3$ (IP $_3$ R), localizados no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação do Ca^{2+} para o citosol. O DAG, juntamente com a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ativa a proteína cinase C (PKC) que por sua vez, irá fosforilar vários alvos proteicos, como os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem tipo L (Ca $_v$ 1.2), presentes na membrana plasmática. Quando abertos, os Ca $_v$ permitem o influxo de Ca^{2+} resultando em contração das células musculares lisas vasculares (MCCARRON et al., 2003; THORNELOE; NELSON, 2005).

Dessa forma, drogas que causam bloqueio direto ou indireto de canais para Ca^{2+} induzem o relaxamento do músculo liso vascular. Uma das formas de induzir o bloqueio indireto dos canais para Ca^{2+} é por meio da ativação de canais para K $^+$ presentes na membrana plasmática. Os canais para potássio são os canais iônicos dominantes na membrana plasmática das células musculares lisas, e a corrente através desses canais contribui substancialmente para o potencial de membrana, sendo de grande importância na regulação do tônus da musculatura lisa vascular (JACKSON, 2000a; JACKSON, 2001b; JACKSON, 2005c).

A ativação de um canal para potássio provoca um efluxo de íons K $^+$, o que causa hiperpolarização da membrana celular (SOBEY, 2001). Este estado de hiperpolarização conduz ao fechamento de canais para cálcio dependentes da voltagem (Ca $_v$) e conseqüente diminuição no influxo desse íon, culminando no relaxamento da musculatura lisa vascular (FARACI; HEISTAD, 1998; SOBEY, 2001).

Baseado na importância dos canais para K^+ na regulação de funções vasculares resolvemos avaliar a participação destes canais na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ. Aumento na $[K^+]_e$ modula o efluxo de K^+ através da membrana plasmática atenuando o relaxamento induzido por drogas que atuam por meio de ativação de canais para K^+ (GURNEY, 1994). Diante dessas informações, o efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ foi avaliado em anéis pré-contraídos com FEN na presença de solução despolarizante contendo 20 mM de KCl. A resposta induzida pelo LSFSJ foi significativamente atenuada (Gráfico 4), sugerindo o envolvimento de canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ.

Para confirmar a participação de canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ, foram utilizadas preparações incubadas com diferentes concentrações de TEA (1, 3 e 5 mM) um bloqueador de canais para K^+ (ADARAMOYE; RIBEIRO et al., 2012; MEDEIROS 2009; SILVA et al., 2011; WANG et al., 2008). Nestas condições observamos que o efeito vasorrelaxante promovido pelo LSFSJ foi atenuado significativamente de forma dependente de concentração do TEA (Gráfico 5), tendo seu efeito praticamente abolido na presença de 5 mM de TEA. Esses dados sugerem o envolvimento de canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ. Dessa forma passamos à avaliar os subtipos de canais para K^+ envolvidos na resposta observada.

Dados relatados na literatura apontam a existência de diversos subtipos de canais para K^+ expressos na membrana das CMLVs (KO et al., 2008). Foram identificados quatro subgrupos distintos desses canais no músculo liso arterial: canais para K^+ dependentes de voltagem (K_V); canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}); canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) e canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) (KO et al., 2008; (GOLDSTEIN et al., 2005; GUTMAN et al., 2005; KUBO et al., 2005; STANDEN; QUAYLE, 1998; WEI, et al., 2005).

Os canais K_V estão presentes em todas as células musculares lisas e também são ativados por despolarização de membrana plasmática, sendo muito importantes na fase de repolarização do potencial de ação e regulação do potencial de membrana em muitas células excitáveis (DORA; GARLAND, 2001; YU et al, 2004). Para avaliarmos a participação deste canal no efeito induzido pelo LSFSJ,

utilizamos o 4 - aminopiridina (1 mM) um inibidor específico para canais para potássio sensíveis a voltagem (MENEZES et al., 2007). Nessas condições observamos uma atenuação significativa do efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (Gráfico 6), sugerindo que, provavelmente, ocorre uma participação dos canais Ca_V no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ.

