

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA  
E FARMACOLOGIA

WALMA PEREIRA DE VASCONCELOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE VASCULAR DO EXTRATO E  
FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Plinia cauliflora* (MYRTACEAE) EM  
AORTA DE CAMUNDONGO**

Belo Horizonte – MG  
2018

WALMA PEREIRA DE VASCONCELOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE VASCULAR DO EXTRATO,  
FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Plinia  
cauliflora* (MYRTACEAE) EM AORTA DE CAMUNDONGO**

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Biológicas (Fisiologia e  
Farmacologia), do Instituto de  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais. Área de concentração:  
Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. STEYNER F. CÔRTEZ

Belo Horizonte - MG  
2018

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Maria Rodrigues e Walber Pereira**, que me deram todo o suporte, emocional e financeiro, para que eu pudesse alcançar mais esta etapa na minha vida. Aos meus irmãos, **Eulália e Thiago**, pela ajuda e companheirismo durante todos estes anos de vida. A **Juarez Neto e Walber Neto**, por me ensinarem sobre amor e cumplicidade entre tia e sobrinhos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Steyner de França Côrtes** pela oportunidade concedida, mas principalmente pela confiança e paciência. Meus mais sinceros agradecimentos.

A **Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho** por ter cedido os extratos e frações sem o qual este trabalho não poderia ser desenvolvido. Mas, também, pela confiança e palavras de motivação.

A **Profa. Dra. Virginia Soares Lemos** pelos conhecimentos compartilhados e confiança ao disponibilizar seu laboratório para a execução deste projeto.

A minha **tia Tânia** que teve papel importante na minha educação desde criança até hoje. Admiro sua clareza e bom senso em ver a vida e as pessoas ao seu redor. Muito obrigada por todo o apoio e atenção durante todos estes longos anos.

A minha grande amiga/irmã **Letícia Bailão** por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida mesmo estando tão longe. Muito obrigada pela amizade e companheirismo durante todos esses longos anos.

Ao meu grande amigo/irmão **Yuri Cesarino** pelas experiências de vida compartilhadas e todo o apoio que sempre se dispõe a dar apesar da distância.

Aos meus amigos do coração **Mariana Valcaccio, Priscylla Alves, Ramon Guerra, Mayara Pessoa, Glória Leite, Rayanne Araújo, Pablo Ferreira, Marcela Pessoa** pela amizade e momentos compartilhados nesta vida.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Ulrich e Daniela** por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, **Thiago, Lucas, Grazielle, Josiane e Eduardo** pela ajuda e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial a **Luciana Moreira, Lucas Alves, Fernando Pedro, Thiago Diniz, Matheus Barbosa, Laila Horta, Thamyris Santos, Caio Baeta, Ildernandes Vieira, Roberta Cristelli, Thais Muniz, Carina Sousa, Giane Campos, Iris Sousa** pelo apoio emocional e psicológico durante estes dois anos de pós-graduação, pela amizade e discussões calorosas. Vocês fizeram minha estadia em BH mais prazerosa. Muito, muito obrigada.

A todos **os colegas, professores e servidores** do programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia (PGFISFAR) da UFMG pelo companheirismo e cumplicidade na luta pela valorização da ciência brasileira.

“Vocês trabalham para quê? Eu sustento que a única finalidade da ciência está em aliviar a cansaça da existência humana. E se os cientistas, intimidados pela prepotência dos poderosos, acham que basta amontoar saber, por amor do saber, a ciência pode ser transformada em aleijão, e as suas novas máquinas serão novas aflições, nada mais. Com o tempo, é possível que vocês descubram tudo o que haja por descobrir, e ainda assim o seu avanço há de ser apenas um avanço para longe da humanidade.”

**Bertolt Brecht, Vida de Galileu Galilei**

## Investigação da atividade vascular do extrato e frações das folhas de *Plinia cauliflora* (Myrtaceae) em aorta de camundongo

### RESUMO

**Introdução:** A *Plinia cauliflora* Kausel (Myrtaceae), conhecida como “jabuticaba”, é uma planta nativa do Brasil. Esta produz uma fruta comestível, rica em compostos fenólicos, que tem sido descrita como hipotensora em ratos. As folhas da *P. cauliflora* são também ricas em polifenóis, mas ao contrário dos frutos, elas apresentam a vantagem de estarem disponíveis durante todo o ano. Apesar desta vantagem, o efeito do extrato das folhas sobre o sistema cardiovascular permanece desconhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito vasodilatador do extrato hidroalcoólico (EHA) e das frações aquosa (FA) e butanólica (FB), obtidos das folhas da *Plinia cauliflora*, em aorta de camundongo. **Métodos:** Todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA/UFMG (#218/2017). Para isso, foram utilizados camundongos machos Swiss com idade entre 10-12 semanas, os quais foram eutanasiados por decapitação. Para os experimentos *in vitro*, os anéis de aorta foram obtidos e colocados em um sistema para banho de órgãos isolados contendo solução de Krebs, aerados com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e mantidos numa tensão de 0,5g. Para os experimentos *in vivo*, foi realizada a técnica de pletismografia de cauda para medida da pressão arterial sistólica em camundongos normotensos conscientes. Esses animais foram divididos em três grupos: salina e dois tratados com uma injeção intraperitoneal da FA, nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. A pressão arterial foi medida nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. **Resultados e Discussão:** Nos anéis de aorta pré-contráidos com fenilefrina tanto o EHA como FA e FB foram capazes de induzir uma vasodilatação concentração-dependente, na presença de endotélio funcional. No entanto, na ausência de endotélio funcional, o efeito vasodilatador de EHA, FA e FB foi significativamente inibido. A pré-incubação com L-NAME (300 µM), um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS), aboliu a vasodilatação da FA, sugerindo que esta enzima está envolvida neste efeito. Além disso, na presença do wortmannin (30nM), um inibidor seletivo da PI3K, houve um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, com redução significativa do efeito máximo da fração. Na presença de um inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS, TRIM (300 µM), o efeito vasodilatador da FA não foi alterado. Finalmente, na presença do ODQ (10 µM), um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs), o efeito vasodilatador da FA foi abolido. Nos experimentos *in vivo*, a FA induziu um efeito hipotensor dose-dependente, sendo seu efeito máximo observado no tempo de 60 minutos. **Conclusão:** Todos estes resultados sugerem que o extrato e as frações das folhas de *Plinia cauliflora* promovem uma vasodilatação dependente do endotélio, com um mecanismo de ação dependente da formação de NO através da ativação da eNOS pela via da PI3K. Além disso, estes resultados também sugerem que a redução da resistência vascular periférica pode estar relacionada com o efeito hipotensor da FA em animais normotensos.

**Financiamento:** Capes e CNPq.

**Palavras – chave:** *Plinia cauliflora*, Jabuticaba, Vasodilatação, Óxido nítrico.

## Investigation of the vascular activity of the extract and fractions of the leaves of *Plinia cauliflora* (Myrtaceae) in aorta de mouse

### ABSTRACT

**Introduction:** *Plinia cauliflora* Kausel (Myrtaceae) known as “jabuticaba” is an edible plant native from Brazil. Its fruits are rich in polyphenolic compounds and have been described as hypotensive in rats. The leaves of *P. cauliflora* are also rich in polyphenolic compounds, but their effect in the cardiovascular system is still unknown. Therefore, the present study aimed at investigating the vasodilator effect of the polyphenolic-rich hydroalcoholic extract (EHA), aqueous (FA) and butanol (FB) fractions obtained of the leaves from *Plinia cauliflora* in mice aorta. **Methods:** All protocols were approved by CEUA/UFMG (#218/2017). Male Swiss mice (10-12 weeks) were euthanized by decapitation. Aortic rings were obtained and kept in an organ bath system containing Krebs at 37°C, gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, and maintained at a tension of 0.5g. Systolic blood pressure (SBP) of normotensive mice was measured by tail-cuff pletismography. The FA (10 and 30 mg/kg) was given intraperitoneally, single dose, in respective group of mice, and the SBP was monitored for 2 h. **Results and discussion:** In aortic rings pre-contracted with phenylephrine, EHA, FA, and FB induced a concentration- and endothelium-dependent vasodilatation. The pre-incubation with L-NAME (300 µM), a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), abolished the vasodilatation of FA. In addition, wortmannin (30nM), a selective inhibitor of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K), significantly shifted the concentration-response curve to the right and reduced the maximal effect of FA. In the presence of TRIM (300µM), a selective inhibitor of neuronal NOS (nNOS), the vasodilator effect of FA was not changed. Finally, in the presence of ODQ (10 µM), a selective inhibitor of the soluble guanylyl cyclase (sGC), the vasodilatation effect of FA was abolished. *In vivo* experiments, FA was able to induce a dose-dependent hypotensive effect in normotensive mice, with maximum response at 60 minutes. **Conclusions:** Altogether, these results suggest that the EHA, FA and FB promote an endothelium-dependent vasodilator effect. The vasodilation effect of FA involves the participation of the NO pathway. Furthermore, the FA was able to induce a hypotensive effect in normotensive mice. **Financial support:** Capes and CNPq.

**Keywords:** *Plinia cauliflora*, Jabuticaba, Vasodilatation, Nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Arquitetura e composição geral dos vasos sanguíneos. .... 13
- Figura 2** - Estrutura química dos principais tipos de flavonóides. .... 18
- Figura 3** - Esquema mostrando as diferentes vias ativadas pelos polifenóis para produzir seus efeitos benéficos. .... 19
- Figura 4** - Jabuticabeira..... 20
- Figura 5** - Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito de concentrações crescentes e cumulativas do extrato e frações da folha da *Pliniacauliflora* em anéis de aorta isolada de camundongos pré-contráídos com  $0,3\mu\text{M}$  de FEN com e sem endotélio funcional. (?): possível efeito do extrato e frações..... 26
- Figura 6** - Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito de concentrações crescentes e cumulativas da FA obtida das folhas da *Plinia cauliflora* em anéis de aorta isolada de camundongos pré-contráídos com  $0,3\mu\text{M}$  de FEN na presença de diferentes ferramentas farmacológicas. (?): possível efeito do extrato e frações..... 27
- Figura 7** - Pletismógrafo para medida da PAS em camundongos não anestesiados. ... 28
- Figura 8** - Curva concentração-resposta do EHA (A), FA (B) e FB (C) em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença (E+) (EHA,  $n = 5$ ; FA,  $n = 5$ ; FB,  $n = 5$ ) e na ausência (E-) (EHA,  $n = 5$ ; FA,  $n = 5$ ; FB,  $n = 5$ ) de endotélio funcional. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . .... 30
- Figura 9** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença ( $n = 5$ ) e na ausência ( $n = 5$ ) do L-NAME ( $300\mu\text{M}$ ). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\* $P < 0,001$  ..... 31
- Figura 10** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença ( $n = 5$ ) e na ausência ( $n = 5$ ) do wortmannin ( $30\text{ nM}$ ). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\* $P < 0,001$ . .... 32
- Figura 11** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença ( $n = 5$ ) e na ausência ( $n = 5$ ) do ODQ ( $10\mu\text{M}$ ). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\* $P < 0,0001$ ..... 33
- Figura 12** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença ( $n = 5$ ) e na ausência ( $n = 5$ ) do TRIM ( $300\mu\text{M}$ ). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. ... 34
- Figura 13** - Efeito dose resposta da FA ( $10\text{ mg/kg}$ ,  $n = 5$ ;  $30\text{ mg/kg}$ ,  $n = 5$ ) das folhas da *Plinia cauliflora*, administrado por via intraperitoneal (i.p.), sobre a pressão sanguínea sistólica (PAS) de camundongos normotensos não anestesiados. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. da diferença ( $\Delta\text{PAS}$ ) entre a PAS na ausência e na presença de FA. \* $P < 0,05$ , \*\*\*\* $P < 0,001$ ..... 35



## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Composição da solução de Krebs-Henseleit para aorta .....</i>	<i>23</i>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

<b>CMLV</b>	Célula muscular lisa vascular
<b>NOS</b>	Sinta do óxido nítrico
<b>CGs</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinase
<b>Akt</b>	Proteina-cinase B
<b>NO</b>	xido nítrico
<b>PKG</b>	Proteína cinase dependente de GMPc
<b>L-NAME</b>	N-nitro-L-arginina-metil-éster
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cclica
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>Emx</b>	Efeito máximo
<b>nNOS</b>	xido nítrico sintase neuronal
<b>eNOS</b>	xido nítrico sintase endotelial
<b>iNOS</b>	xido nítrico sintase induzvel
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Perxido de hidrognio
<b>ODQ</b>	1 H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona
<b>ROS</b>	Espcies reativas de oxignio
<b>PAS</b>	Presso arterial sistólica
<b>WT</b>	Wortmannin
<b>TRIM</b>	1-[2-(Trifluorometil)fenil]imidazole
<b>Src</b>	Protena tirosina cinaseSrc
<b>FA</b>	Frao aquosa
<b>FB</b>	Frao butanólica
<b>DC</b>	Dbito cardaco
<b>RVPT</b>	Resistncia vascular periférica total
<b>PA</b>	Presso arterial
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>TXA</b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>AA</b>	cido aracdônico
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>

<b>ET-1</b>	Endotelina – 1
<b>EDH</b>	Hiperpolarização derivada do endotélio
<b>CAM</b>	Calmodulina
<b>CAM-Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio-calmodulina
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>CBAs</b>	Compostos biotativos de alimentos
<b>K<sub>ca</sub></b>	Canal de potássio sensível ao cálcio
<b>ECJ</b>	Extrato da casca da jabuticaba
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>MLV</b>	Músculo liso vascular
<b>DCNT</b>	Doenças crônicas não transmissíveis
<b>EHJ</b>	Extrato hidroalcoólico da jabuticaba
<b>EHA</b>	Extrato hidroalcoólico
<b>SERCA</b>	Reticulo sarco/endoplasmático de Ca <sup>2+</sup> ATPase

## SUMÁRIO

<b>1.1 Sistema Cardiovascular .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Produtos Naturais.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Compostos fenólicos.....	17
1.2.2 <i>Plinia cauliflora</i> .....	19
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>3 – METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Drogas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Soluções fisiológicas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Estudos <i>in vitro</i>: reatividade vascular.....</b>	<b>25</b>
3.5.1 Preparação de anéis de aorta isolada de camundongos.....	25
3.5.2 Avaliação da atividade do EHA e frações aquosa (FA) e butanólica (FB) das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> em aorta isolada de camundongo.....	25
3.5.3 Determinação da participação de mediadores endoteliais no efeito vasorrelaxante induzido pela FA em anéis de aorta isolada de camundongo.....	26
<b>3.6 Estudos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>28</b>
3.5.1 Medida da pressão arterial sistólica.....	28
<b>3.7 Análise Estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Ensaio <i>in vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Efeito do EHA e suas frações, aquosa (FA) e butanólica (FB), em anéis de aorta isolada de camundongos pré-contraindidos com fenilefrina.....	30
4.1.2 Participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) na resposta induzida pela FA em anéis de aorta de camundongos.....	31
4.1.3 Envolvimento da via da PI3K/Akt no efeito induzido pela FA em anéis de aorta de camundongos.....	31
4.1.4 Participação da enzima guanilil ciclase solúvel (CGs) na vasodilatação induzida pela FA em anéis de aorta de camundongos.....	32
4.1.5 Avaliação do envolvimento da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) no efeito produzido pela FA em anéis de aorta isolada de camundongos.....	33

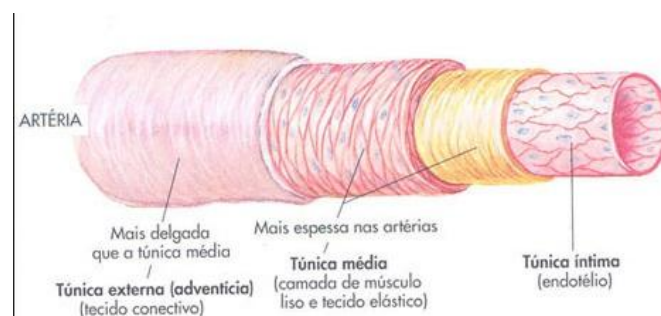
<b>4.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....</b>	<b>34</b>
4.2.1 Efeito agudo da administração intraperitoneal (i.p.) da FA sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em camundongos normotensos.....	34
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema Cardiovascular

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial (PA), onde esta última é o resultado do produto entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT) (Campagnole-Santos e Haibara, 2001). A RVPT é determinada pelo tônus vascular, o qual é controlado pela interação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras geradas por diversos estímulos como hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos. Todos estes sinais estabelecem o diâmetro e a resistência dos vasos sanguíneos (Jackson, 2000).

Os vasos sanguíneos, por sua vez, são formados internamente por três camadas distintas: uma mais externa, composta por algumas fibras elásticas e colágeno; a túnica média, composta por células musculares lisas; e uma mais íntima, composta por células endoteliais. O endotélio é o principal responsável pelo controle da homeostasia cardiovascular devido às inúmeras funções desempenhadas: controle da fluidez de sangue, agregação plaquetária e regulação do tônus vascular em resposta a hormônios vasoativos ou metabólitos, assegurando assim a provisão adequada de nutrientes (Feletou *et al.*, 2010).



**Figura 1** -Arquitetura e composição geral dos vasos sanguíneos.  
**Fonte:** <http://www.auladeanatomia.com/cardiovascular/vasos.jpg>

As células endoteliais são capazes de sintetizar fatores que conduzem à contração ou ao relaxamento das células musculares lisas vasculares. Dentre os fatores contráteis derivados do endotélio temos os derivados dos metabólitos do ácido araquidônico (AA) pela ciclooxigenase (COX) (tromboxano - TXA<sub>2</sub>) e prostaglandinas

(PGH<sub>2</sub>), as espécies reativas de oxigênio (ROS) e endotelina-1 (ET-1). Já os fatores relaxantes são o óxido nítrico (NO), metabólitos do AA produzidos pelas enzimas COX (prostaciclina - PGI<sub>2</sub>) e ainda a hiperpolarização derivada do endotélio (EDH) (Feletou *et al.*, 2010; Feletou e Vanhoutte, 2013).

Dentre os fatores relaxantes derivados do endotélio, o óxido nítrico (NO) é o principal fator responsável pelo vasorrelaxamento nas artérias de grande calibre, além de ser importante para o desenvolvimento de diversas funções biológicas, como inibição da adesão e agregação plaquetária, redução da adesão de leucócitos para o endotélio e supressão da proliferação de células musculares lisas vasculares (Pohl *et al.*, 2000). Esta molécula foi, inicialmente, descrita por Furchgott como um “Fator Relaxante Derivado do Endotélio - EDRF” ao observar que o endotélio vascular era capaz de produzir um vasodilatador endógeno. Anos mais tarde, em 1986, Ignarro *et al.* verificou que o EDRF tinha função relaxante idêntica ao NO acompanhado da elevação dos níveis da guanilatociclase solúvel (CGc). Assim, essa produção de NO é promovida a partir de uma conversão enzimática do aminoácido L-arginina formando L-citrulina e NO. O NO, por sua vez, difunde-se para as células musculares lisas vasculares, estimulando a GCs, metabolizando trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que por sua vez, ativa a proteína cinase G (PKG) promovendo a recaptação de Ca<sup>2+</sup> para os estoques intracelulares, via bomba do retículo sarco/endoplasmático Ca<sup>2+</sup>ATPase (SERCA), abertura dos canais de K<sup>+</sup> e fechamento dos canais de Ca<sup>2+</sup>. Todos estes eventos diminuem a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular resultando em vasorrelaxamento (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1986; Moncada *et al.*, 1991).

A enzima responsável pela produção de NO é denominada NO sintase (NOS) a qual contém o grupamento heme que catalisa a reação de oxidação da L-arginina. Esta enzima apresenta três isoformas e foram nomeadas de acordo com o tecido do qual foram descobertas inicialmente: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), sendo as duas primeiras expressas constitutivamente e a última induzida por citocinas. A eNOS é um determinante chave da homeostasia vascular, sendo regulada por diversos receptores de superfície celular que tem sua atividade caracterizada pela ligação da calmodulina ao cálcio (CAM-Ca<sup>2+</sup>) e por alterações na fosforilação pela ação de cinases específicas (Vanhoutte, 1989; Moncada *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 2001; Rafikov *et al.*, 2011). Além desta isoforma, alguns estudos mostraram que a nNOS está

presente em tecidos não neuronal, como o endotélio vascular (Huang *et al.*, 2002; Bachetti *et al.*, 2004), e participa do efeito relaxante induzido pela acetilcolina em algumas artérias (Fleming, 2000) por meio da formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), levando a ativação dos canais de potássio sensíveis ao cálcio ( $K_{Ca}$ ) presentes nas células musculares lisas vasculares resultando uma hiperpolarização (Barlow e White, 1998; Barlow *et al.*, 2000; Capettini *et al.*, 2008).