Os K_{ATP} são canais regulados pelo ATP intracelular, que se fecham quando a concentração intracelular de ATP aumenta, sendo também regulados por outras vias de transdução de sinal. Estes canais estão pouco abertos em condições normais, tendo uma pequena influência na manutenção do potencial de repouso, entretanto, em condições patológicas em que a concentração de ATP esteja reduzida ou quando ocorre aumento do AMPc intracelular, estes canais são ativados e produzem uma potente vasodilatação (JACKSON, 2000; LIU; GUTTERMAN, 2002). Após a realização de um protocolo experimental na presença da glibeclamida (10 μ M), um inibidor específico desses canais (MENEZES et al., 2007), observamos uma atenuação significativa no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ (Gráfico 7). Esse resultado sugere que os K_{ATP} , provavelmente estariam envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ.

Os K_{IR} são canais para potássio que quando ativados promovem o equilíbrio do potencial negativo da membrana, pois conduzem íons potássio para dentro da célula, quando o potencial está mais positivo, considerando que com o potencial mais positivo a entrada de potássio é limitada (QUAYLE, 1997). Esse mecanismo os torna importantes para manutenção da homeostasia do tônus vascular. Esses canais K_{IR} são bloqueados por Ba^{2+} em concentrações micromolar (QUAYLE et al., 1997). Com o objetivo de avaliarmos a participação dos K_{IR} na resposta relaxante induzida pelo LSFSJ, utilizamos o $BaCl_2$ (30 μ M), um inibidor seletivo desse canais (CHRISOBOLIS, 2000). Na presença de $BaCl_2$ a resposta vasorrelaxante do LSFSJ promoveu um deslocamento para a direita com atenuação da potência, sem alterar o efeito máximo (Gráfico 8). Esse resultado sugere que, provavelmente, ocorre uma participação dos canais K_{IR} no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ.

Os BK_{Ca} são canais ativados por despolarização do potencial de membrana (FARACI; SOBEY, 1998), em resposta ao aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} , seja por influxo desse íon do meio extracelular ou por sua liberação do retículo

sarcoplasmático (ZHANG et al., 2006). Sua ativação ocorre a fim de interromper, por feedback negativo, mecanismos de despolarização e contração muscular, desempenhando grande importância no controle do tônus vascular e da pressão sanguínea (ASANO, MASUZAWA-ITO; MATSUDA, 1993; CAI; GONG; PAN, 2007; JACKSON, 2000). A ativação destes canais, em células musculares lisas de artéria mesentérica de rato, é reduzida na presença de iberiotoxina (100 nM), um bloqueador seletivo para os BK_{Ca} (BYCHKOV et al., 1998). Nestas condições observamos que a curva concentração-resposta induzida pelo LSFSJ foi deslocada para a direita sem redução do efeito máximo (Gráfico 9). Este resultado sugere que os canais BK_{Ca}, provavelmente, também estariam envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ.

A elevação da concentração extracelular de potássio gera em menor efluxo de K⁺ pelos canais que permeiam esse íon e acúmulo de cargas positivas no meio intracelular, resultando em despolarização da membrana plasmática, com consequente abertura de canais sensíveis à voltagem, dentre eles os canais Ca_v, levando à contração muscular (KARAKI et al., 1997; INTERRAMINESE et al., 2007; WANG et al., 2007).

Com a finalidade de avaliar a participação de canais sensíveis a voltagem na resposta induzida pelo LSFSJ, anéis de artéria mesentérica superior foram pré-contraídos com a solução despolarizante contendo 60 mM de KCl. O efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ foi significativamente menor, quando comparado ao obtido aos anéis pré-contraídos com FEN (1 μM) (Gráfico 10). É caracterizado na literatura que drogas que promovem relaxamento por ativação dos canais para potássio possuem a resposta reduzida frente a contrações induzidas por agentes despolarizantes, devido à diminuição do efluxo de K⁺ (GURNEY, 1994). Dessa forma, o resultado obtido sugere que o vasorrelaxamento promovido pelo LSFSJ pode envolver possível ativação de canais para potássio, não sendo descartado um possível bloqueio de canais para cálcio.

Com a finalidade de avaliarmos se esse efeito vasorrelaxante promovido pelo LSFSJ na presença desse agente despolarizante envolveria um bloqueio dos Ca_v1.2 (tipo-L), analisamos o efeito do LSFSJ sobre as contrações induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-Bay K 8644 (100 nM), um ativador seletivo dos Ca_v1.2 (SCHRAMM et al., 1983). Esse protocolo foi realizado utilizando-se uma solução de

tyrode contendo 20 mM de KCL, sendo em seguida induzida contração com o S(-)-Bay K 8644 (SCHRAMM et al., 1983; DAVIE et al., 1998). Nestas condições observamos que o efeito vasorrelaxante induzido pelo LSFSJ foi significativamente reduzido (Gráfico 13), sendo menor do que aquele observado nas contrações induzidas por solução despolarizante contendo 60 mM de KCl. Esses dados sugerem que provavelmente o mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ envolve bloqueio de canais sensíveis à voltagem, sendo necessários estudos adicionais para caracterizar os subtipos de canais envolvidos, podendo haver participação, por exemplo de canais do tipo ROCs (canais ativados por receptor) e SOCs (canais ativados por depleção dos estoques intracelulares), os quais permeiam Ca^{2+} e outros cátions.

Esses resultados em conjunto demonstram que o LSFSJ promove um efeito hipotensor, sendo esse efeito provavelmente atribuído a redução da RVPT, como observado por meio do efeito vasorrelaxante produzido pelo LSFSJ em artéria mesentérica superior isolada de rato. O mecanismo de ação responsável pela resposta vasorrelaxante induzida pelo LSFSJ não está totalmente esclarecido. Entretanto a resposta parece envolver, provavelmente, a ativação de canais K_V , K_{ATP} , K_{IR} e BK_{Ca} , não sendo descartada uma possível ação no bloqueio de canais de cálcio, podendo esses efeitos serem diretos ou indiretos. Com isso, estudos adicionais são necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual o LSFSJ induz a ativação de canais para potássio e, provavelmente, bloqueio de canais para cálcio, promovendo a resposta vasorrelaxante observada.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, concluímos que:

- O LSFSJ apresenta um alto teor de polifenóis, sendo detectados flavonoides e esteróides;
- O LSFSJ promove hipotensão em ratos normotensos não anestesiados;
- O LSFSJ promove efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular por meio de mecanismo ainda não esclarecido que culmina com ativação de canais para K^+ dos tipos K_v , K_{ATP} e K_{IR} , não sendo descartada a participação dos canais para Ca^{2+} no mecanismo vasorrelaxante;
- Estudos adicionais são necessários para esclarecer o mecanismo através do qual o LSFSJ promove a resposta vasorrelaxante.