Em condições fisiológicas normais existe um equilíbrio entre a produção e liberação dos fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. No entanto, em algumas condições clínicas, como na hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio na produção desses fatores resultando numa diminuição dos fatores relaxantes e uma vasoconstrição excessiva. A este fenômeno dar-se o nome de disfunção endotelial que é um evento precoce na fisiopatologia das doenças cardiovasculares e tem sido associada à hipertensão (Caramori e Zago, 2000; Vanhoutte, 2009; Feletou *et al.*, 2010). A hipertensão arterial é determinada clinicamente como a condição patológica na qual o indivíduo apresenta uma pressão arterial sistólica superior ou igual a 140 mmHg, e uma pressão arterial diastólica superior ou igual a 90 mmHg, em indivíduos que não estejam fazendo uso de medicação anti-hipertensiva. Trata-se de uma doença crônica, que contribui de forma significativa para sérias complicações médicas como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

Estudos mostram que a biodisponibilidade do NO está reduzida na disfunção endotelial (Vanhoutte, 2009), isso porque há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) o que leva a oxidação do cofator tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) presente na eNOS e essencial para o seu funcionamento, bem como à redução no substrato desta enzima, a L-arginina. Todos estes fatores contribuem para o desacoplamento da eNOS e conseqüentemente perda de sua capacidade em converter a L-arginina (Kolluru *et al.*, 2010; Serban *et al.*, 2010; Bourque *et al.*, 2011). Assim, são interessantes estratégias terapêuticas que venham a restabelecer e conservar a sinalização adequada do NO como tratamento efetivo de doenças cardiovasculares, como a hipertensão.



## **1.2 Produtos Naturais**

A utilização de plantas como alternativa terapêutica é estabelecida desde a antiguidade até os dias atuais (Lee, 2004). Atualmente, cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento depende do uso de plantas medicinais para assistência primária à saúde (Hostettmann e Marston, 2002). Dessa forma, as plantas medicinais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (Chin *et al.*, 2006; Butler, 2008; Newman e Cragg, 2016).

Historicamente, a química orgânica desenvolveu-se paralelamente com o estudo científico das plantas devido a sua grande contribuição para o tratamento de inúmeras doenças, levando ao isolamento de alguns princípios ativos a partir de plantas até então conhecidas como medicinais (Montanari e Bolzani, 2001). Um total de 122 produtos naturais oriundos de plantas é utilizado como fármaco, sendo que 80% dos usos estão relacionados ao conhecimento tradicional (Farnsworth *et al.*, 1985).

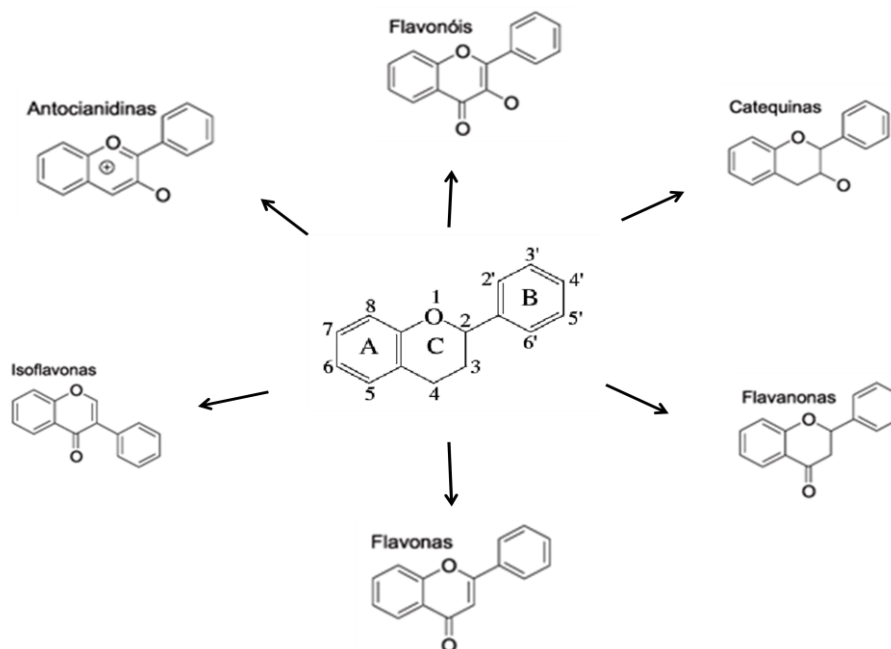
Com relação aos fármacos anti-hipertensivos, dos 80 novos fármacos aprovados no período entre janeiro de 1981 e dezembro de 2014, dois são derivados de produtos naturais, 50 foram sintetizados com base em protótipos naturais, e 28 são produtos de síntese aleatória (Newman e Cragg, 2016). Embora o número de novos derivados de produtos naturais tenha sido reduzido em 2004, vários fármacos desta origem foram registrados para ensaios clínicos de fase III nos Estados Unidos, neste mesmo ano (Butler, 2004). Assim, os produtos naturais têm um papel importante no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de diversas doenças, tornando-se uma solução para a atual crise de produtividade da comunidade científica no que tange a descoberta de novos medicamentos.

Embora existam muitos medicamentos para o tratamento da hipertensão arterial, há um grande interesse na pesquisa de novos produtos para encontrar alternativas ao tratamento de hipertensão (Paulis e Unger, 2010). Estudos experimentais e clínicos indicam que o consumo de alimentos ricos em polifenóis, como frutas, os vegetais, bebidas e derivados de plantas como o cacau, vinho tinto e chás podem representar um benefício em termos de proteção cardiovascular quando incluídos na dieta. Estudos epidemiológicos demonstram uma relação inversa entre o consumo de polifenóis e o risco de doenças cardiovasculares (Carvalho *et al.*, 2001; Di Castelnuovo *et al.*, 2002;

Stoclet *et al.*, 2004; Schini-Kerth *et al.*, 2010). Além disso, numerosos estudos mostraram que tanto a administração aguda quanto a crônica de várias preparações de alimentos e bebidas ricos em polifenóis têm efeitos benéficos nos parâmetros hemodinâmicos em pacientes e animais (Madeira *et al.*, 2009; Schini-Kerth *et al.*, 2010; Luciano *et al.*, 2011; Andriantsitohaina *et al.*, 2012; Dellacqua, 2012).

### **1.2.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são um dos principais grupos de Compostos Bioativos de Alimentos (CBAs), que são metabólitos secundários de plantas os quais apresentam benefícios para a saúde humana, reduzindo o risco de desenvolvimento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (Del Rio *et al.*, 2013). Estes compostos são assim denominados porque possui um grupo funcional hidroxil (OH) ligado a um anel aromático. Estes compostos se dividem em dois grupos: flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides apresentam uma estrutura básica com 15 átomos de carbono na configuração de C6-C3-C6, o difenilpropano, e são os presentes em maior proporção nas partes das plantas e alimentos, sendo os principais responsáveis pelos efeitos benéficos para a saúde humana (Março *et al.*, 2008). Já o grupo dos não flavonóides é representado pelos ácidos fenólicos e estilbenos. Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos benzóicos, cinâmico e seus derivados. Os hidroxibenzóicos têm como representantes os ácidos gálicos e elágicos, os quais são precursores dos taninos gálicos e elágicos, respectivamente. Estes taninos, por sua vez, estão presentes nas uvas, vinhos, frutas vermelhas, chá verde, etc. Outro representante dos não flavonóides são os estilbenos que compreende o resveratrol, principal composto presente no vinho e responsável por inúmeras propriedades farmacológicas (Scalbert e Williamson, 2000; Crozier *et al.*, 2009).

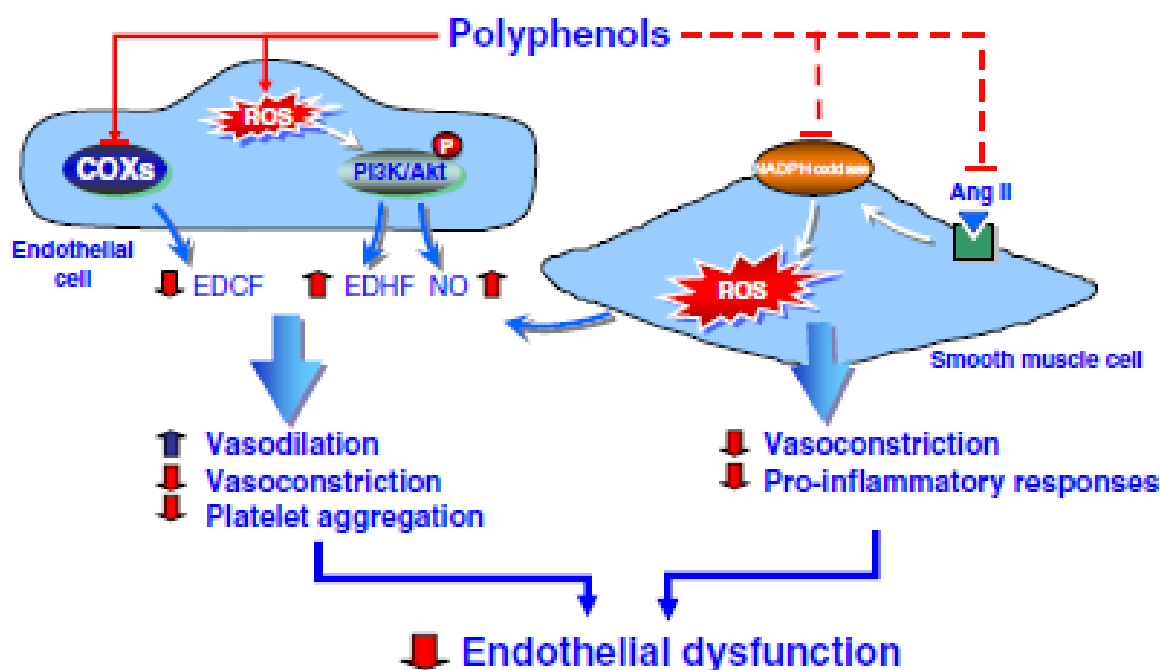


**Figura 2** - Estrutura química dos principais tipos de flavonóides.  
**Fonte:** MARÇO et al., 2008.

Estudos epidemiológicos têm sugerido que uma dieta rica em polifenóis reduz a incidência de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (Hertog *et al.*, 1995; Di Castelnuovo *et al.*, 2002; Mukamal *et al.*, 2002; Stoclet *et al.*, 2004; Sofi *et al.*, 2008). Diversos estudos foram realizados mostrando os efeitos benéficos dos compostos fenólicos sobre o sistema cardiovascular, como a sua capacidade em diminuir o estresse oxidativo vascular levando a uma melhora da função endotelial. Ainda, estes compostos induziram um vasorrelaxamento dependente de endotélio envolvendo, principalmente, a via do NO (Torel *et al.*, 1986; Robak e Gryglewski, 1988; Hu *et al.*, 1995; Nijveldt *et al.*, 2001).