Perspectivas

9 PERSPECTIVAS

Atualmente, novas alternativas têm sido investigadas para o tratamento da hipertensão arterial. Diversos estudos têm relacionado a utilização de produtos naturais, dentre eles extratos, liofilizados e sucos de frutas, como possíveis drogas para promover a prevenção e tratamento da hipertensão arterial. O LSFSJ oferece uma alternativa para os estudos que avaliam os efeitos benéficos para o sistema cardiovascular. Dessa forma, torna-se interessante realizar a melhor caracterização do mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida por LSFSJ, bem como a influência que o tratamento com LSFSJ exerce quanto à proteção cardiovascular, prevenção e tratamento da hipertensão arterial.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F.H., BELLÉ, L.P., BITENCOURT, P.E.R., DE BONA, K.S., ZANETTE, R.A., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., PIGATTO, A.S., MORETTO, M.B. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals**, v. 24, p. 349-356, 2011.
- ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. BAY K 8644 modifies Ca^{2+} cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 276, p.H1178 – H1189, 1999.
- ADAMOVA, Z; OZKAN, S; KHALIL, R. A. Vascular and Cellular Calcium in Normal and Hypertensive Pregnancy. **Current Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 172– 190, 2009.
- ADARAMOYE, A.O; MEDEIROS, I.A. Endothelium-independent vasodilatation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.45, p.39–53, 2009.
- ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S.; FRANCO, S.L. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n.1, p. 37-50, 2001.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug- induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ARUN, R., PRAKASH, M.V.D., ABRAHAM, S.K., PREMKUMAR, K. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134, p 329-333, 2011.
- ASANO, M.; MASUZAWA-ITO, K.; MATSUDA, T. Charybdotoxin-sensitive K^+ channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v.108, p.214–222, 1993.
- AUGER C., KIM J.H., TRINH S., CHATAIGNEAU T., POPKENB A. M.; SCHINI-KERTH V. B. Fruit juice-induced endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: evaluation of different fruit juices and purees and optimization of a red fruit juice blend. **Food & function**, v. 2, n.5, p. 245-250, 2011.
- AYYANAR, M., SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v.1, p. 240-246, 2012.
- BALIGA, M.S., BHAT, H.P., BALIGA, B.R.V., WILSON, R., PALATY, P.L., Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1776-1789, 2011.
- BANERJEE, A., DASGUPTA, N., DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.
- BERNE,R.M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STATION, B.A. Fisiologia. 6 ed. Rio de janeiro: **Editora Elsevier**. Cap.15,p.289, 2009.

BONA, K.S.D., BELLÉ, L.P., SARI, M.H., THOMÉ, G., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M., BOLIGON, A., ATHAYDE, M.L., PIGATTO, A.S., MORETTO, M.B. *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, p 729-738, 2010.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. 213p. - Tese de Doutorado em Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em : <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2013.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoter%C3%A1picos..pdf- acesso em 13 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. acesso em 13 de janeiro de 2014.

BROCHET, D.X.P.; LANGTON, P.D. Dual effect of initial [K] on vascular tone in rat mesenteric arteries. **Plufgers Arch – European Journal Physiology**, 2006.

BÜSCHER, R. H. V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. A. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human α 1B-adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793-798, 1999.

BYCHKOV, R.; GOLLASCH, M.; STEINKE, T.; RIED, C.; LUFT, F.C.; HALLER, H. Calcium-Activated Potassium Channels and Nitrate-Induced Vasodilation in Human Coronary Arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 293–298, 1998.

BYLUND, D. B. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 832-839, 1992.

CAI, B.; GONG, D.; PAN, Z. Large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ currents blocked and impaired by homocysteine in human and rat mesenteric artery smooth muscle cells. **Life Sciences**, v.80, p. 2060 - 2066, 2007.

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

CHAUDHURI, A.K.N., GOMES, S.P.A., BHATTACHARYA, S.,. Anti-inflammatory and related actions of *Syzygium cumini* seed extract. **Phytotherapy Research**, v. 4, p.5-10, 1990.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 1, p. 74-81, 1995.

CHRISOBOLIS, S.; ZIOGAS, J.; CHU, Y.; FARACI, F. M; SOBEY, C.G. Role of inwardly rectifying K1 channels in K1-induced cerebral vasodilatation in vivo. **American Journal of Physiology**, 279: H2704–H2712. 2000.

COWLEY, A.W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 829-840, 2006.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Elsevier - Cell Calcium**, v.40, n.20, p.221 - 230, 2006.

DAVIE, C. S.; KUBO, M.; STANDEN, N. B. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 8, p. 1715-1725, 1998.

DEVIHA, V. S.; RENGARAJAN, P.; HUSSAIN, R. J. Modeling Blood Flow in the Blood Vessels of the Cardiovascular System Using Fractals. **Applied Mathematical Sciences**, v. 7, n. 11, p. 527-537, 2013.

DI, C. A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; DE GAETANO, G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk **Circulation**, v. 105, p. 2836-2844, 2002.