Como mostra a figura 3, os polifenóis podem levar a formação de ROS, principalmente ânion superóxido ( $O_2^-$ ), resultando na estimulação da via da PI3-kinase/Akt/eNOS (Ndiaye *et al.*, 2005; Anselm *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2009), bem como aumentam os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular o que reforça a produção de NO pelas células endoteliais (Martin *et al.*, 2002; Andriantsitohaina *et al.*, 2012). Além disso, estes compostos são capazes de inibir a via da COX e com isso produzir uma diminuição na liberação de fatores contráteis derivados do endotélio (Kane *et al.*, 2010). Outro mecanismo envolvendo a ação dos compostos fenólicos é a inibição da via da angiotensina II/NADPH oxidase o qual resulta numa diminuição na formação de

ROS(Sarr *et al.*, 2006). Todos estes processos levam a um aumento na vasodilatação e uma diminuição na vasoconstrição, além de reduzir a agregação plaquetária e respostas pró - inflamatórias consequentemente melhorando a disfunção endotelial, a qual está presente em diversas patologias como a hipertensão. Assim, os polifenóis são capazes de ativar diferentes vias para produzir seus efeitos benéficos para o sistema cardiovascular (Li *et al.*, 2009; Schini-Kerth *et al.*, 2010).



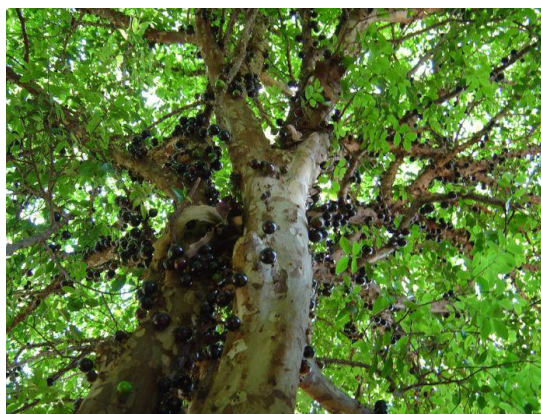
**Figura 3** -Esquema mostrando as diferentes vias ativadas pelos polifenóis para produzir seus efeitos benéficos.

Fonte: SCHINI-KERTH *et al.*, 2010

### 1.2.2 *Plinia cauliflora*

Inúmeros estudos têm mostrado que as frutas vermelhas/escuras são uma fonte rica em compostos bioativos, os quais apresentam um caráter antioxidante e anti-inflamatório, além de importantes efeitos sobre a obesidade, doenças cardiovasculares, infecções do trato urinário, entre outras condições clínicas (Blumberg *et al.*, 2013; Xiao, 2015; Da Silva *et al.*, 2016). Neste contexto, a espécie *Plinia*, que tem fruto com característica globosa e coloração que varia do roxo ao preto, apresenta numerosos compostos bioativos e dentre eles estão os polifenóis (Torel *et al.*, 1986; Robak e Gryglewski, 1988; Hu *et al.*, 1995; Nijveldt *et al.*, 2001). A *Plinia cauliflora*,

popularmente conhecida como jabuticaba “Sabará”, é uma planta nativa da Mata Atlântica da família Myrtaceae com origem no centro-sul do Brasil, mas podendo ser cultivada também no extremo norte do país e outros países, como Argentina, Uruguai e Paraguai. Além disso, seu fruto é muito utilizado na fabricação de vinhos, licores, geléias, sucos, além de ser bastante apreciada no consumo in natura (Ap *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2014; De Sá *et al.*, 2014).



**Figura 4** -Jabuticabeira

Fonte: <http://www.portaagropecuario.com.br/agricultura/fruticultura/>

Foram identificados na casca de diferentes espécies de *Plinia* vários compostos fenólicos, antioxidantes, flavonóides e antocianinas, elagitaninos, ácido gálico e cumarinas que não se encontram na polpa da fruta (Reynertson *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2016). Além disso, seu fruto é utilizado na medicina popular como anti-inflamatório, antidiarréico e anti-hemoptise (Araújo *et al.*, 2014).

Ainda são poucos os estudos sobre o conteúdo fenólico presente na *Plinia*, mas alguns compostos bioativos têm sido descritos na casca do fruto da jabuticaba, principalmente as antocianinas, quercetina, terpenos, entre outros que poderiam estar relacionados com os seus efeitos benéficos. Estudos mostraram que o liofilizado da casca desta fruta foi capaz de prevenir e diminuir a peroxidação lipídica no fígado e cérebro, além de aumentar as defesas antioxidantes em ratos obesos (Batista *et al.*, 2014). Ainda, foi observado que extratos derivados da folha desta planta apresentaram efeito antimicrobiano contra bactérias Gram negativas e positivas, além de leveduras (Souza-Moreira *et al.*, 2010; Chavasco *et al.*, 2014).

Estudos mostraram o efeito do extrato da casca da jabuticaba (ECJ) sobre a disfunção mitocondrial presente em algumas fisiopatologias que apresentam um aumento do estresse oxidativo e/ou nitrosativo, utilizando fibroblastos humanos (MRC-5). O ECJ foi capaz de minimizar o aumento da peroxidação lipídica, os níveis de óxido nítrico e a perda da viabilidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células MRC-5 por meio da modulação na função mitocondrial(Calloni *et al.*, 2015).

No sistema cardiovascular, o extrato hidroalcoólico das cascas dos frutos da espécie *Plinia cauliflora* apresentou um potencial relaxante e hipotensor, bem como estudos com as cascas da espécie *Plinia peruviana* mostraram um efeito vasorrelaxante *in vitro*, decorrente da ativação das vias do NO/GCs e, pelo menos em parte, da PI3K/Akt, mostrando que o gênero *Plinia* possui efeitos benéficos (VOGEL 2015). Além disso, estudos recentes com o extrato hidroalcoólico da jabuticaba (EHJ) mostrou um efeito vasorrelaxante independente do endotélio, agindo diretamente sobre o músculo liso vascular (MLV) por meio do bloqueio do influxo de Ca<sup>2+</sup> através da membrana plasmática e ativação dos canais de K<sup>+</sup>. Tudo isso confere à jabuticaba múltiplos efeitos sobre o sistema cardiovascular(De Andrade *et al.*, 2016).

A atividade cardiovascular benéfica também foi estudada em modelos animais *in vivo*. O estudo realizado por SOUZA et al. (2017) mostrou queo tratamento crônico com o EHJ em ratos hipertensos resultou numa diminuição da hipertensão devido ao aumento da biodisponibilidade de NO, além de melhorar a contração e o relaxamento dependente e independente de endotélio em ratos hipertensos tratados com o EHJ.

Visto todos os benefícios desencadeados pelas diferentes espécies de *Plinia* para a saúde humana, a jabuticaba tem despertado grande interesse terapêutico na área da farmacologia cardiovascular, no entanto, estudos sobre seus efeitos no sistema cardiovascular ainda são escassos. Assim, o presente estudo procurou avaliar o efeito vascular e respectivo mecanismo de ação do extrato hidroalcoólico (EHA) e das frações aquosa (FA) e butanólica (FB) obtidos das folhas de *Plinia cauliflora* em aorta isolada de camundongos.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a atividade vasodilatadora e respectivo mecanismo de ação do extrato hidroalcoólico e frações ricas em polifenóis obtidas das folhas de *Plinia cauliflora* em aorta isolada de camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar a relação concentração-efeito para a atividade vasodilatadora do extrato hidroalcoólico (EHA) e das frações aquosa (FA) e butanólica (FB) de *Plinia cauliflora*.

Avaliar a participação do endotélio na atividade vasodilatadora do extrato hidroalcoólico (EHA) e das frações aquosa (FA) e butanólica (FB) de *Plinia cauliflora*.

Avaliar a participação do NO na atividade vasodilatadora extrato hidroalcoólico (EHA) e das frações aquosa (FA) e butanólica (FB) de *Plinia cauliflora*.

Avaliar a participação da PI3K e da guanilato ciclase na atividade vasodilatadora da fração mais ativa isolada de *Plinia cauliflora*.

Avaliar se a fração mais ativa obtida de *Plinia cauliflora* é capaz de reduzir a pressão arterial em camundongos normotensos.

### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss, com idade entre 10 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram utilizados no presente estudo. Os camundongos foram mantidos sob condições controle de temperatura ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimentação.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 218/2017.

#### 3.2 Drogas

O extrato hidroalcoólico e as frações das folhas da *Plinia cauliflora* foram fornecidos pela Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho, do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Outras drogas: acetilcolina, fenilefrina, L-NAME, wortmannin, ODQ e TRIM foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

#### 3.3 Soluções fisiológicas

Para a preparação das soluções tampões foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), Glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

Sais	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,2
$\text{MgSO}_4$	1,2
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	11,1
$\text{NaHCO}_3$	25
$\text{CaCl}_2$	2,5

**Tabela 1** - Composição da solução de Krebs-Henseleit para aorta

#### 3.4 Obtenção do EHA e das FA e FB das folhas da planta *Plinia cauliflora*

As folhas da jaboticabeira foram coletadas em novembro de 2014, na faculdade de Educação Física, do Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais



(UFMG), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Após a coleta, as folhas de *P. cauliflora* foram selecionadas, separadas e secas em estufa com circulação de ar a 40°C por 3 dias consecutivos. Em seguida, procedeu-se a pulverização das folhas através de um moinho de facas. A droga vegetal obtida foi armazenada num frasco de vidro sob abrigo da luz.

Para proceder à extração, pesou-se 5 g do pó da folha em um béquer e adicionou 50 ml de uma mistura de etanol/água (1:1). Em seguida, o béquer foi colocado em banho ultrassom por 20 minutos. Transferiu-se a solução para tubos Falcon de 15 ml para posterior centrifugação por 2 minutos a 2000 rpm. Após repouso, recolheu o sobrenadante em um balão de fundo redondo, com auxílio de um funil simples e algodão, para impedir a passagem do pó da planta. O extrato obtido teve sua parte alcoólica evaporada em rotaevaporador sob pressão reduzida à 60°C e seco em liofilizador por 48 horas.

Para proceder ao fracionamento, o EHA obtido anteriormente foi submetido a uma partição líquido-líquido com solventes imiscíveis. Pesou-se 500mg do extrato e solubilizou em 50 mL uma mistura de etanol/água (1:1). Transferiu-se a solução para um funil de separação (125 mL) e foram adicionados 50 mL de diclorometano, sob agitação moderada para evitar formação de emulação, extraíndo a fração polar de interesse e repetindo essa operação com mais três alíquotas de 50 mL cada de diclorometano. As frações aquosas foram reunidas num balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 60°C, até a completa retirada do solvente, transferidas para frascos previamente pesados e posteriormente submetidas a um liofilizador por 24 horas até obtenção de pó.

A fração aquosa seca foi utilizada para outro fracionamento com gradiente de polaridade, iniciando com diclorometano, seguido de acetato de etila e butanol, obtendo-se, então, quatro frações de polaridades distintas. Pesou-se 200 mg da fração aquosa, dissolveu-se em 50 mL de água destilada e transferiu-se para um funil de separação (250 mL) adicionando-se 50 mL de diclorometano, repetindo-se mais três vezes com porções de 50 mL cada vez. Todas as fases de diclorometano foram reunidas num balão de fundo redondo (500 mL) e secas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 60°C transferidas para frascos previamente pesados. Em seguida lavou-se a fase aquosa com 50 ml de acetato de etila, repetindo-se a operação mais três vezes, as fases foram

reunidas com posterior secagem em rotaevaporador. Então, a fração butanólica foi extraída da mesma forma que a anterior. Desta forma, o que restou no balão foi a fração aquosa que foi seca em liofilizador por 48 horas.

### **3.5 Estudos *in vitro*: reatividade vascular**

#### **3.5.1 Preparação de anéis de aorta isolada de camundongos**

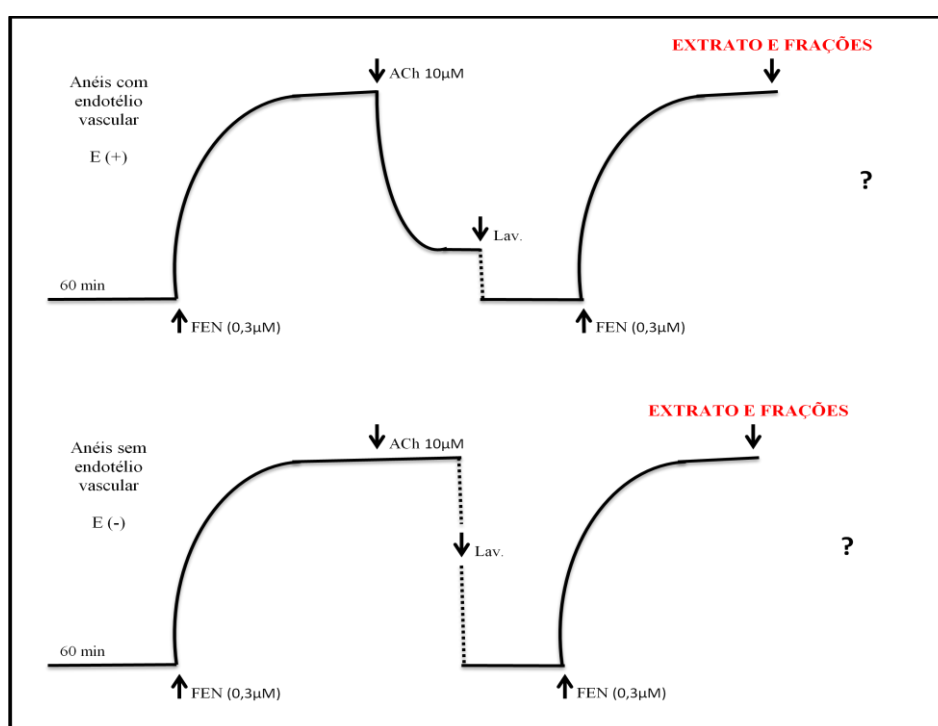
Os animais foram sacrificados por decapitação e através de uma incisão no tórax do animal, a aorta torácica foi removida. Anéis aórticos (2 – 4 mm) foram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável conectadas à transdutores isométricos (Modelo Force 10g, World Precision Instruments, Inc., USA), acoplados a um amplificador (Modelo TBM4; World Precision Instruments, Inc., USA), e este conectado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (Modelo DI720; Dataq Inc. USA). Para registro foi utilizado o programa Windaq (Datacq, Inc., USA) para aquisição e análise dos dados experimentais. Os anéis foram mantidos em sistema de banho de órgãos para tecido isolado (10 mL), contendo solução de Krebs à 37 °C aerados com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e estabilizados por um período de 60 minutos, na tensão inicial de 0,5 g. Para realização dos experimentos com anéis sem endotélio, eles foram submetidos a um leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de aço inoxidável. A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento induzido por 10µM de acetilcolina (ACh) sobre anéis pré-contraídos com 0,3µM de fenilefrina (FEN). Foram considerados com endotélio os anéis com relaxamento superior a 70%, e sem endotélio os anéis com relaxamento inferior a 10%.

#### **3.5.2 Avaliação da atividade do EHA e frações aquosa (FA) e butanólica (FB) das folhas de *Plinia cauliflora* em aorta isolada de camundongo**

Após a verificação da presença ou ausência de endotélio funcional, como descrito acima, as preparações foram submetidas a um período de estabilização, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, uma segunda contração com FEN (0,3µM) foi induzida e no componente tônico desta contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas (1 – 300 µg/mL) do EHA e das FA e FB, a fim de obter uma

curva concentração-resposta. As respostas foram expressas como porcentagem do efeito em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do efeito vascular dos compostos foram avaliadas por meio dos valores do log negativo da concentração inibitória de 50% do efeito contrátil (pIC<sub>50</sub>) e pelo efeito máximo (Emáx) obtido com os materiais estudados, respectivamente. Os experimentos subsequentes foram realizados apenas com as frações em anéis com endotélio funcional.

Para a determinação do mecanismo de ação envolvido no vasorrelaxamento da FA, os anéis de aorta foram pré-incubados durante 30 minutos com as seguintes ferramentas farmacológicas: L-NAME (300μM), inibidor não seletivo da NOS, ODQ (10μM), um inibidor seletivo da CGs, wortmannin (30nM), um inibidor não seletivo para a PI3K, TRIM (300μM) e um inibidor seletivo para a nNOS.



**Figura 5** - Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito de concentrações crescentes e cumulativas do extrato e frações da folha da *Pliniacauliflora* em anéis de aorta isolada de camundongos pré-contraídos com 0,3μM de FEN com e sem endotélio funcional. (?): possível efeito do extrato e frações.

### 3.5.3 Determinação da participação de mediadores endoteliais no efeito vasorrelaxante induzido pela FA em anéis de aorta isolada de camundongo

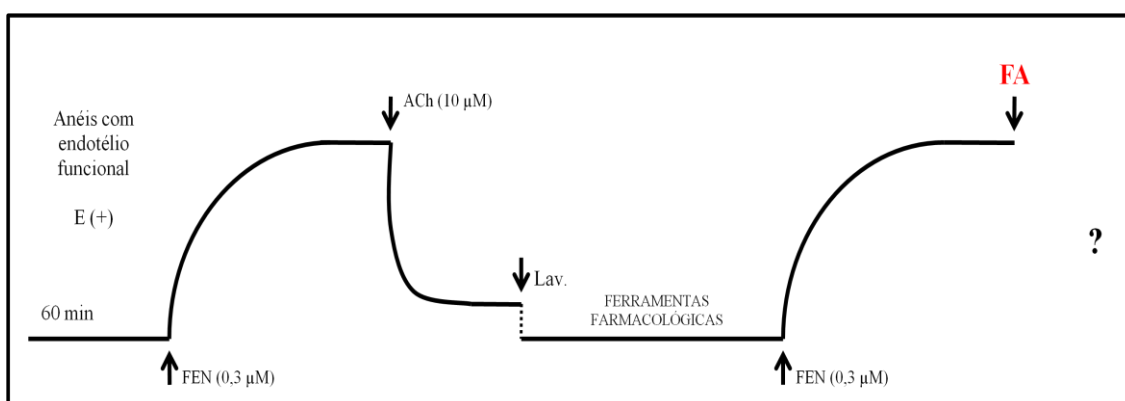
Com a finalidade de investigar a participação da enzima NO sintase na resposta vasorrelaxante promovida pela FA, os anéis de aorta com endotélio funcional foram

pré-incubados com L-NAME. Após trinta minutos de incubação, induziu-se uma contração com fenilefrina ( $0,3\mu\text{M}$ ) e na fase tônica e sustentada desta contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas das frações ( $1-1000\mu\text{g/mL}$ , usando fator de 3 entre cada concentração) para obtenção de uma curva concentração-resposta. O efeito vasorrelaxante da fração foi avaliado na ausência e na presença dos inibidores.

Para avaliar a participação da PI3K sobre o efeito vasodilatador da FA, os vasos foram incubados com wortmannin ( $30\text{nM}$ ), inibidor seletivo dessa enzima, por 30 minutos. Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe ( $0,3\mu\text{M}$ ) e, após estabilização da resposta contrátil, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas com a fração ( $1-300\mu\text{g/mL}$ , usando fator de 3 entre cada concentração).

A participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) na vasodilatação induzida pela FA foi avaliada através de experimentos realizados na ausência e na presença de 1H-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-a]-quinoxalin-1-ona (ODQ;  $10\mu\text{M}$ ), inibidor seletivo desta enzima. Os anéis de aorta foram pré-incubados com ODQ por 30 minutos e, então, pré-contraídos com Phe ( $0,3\mu\text{M}$ ) e, após estabilização da resposta contrátil, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas com as frações ( $1-300\mu\text{g/mL}$ ).

Com o objetivo de avaliar a participação da isoforma nNOS no efeito induzido pela fração, os anéis com endotélio funcional foram pré-incubados, por 30 minutos, com TRIM. Em seguida, uma contração foi induzida e na fase tônica e sustentada desta contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas da FA ( $1-300\mu\text{g/mL}$ ) para obtenção de uma curva concentração-resposta. O efeito vasorrelaxante da fração foi avaliado na ausência e na presença dos inibidores.



**Figura 6** - Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo do efeito de concentrações crescentes e cumulativas da FA obtida das folhas da *Plinia cauliflora* em anéis de aorta

isolada de camundongos pré-contráídos com 0,3 $\mu$ M de FEN na presença de diferentes ferramentas farmacológicas. (?): possível efeito do extrato e frações.

### 3.6 Estudos *in vivo*

#### 3.5.1 Medida da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida pelo método de pletismografia de cauda, usando um aparelho modelo MRBP System (IITC Life Science, Inc.). Os camundongos conscientes foram condicionados a uma câmara aquecida controlada à 32°C durante 10 minutos. Após este período, um sensor integrado a um manguito foi colocado e usado para a medida da PAS em diferentes tempos (15, 30, 60, 90 e 120 minutos). As medidas foram registradas usando um sistema de aquisição de dados. Dessa forma, foi possível obter curvas que representam o perfil da PAS de cada animal. Um período de adaptação de 2 semana para a administração do veículo e medidas da PAS foi realizado antes do início dos experimentos. Após a medida da PAS basal, foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) salina, 30 e 10 mg/kg da FA dissolvida em salina em cada animal.



**Figura 7** - Pletismógrafo para medida da PAS em camundongos não anestesiados.

### **3.7 Análise Estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta foram avaliadas por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), com pós-teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no programa “GraphPad Prism”, versão 6.0.

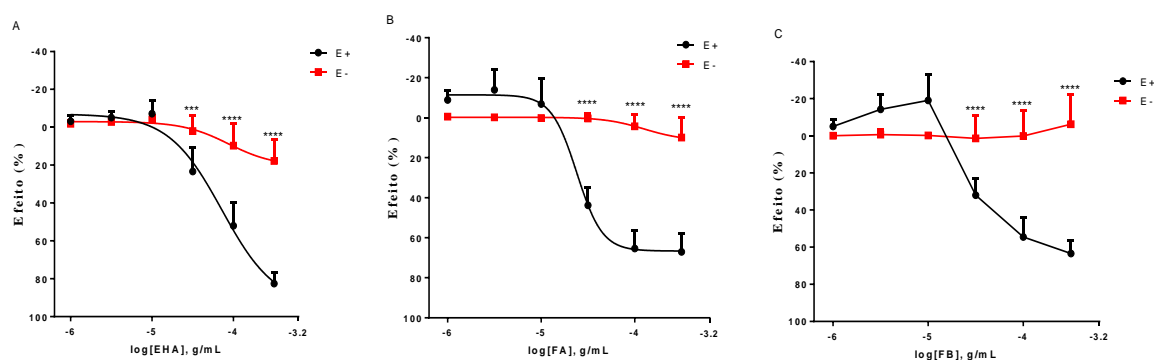
## 4 – RESULTADOS

### 4.1 Ensaios *in vitro*

#### 4.1.1 Efeito do EHA e suas frações, aquosa (FA) e butanólica (FB), em anéis de aorta isolada de camundongos pré-contraídos com fenilefrina

Após adição crescente e cumulativa do EHA obtido das folhas da *Plinia cauliflora* (1, 3, 10, 30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ), observou-se um efeito vasodilatador, concentração-dependente, em preparações com endotélio funcional ( $E_{\text{máx}}$ :  $82,53 \pm 2,48$  %;  $p\text{CI}_{50}$ :  $4,15 \pm 0,13$  g/mL). No entanto, quando o endotélio foi removido, o efeito vasodilatador foi significativamente inibido ( $E_{\text{máx}}$ :  $17,76 \pm 4,96$  %) (Figura 8A).

Em anéis pré-contraídos com FEN, as FA e FB foram capazes de induzir um efeito vasodilatador, concentração-dependente, em preparações com o endotélio intacto ( $E_{\text{máx}}$ :  $67,01 \pm 3,96$  %;  $p\text{CI}_{50}$ :  $4,61 \pm 0,05$  g/mL;  $E_{\text{máx}}$ :  $63,40 \pm 3,54$  %;  $p\text{CI}_{50}$ :  $4,42 \pm 0,06$  g/mL, respectivamente). Na ausência de endotélio funcional, as curvas concentração-resposta para FA e FB foram completamente inibidas ( $E_{\text{máx}}$ :  $9,91 \pm 4,52$  %;  $E_{\text{máx}}$ :  $-6,30 \pm 8,00$  %, respectivamente) (Figura 8B e 8C).



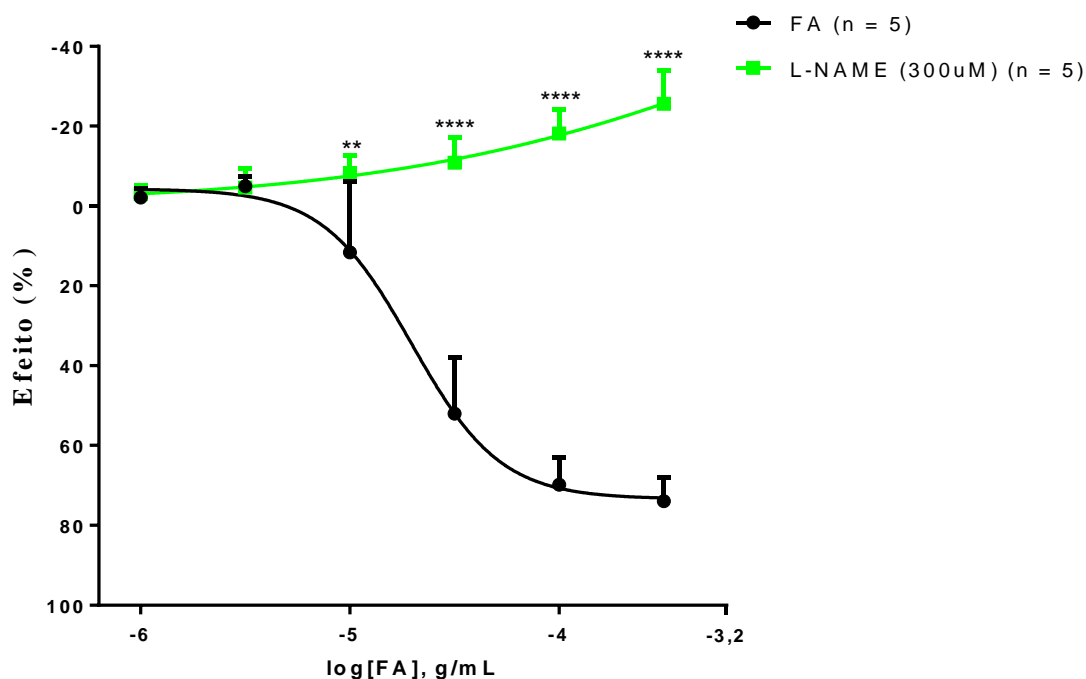
**Figura 8** - Curva concentração-resposta do EHA (A), FA (B) e FB (C) em anéis de aorta de camundongos pré-contraídos com fenilefrina na presença (E+) (EHA, n = 5; FA, n = 5; FB, n = 5) e na ausência (E-) (EHA, n = 5; FA, n = 5; FB, n = 5) de endotélio funcional. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P < 0,0001.

Com a constatação que houve diferença significativa entre os anéis com e sem endotélio e que o efeito vasodilatador, tanto do EHA, como das FA e FB, foi observado nas preparações com endotélio funcional, os experimentos subsequentes foram

realizados na presença do endotélio funcional. Além disso, também pode ser observado que a FA apresenta maior potência e menor efeito contrátil nas concentrações mais baixas. Por estes motivos, a investigação do mecanismo de ação foi realizada com a FA.

#### 4.1.2 Participação da enzima NOS na resposta induzida pela FA em anéis de aorta de camundongos

Nos anéis pré-incubados com L-NAME (300  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da NOS, o efeito vasodilatador produzido pela FA foi abolido quando comparado à resposta obtida na ausência deste inibidor ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $-25,62 \pm 3,74\%$ ;  $E_{m\acute{a}x}$ :  $73,90 \pm 2,58\%$ ;  $pCI_{50}$ :  $4,65 \pm 0,12$  g/mL, respectivamente) (Figura 9). Observa-se que na presença de L-NAME a FA produz um efeito contrátil adicional ao observado com FEN.