DIEBOLT, M.; BUCHER, B.; ADRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. **Hypertension**, v. 38, p. 159-165, 2001.

DORA, K. A; GARLAND, C. J; Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K^+ in the rat isolated mesenteric artery. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, p. H2424 – H2429, 2001.

DORWARD, P. K. et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, v. 57, p. 618-633, 1985.

FARACI, F. M.; SOBEY, C. G. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 18, n.10, p.1047-63, 1998.

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

FARIA, A.F., MARQUES, M.C., MERCADANTE, A.Z., Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v.126, p 1571-1578, 2011.

FLUCKIGER, J. P. et al. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 109, p. 105-109, 1985.

FOLKOW, B. Structure and function of the arteries in hypertension. **American Heart Journal**, v. 114, p. 938-948, 1987.

FRANÇA-SILVA, M. S. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos - abordagens *in vivo* e *in vitro***. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

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

GOLDSTEIN, S.A.N.; BAYLISS, D.A.; KIM, D, et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 527-540, 2005.

GROVER, J.K.; VATS, V.; RATHI, S.S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 233-238, 2001.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

GUTMAN, G.A.; CHANDY, K.G.; STEPHAN-GRISSMER, S.; et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 473-508, 2005.

HARBORNE JB. **Phytochemical Methods** - A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman and Hall, London, p. 182-190, 1998.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C.H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 40, p. 2379-2383, 1992.

INTERAMINENSEA, L. F. L.; JUCÁB, D. M.; MAGALHAESB, P. J. C.; LEAL- CARDOSO, J. H.; DUARTEA, G. P.; LAHLOU, S. Pharmacological evidence of calciumchannel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 5, p. 497-506, 2007.

JACKSON, W.F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**, v.35, p.173-178, 2000a.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the circulation of skeletal muscle. In: **Potassium Channels in the Cardiovascular Biology** (SL Archer, NJ Rusch, Eds). New York: Kluwer Academic/Plenum, 505–522. 2001b.

JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. **Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research**, v. 30, p. 153-174, 1995.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453-464, 2004.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.I.; HARADA K.I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.83, p. 215 - 242, 2005.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, p. 203-219, 1996.

KO, A.; HAN, J. In Duk JUNG2 and Won Sun PARK1, Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells.. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65- 81, 2008.

KO, E. A; HAN, J; JUNG I. D; PARK W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, p. 65-81, 2008.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D. The effects of chloralose- urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 199, p. 283-302, 1968.

KOZA, OWSKA H; BARANOWSKA, M; GROMOTOWICZ, A; MALINOWSKA, B; ZAKA, FIZJOLOGII DOA; WIADCZALNEJ A.M, BIAA; YSTOK. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): Potential involvement in the physiology and pathology of blood vessels. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 12, n. 61, p. 555-64, 2007.

KRAVTSOV, G. M.; BRUCE, I. C.; WONG, T. M.; KWAN, C. A new view of K⁺-induced contraction in rat aorta: the role of Ca²⁺ binding. **European Journal of Physiology**, v. 446, p. 529-540, 2003.

KUBO, Y.; ADELMAN, J.P.; CLAPHAM, D.E.; et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 509-526, 2005.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. Kinases inhibitors for vascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 1-11, 2007.

LACERDA, M. A. D.; LACERDA, R. D.; ASSIS, P. C.O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4 , n. 1, 2004.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON M. T.; Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v.21, p.69 - 78, 2006.

LEONG, L. P., SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69-75, 2002.

LI, L., ADAMS, L.S., CHEN, S., KILLIAN, C., AHMED, A., SEERAM, N.P.. Eugenia jambolana Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p 826–831, 2009.

LIMA, L.A., SIANI, A. C., BRITO, F. A., SAMPAIO, A. L. F., HENRIQUES, M. G. M.O., RIEHL, C. A. S, SIANI, A.C., BRITO, F.A., SAMPAIO, A.L.F., HENRIQUES, M.G.M.O., RIEHL, C.A.S. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 860-864, 2007.