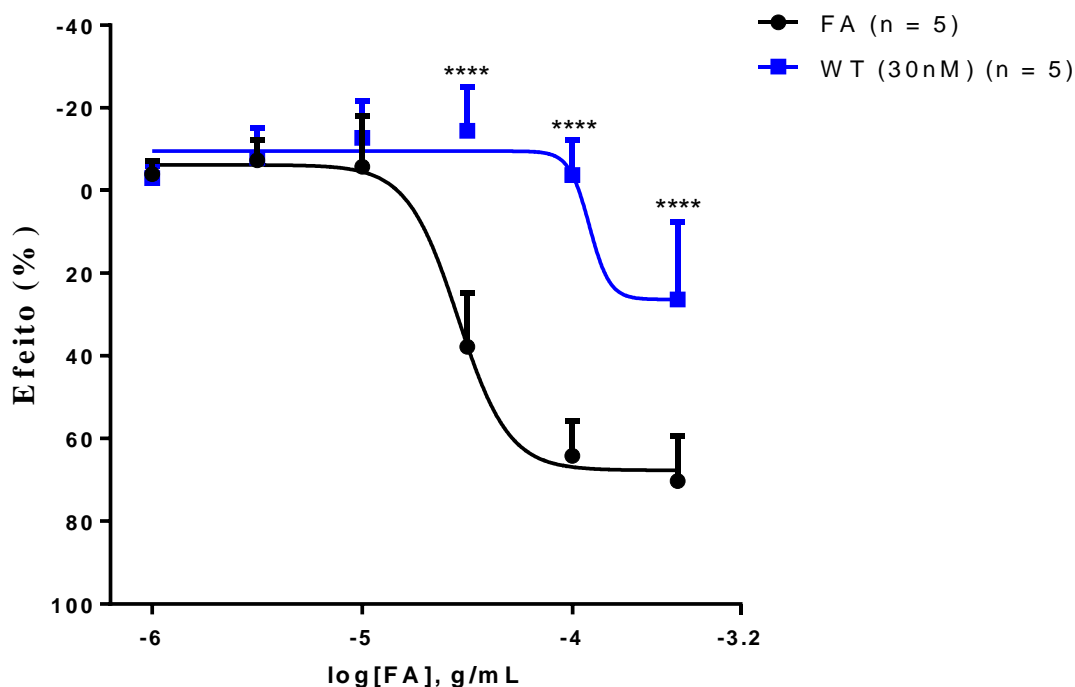


**Figura 9** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contraídos com fenilefrina na presença (n = 5) e na ausência (n = 5) do L-NAME (300  $\mu$ M). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*P < 0,001

#### 4.1.3 Envolvimento da via da PI3K/Akt no efeito induzido pela FA em anéis de aorta de camundongos



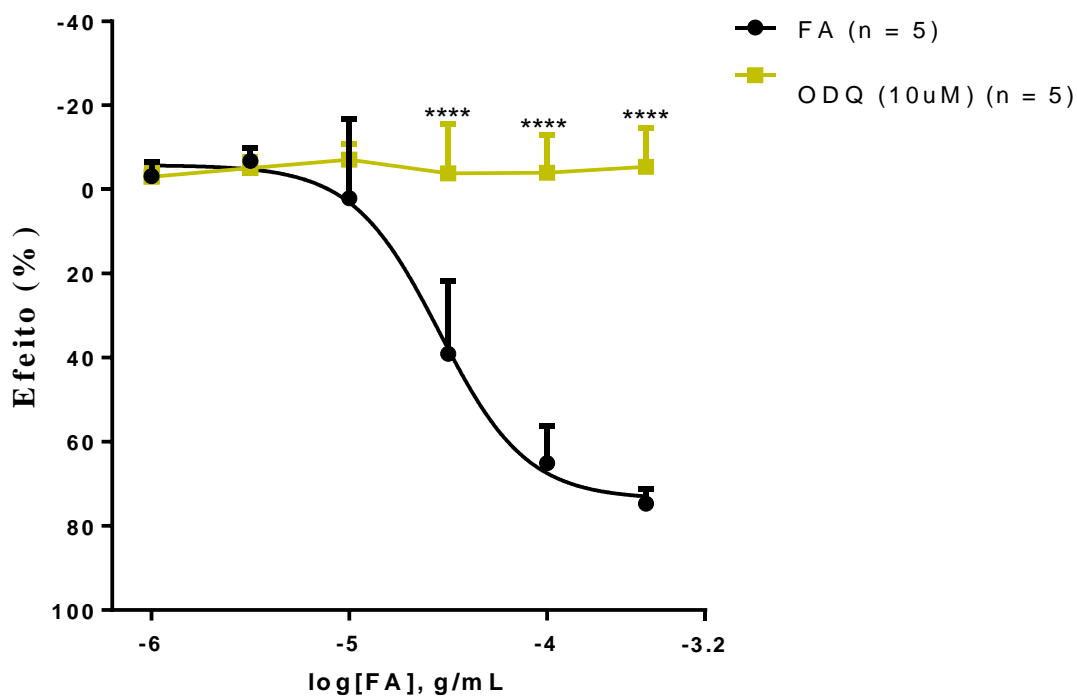
A resposta vasodilatadora produzida pela FA foi significativamente inibida na presença do wortmannin (30nM), um inibidor seletivo da PI3K, havendo um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $26,32 \pm 5,3\%$ ), quando comparado com o efeito obtido na aus\encia deste inibidor ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $70,22 \pm 4,82\%$ ;  $pCI_{50}$ :  $4,43 \pm 0,09$  g/mL) (Figura 10).



**Figura 10** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contraídos com fenilefrina na presença ( $n = 5$ ) e na ausência ( $n = 5$ ) do wortmannin (30 nM). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.1.4 Participação da enzima CGs na vasodilatação induzida pela FA em anéis de aorta de camundongos

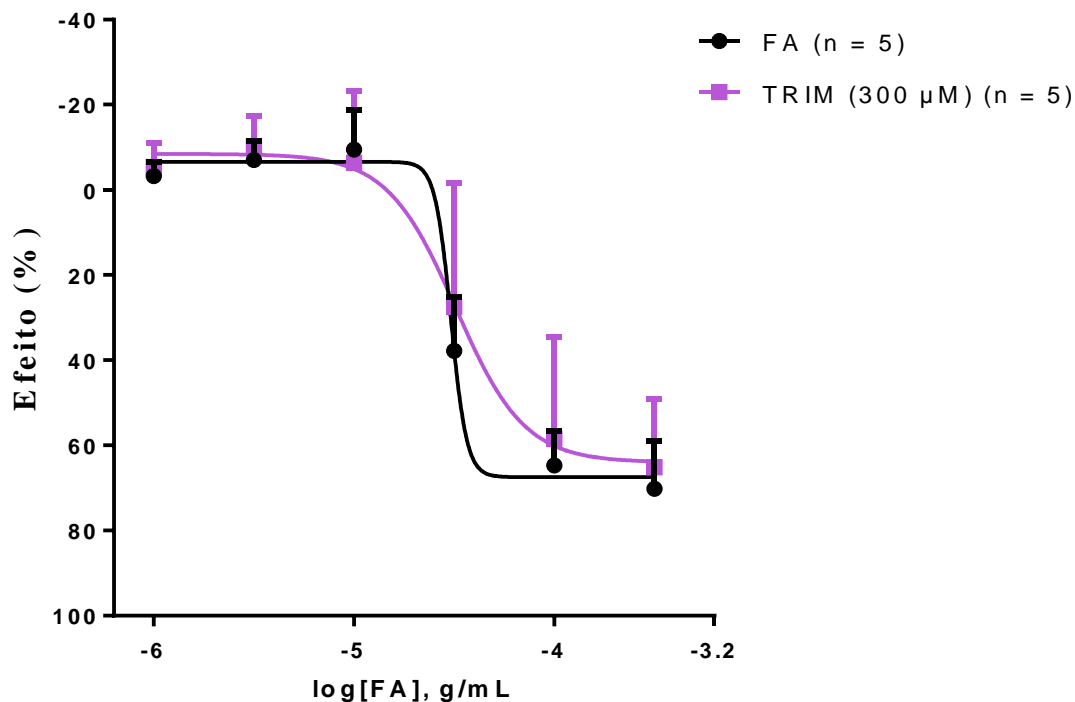
O efeito vasodilatador induzido pela FA em anéis pré-incubados com o ODQ (10  $\mu$ M), um inibidor seletivo da CGs, foi completamente bloqueado ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $-5,40 \pm 4,10\%$ ) quando comparado com a resposta produzida na ausência deste inibidor ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $74,66 \pm 1,47\%$ ;  $pIC_{50}$ :  $4,53 \pm 0,12$  g/mL) (Figura 11).



**Figura 11** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença (n = 5) e na ausência (n = 5) do ODQ (10 µM). Todos os resultados foram expressos como média ± e.p.m. \*\*\*\*P < 0,0001

#### 4.1.5 Avaliação do envolvimento da nNOS no efeito produzido pela FA em anéis de aorta isolada de camundongos

Nos anéis pré-incubados com TRIM (300 µM), um inibidor seletivo da nNOS, a resposta vasodilatadora produzida pela FA não foi significativamente alterada ( $E_{máx}$ :  $82,2 \pm 6,3\%$ ;  $pCI_{50}$ :  $4,22 \pm 0,18$  g/mL) quando comparado ao efeito induzido pela fração na ausência deste inibidor ( $E_{máx}$ :  $70,17 \pm 4,94\%$ ;  $pCI_{50}$ :  $4,38 \pm 0,22$  g/mL) (Figura 12).

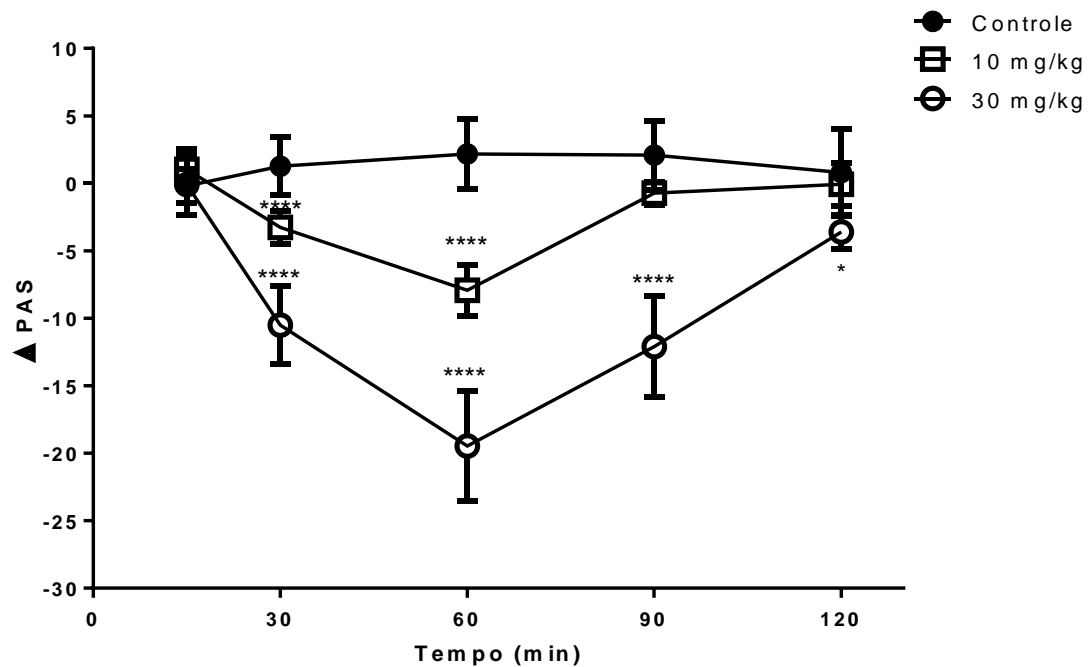


**Figura 12** - Curva concentração-resposta da FA em anéis de aorta de camundongos pré-contráídos com fenilefrina na presença (n = 5) e na ausência (n = 5) do TRIM (300 µM). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.