LIU, Y.; GUTTERMAN, D.D. The coronary circulation in diabetes: influence of reactive oxygen species on K channel-mediated vasodilation. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 43– 49, 2002.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2002.

MAHMOUD, I.I.; MARZOUK, M.S.A.; MAHARRAM, F.A.; EL-GINDI, M.R.; HASSAN, A.M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1239-1244, 2001.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H.; KUBOTA, H.; MORIKAWA, K.; FUJIKI, T.; KUNIHITO, I.; MUKAI, Y.; HIRAKAWA, Y.; TAKESHITA, A. Hydrogen Peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 25, p. 909-913, 2002.

MCCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MCMILLAN, D.; MUIR, T. C. Sarcolemma agonist-induced interactions between InsP3 and ryanodine receptors in Ca²⁺ oscillations and waves in smooth muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 924-929, 2003.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MENEZES, I.A.C; MOREIRA, I.J.A.; CARVALHO, A.A.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, M.R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 41-47, 2007.

MIGLIATO, K. F., MOREIRA, R. R., MELLO, J. C., SACRAMENTO, L. V., CORRÊA, M. A., SALGADO, H. Quality control of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(1), p. 94-101, 2007.

MOURA, R. S.; MIRANDA, D. Z.; PINTO, A. C. A.; SICCA, R. F.; SOUZA, M. A. V.; RUBENICH, L. M. S.; CARVALHO, L. C. R. M.; RANGEL, B. M.; TANO, T.; MADEIRA, S. V. F.; REZENDE, A. C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of brazilian red wine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 44, p. 302-309, 2004.

MUKAMAL, K. J.; MACLURE, M.; MULLER, J. E.; SHERWOOD, J. B.; MITTLEMAN, M. A. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 105, p. 2476–2481, 2002.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Research**, v. 70, p. 921-95, 1990.

MURUGANANDAN, S., SRINIVASAN, K., CHANDRA, S., TANDAN, S.K., LAL, J., RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**. v. 72, p.369-375, 2001.

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

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14 labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 338-344, 2006.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO) - Disponível em: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/en/?dyna_fef%5Buid%5D=159358>. Acessado em 29.01.2014.

PEPATO, M.T, MORI, D.M.; BAVIERA, J.B.; HARAMI, R.C.; VENDRAMINI, R.; BRUNETTI, I.L. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 43-48, 2004.

PEREIRA, R. J. **Composição centesimal, aspectos fitoquímicos, atividades antioxidantes, hipoglicemiante e anti-hiperlipidêmica de frutos do gênero *Syzygium***. - 2011 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2011.

PUSGLEY, M.K.; TABRIZCHI,R., The vascular system an overview of structure and function. **Journal of Pharmacology and toxicological Methods**, v.40, p. 333-340, 2000.

QUAYLE, J.M; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 77, p. 1165–1232, 1997.

QUEIROZ, T. M.; MACHADO, N. T.; FURTADO, F.F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; ALUSTAU, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; MIRANDA, G. E.C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Vasorelaxation, Induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a Brown Alga, Is Mediated via Inhibition of Calcium Influx in Rats. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2075-2088, 2011.

RAVI K, RAMACHANDRAN B, SUBRAMANIAN S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin induced diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1212-121, 2004.

RIBEIRO, R. M., Estudo da Atividade Hipotensora das folhas de *Syzygium jambolanum* D.C. 2007. 74f. **Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão**, Maranhão. 2007

RIBEIRO, E. A. N.; HERCULANO E.A.; COSTA, C. D. F.; FURTADO, F. F.; CUNHA, E. V. L.; FILHO, J. M.B.; SILVA, M. S., MEDEIROS, I.A. The ent -15 α -Acetoxykaur-16-en-19-oic Acid Relaxes Rat Artery Mesenteric Superiorvia Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Mechanisms. Hindawi **Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012.

ROSS, I.A. **Medicinal Plants of the World**: Chemical constituents, traditional and modern uses. Totowa: Human, p. 283-289, 1999.

REYNERTSON, K. A., YANG, H., JIANG, B., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RUFINO, M. S.M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., FILHO, F. S. C. J. M. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. 121, pp. 996-1002, 2010.

SCHOENFELDER, T., WARMLIN, C.Z., MANFREDINI, M.S., PAVEI, L.L., RÉUS, J.V., TRISTÃO, T.C., FERNANDES, M.S., COSTA-CAMPOS, L. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 222-227, 2010.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. **Nature**, v. 303, p. 535-537, 1983.

SHAFI, P.M., ROSAMMA, M.K., KAISER JAMIL, P.S., REDDY. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 2002.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton London New York Washington, D.C. CRC Press, p. 141 -189, 2004.

SHARMA, S.B., NASIR, A., PRABHU, K.M., MURTHY, P.S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 367-373, 2006.

SILVA, D. F.; ARAÚJO, I. G. A.; ALBUQUERQUE, J. F.; PORTO, D. L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; MEDEIROS, I. A. Rotundifolone- Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 465-475, 2011.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 28, p. 49-55, 1977

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **The American Journal of Physiology**, v. 238, p. H539-H544, 1980.

SOBEY CG. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 28-38, 2001.

SOFI, F.; CESARI, F., ABBATE, R. et al. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 337 p. 1344, 2008.

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

SOUZA NETO, E. P.; NEIDECKER, J.; LEHOT, J. J. To understand blood pressure and heart rate variability. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, v. 22, n. 5, p. 425-452, 2003.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

STANDEN, N. B; QUAYLE J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica**, v. 164, p. 549-557, 1998.

SULTANA, B., ANWAR, F., PRZYBYLSKI, R., Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**. v. 104, p. 1106-1114, 2007.

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

TEIXEIRA, C.C., FUCHS, F.D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: The case of jambolan. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, p. 16-19, 2006.

THORNELOE, K. S., NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215-242, 2005.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TREASE, G.E., EVANS, W.C. Textbook of **Pharmacognosy**. 12th Edn, Balliere, Tinadl London, 1989.

VASCO, CATALINA; RUALES, JENNY; KAMAL-ELDIN, AFAF. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VEIGAS, J.M.; NARAYAN, M.S.; LAXMAN, P.M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v.105, p. 619-627, 2007.

WANG, L.; HENRICH, M.; BUCKLER, K.; MCMENAMIN, M.; MEE, C. J; SATTELLE, D. B; PATERSON, D. J. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases [Ca²⁺]_i in cardiac sympathetic neurons. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, p. 717-725, 2007.

WANG, SP.; ZANG, WJ.; KONG, SS.; YU, XJ.; SUN, L.; ZHAO, XF.; WANG, SX.; ZHENG, XH. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2- hydroxypropanoate, a novel

metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p. 283-288, 2008.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; et al. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium- Activated Potassium Channels. **Pharmacology Review**, v.57, p. 463-472, 2005.

WHITE, S. W.; MCRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 51, p. 17-31, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO expert Consultation. Geneva: World Health Organization (WHO Technical Report Series 916), p. 149, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Published by the World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization. Editors: Shanthi Mendis, Pekka Puska and Bo Norrving, September 2011.

WYNNE, M. B; CHIAO, M. S; WEBB, R. C. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 3, p. 84–95, 2009.

YU, F. H; CATTERALL, W. A; The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. **Science Signaling: Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 15, 2004.

ZHANG, A. Y.; LI, P. Vascular Physiology of a Ca^{2+} mobilizing second messenger – cyclic ADP – ribose. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 407-422, 2006.

ZIMPFER, M. et al. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **The American Journal of Physiology**, v. 243, p. H713-H721, 1982.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 16 de julho de 2013.

CEUA N° 1405/13

Ilmo(a). Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a): Kívia Sales de Assis, (Mestrado)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 15/07/13 analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DE FRUTAS DO NORDESTE**.

Com previsão de empregar 120 Ratos Wistar; **- ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de 25/10/2012 a 28/02/2014

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@lff.ufpb.br