## 4.2 Ensaio *in vivo*

### 4.2.1 Efeito agudo da administração intraperitoneal (i.p.) da FA sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em camundongos normotensos

Os valores basais da PAS para o controle e FA nas doses de 10 e 30 mg/kg foram  $121,8 \pm 1,6$  mmHg,  $117,6 \pm 0,7$  mmHg e  $123,4 \pm 2,1$  mmHg, respectivamente. Em camundongos normotensos conscientes, a administração i.p. da FA induziu um efeito hipotensor dose-dependente (Figura 13). Para reduzir o estresse nos camundongos, foram realizadas medições da pressão 15 e 30 minutos após a administração de FA, em seguida, as medições foram realizadas a cada 30 minutos. Podemos observar que 15 minutos após a administração da FA não houve alteração significativa da PAS. No entanto, após 30 minutos da administração observamos uma redução significativa da PAS para as doses de 10 e 30 mg/kg. A redução máxima da PAS foi observada após 60 minutos da administração da FA. O efeito hipotensor de FA perdurou por pelo menos 120 minutos na dose de 30 mg/kg e 60 minutos na dose de 10 mg/kg.



**Figura 13** - Efeito dose resposta da FA (10 mg/kg, n = 5; 30 mg/kg, n =5) das folhas da *Plinia cauliflora*, administrado por via intraperitoneal (i.p.), sobre a pressão sanguínea sistólica (PAS) de camundongos normotensos não anestesiados. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. da diferença ( $\Delta$ PAS) entre a PAS na ausência e na presença de FA. \*P < 0,05, \*\*\*\*P < 0,001.

## 5 – DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou diferentes efeitos do extrato e frações obtidos da folha da planta *Plinia cauliflora* sobre o sistema cardiovascular, através do emprego de metodologias *in vitro* e *in vivo*. Estudos *in vitro* foram realizados utilizando anéis de aorta torácica isolada de camundongos normotensos, visto que este vaso é profundamente afetado na maioria das doenças cardiovasculares, levando ao comprometimento da função cardíaca. Já os estudos *in vivo* foram realizados para avaliação indireta da pressão arterial sistólica utilizando o método de pletismografia de cauda. Com esta técnica evitamos as modificações provocadas pela anestesia no funcionamento das principais vias de regulação da pressão arterial, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo. Além disso, a anestesia produz depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central, alterando as respostas autonômicas, além de outros efeitos sobre os sistemas básicos de controle fisiológico da pressão arterial (Dorward *et al.*, 1985; Fluckiger *et al.*, 1985).

Assim, os resultados mostraram que tanto o EHA quanto as frações (FA e FB) provenientes das folhas da *Plinia cauliflora* foram capazes de induzir uma vasodilatação concentração-dependente, o qual foi significativamente atenuado quando o endotélio vascular foi removido. Este é o primeiro estudo realizado com as folhas de *Plinia cauliflora*, no entanto, eles sugerem que o extrato rico em polifenóis apresenta um efeito vasodilatador semelhante ao descrito para a casca dos frutos. Andrade *et al.* (2014) avaliou o efeito vasorrelaxante do extrato proveniente da casca do fruto da jabuticaba da espécie *Myrciaria cauliflora* Berg, mostrando que esta resposta era concentração-dependente em anéis de aorta de ratos e que o mesmo foi abolido após a remoção do endotélio vascular. Ainda, Vogel *et al.* (2015) mostrou que o vasorrelaxamento produzido pelo extrato hidroalcoólico da casca da jabuticaba da espécie *Plinia peruviana* era dependente de fatores relaxantes derivados do endotélio.

Este efeito vasodilatador dependente do endotélio em anéis de aorta é característico de extratos ricos em polifenóis. Muitos estudos com estes extratos têm mostrado que este efeito está relacionado com o aumento no conteúdo de GMPc nas células musculares lisas vasculares (CMLVs), e que tanto o efeito quanto o aumento de GMPc é prevenido por inibidores da NOS, indicando que os compostos fenólicos

podem atuar elevando a atividade desta sintase, o que conseqüentemente leva a formação de NO e relaxamento das CMLVs. Além disso, os trabalhos sugerem que esta resposta vasorrelaxante está fortemente associada à concentração do conteúdo fenólico nos extratos (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 2000; Andriantsitohaina *et al.*, 2012). Os estudos fitoquímicos das folhas da jabuticaba, encontrados na literatura, ainda são poucos, no entanto, alguns trabalhos mostram a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos, além do alto teor de polifenóis em algumas espécies do gênero *Plinia* (Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008; Macedo-Costa *et al.*, 2009). Ainda, na casca da jabuticaba são descritos, principalmente, a presença de antocianinas, um tipo de pigmento funcional pertencente ao grupo dos flavonóides, o qual confere a cor roxa do fruto e é o responsável por diversos efeitos benéficos, como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimutagênicos e anticancerígenos (Reynertson *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Andrade, 2014).

Neste sentido, visto que tanto os extratos como as frações da *P. cauliflora* foram capazes de produzir seu efeito vasodilatador apenas na presença do endotélio funcional, e que este é o principal responsável pelo controle do tônus vascular por meio da liberação de diversos autacóides na vasculatura, objetivou-se investigar o mecanismo de ação envolvido nesta resposta. No entanto, os resultados obtidos acerca da sinalização envolvida neste efeito foram realizados apenas com a FA, visto que esta fração apresenta maior potência e menor efeito contrátil nas concentrações mais baixas quando comparada com a FB.

É bem estabelecido que o NO é um potente vasodilatador em artérias de grande condutância com diferentes funções vasoprotetoras. Essa molécula gasosa é produzida pela NOS nas células endoteliais por meio da oxidação de um resíduo de L-arginina, o qual se difunde para CMLV levando a ativação da CGs e formação de GMPc. Este, por sua vez, ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), a qual apresenta diversos alvos na CMLV: ativa a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático (SERCA), acelera a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para os estoques intracelulares, abre os canais para  $\text{K}^+$  na membrana plasmática hiperpolarizando as CMLVs, fecha os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e ativa o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Todos estes eventos levam a uma redução na concentração de cálcio intracelular. Além disso, a PKG promove a fosforilação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), inativando-a, e estes eventos em conjunto promovem o

vasorrelaxamento, diminuindo, assim, a resistência vascular periférica (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993; Vanhoutte e Boulanger, 1995; Irvine *et al.*, 2003; Toda e Okamura, 2003; Webb *et al.*, 2004). Desse modo, foi avaliada a participação do NO no efeito produzido pela FA das folhas da *P. cauliflora*. Para isso, os anéis de aorta foram previamente incubados com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. Sob condições controladas, a resposta vasodilatadora da FA foi significativamente inibida na presença de L-NAME, indicando que os efeitos desencadeados pela FA envolvem a ativação da NOS.

Ainda, nas células endoteliais, a ativação da NOS pode ocorrer por duas vias: uma dependente da formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina; outra independente do  $\text{Ca}^{2+}$  e dependente da fosforilação de Ser1177, através da ativação de proteínas cinases (Dimmeler *et al.*, 1999; Mombouli, J. V. e Vanhoutte, P. M., 1999). Embora o aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  seja uma importante via que leva a ativação da NOS nas células endoteliais, estudos têm mostrado que a amplitude do sinal desencadeado por extratos ricos em polifenóis que leva a este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda é baixa quando comparado a outros agonistas, como a bradicinina (Schini-Kerth *et al.*, 2010). Por outro lado, dentre as proteínas cinases envolvidas na ativação da eNOS, foi relatado que a via de sinalização dependente de PI3K é capaz de fosforilar resíduos de Ser1177 em diferentes modelos animais (Caulin-Glaser *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 1999). Assim, avaliou-se a participação desta via no efeito produzido pela FA. Para isso, as preparações de anéis de aorta foram previamente incubadas com o wortmannin, um inibidor seletivo da PI3K, o qual produziu uma redução significativa na resposta da fração, resultando no deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, sugerindo que a via PI3K/NOS/NO estaria envolvida do efeito produzido pela FA.

Diversos estudos têm mostrado que os polifenóis são capazes de aumentar os níveis de cálcio intracelular nas células endoteliais levando a ativação da NOS e liberação de NO (Stoclet *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2002). No entanto, é descrito na literatura a participação de mecanismos adicionais de ativação desta sintase no efeito vasodilatador destes compostos. Assim, além do cálcio, a via da PI3K/Akt é um importante mecanismo de ativação da NOS em resposta a hormônios, estresse de cisalhamento e fatores de crescimento (Caulin-Glaser *et al.*, 1997; Michell *et al.*, 1999). Dessa forma, os polifenóis podem levar rapidamente a ativação da NOS por meio da

ativação da PI3K/Akt que promove uma fosforilação no resíduo de Ser1177, sítio ativador da NOS, e uma desfosforilação no resíduo Thr495, sítio de inibição, isso tudo levando ao aumento na formação de NO (Dimmeler *et al.*, 1999; Schini-Kerth *et al.*, 2010). Além disso, alguns trabalhos têm identificado a participação da cinase Src como um ativador da via da PI3K/Akt estimulado por extratos ricos em polifenóis (Anselm *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2009). Por outro lado, investigações adicionais têm mostrado a formação de ROS intracelular pelos compostos fenólicos, principalmente ânion superóxido, resultando na ativação da PI3K em células endoteliais (Ndiaye *et al.*, 2005; Madeira *et al.*, 2009).

É bem estabelecido que o efeito vasodilatador produzido pelo NO é predominantemente através da ativação da enzima CGs nas CMLVs, resultando no acúmulo de GMPc, como descrito anteriormente (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993). Em vista destes aspectos, verificou-se a participação desta via no efeito vasorrelaxante produzido pela FA. Para isso, os anéis de aorta isolada de camundongos normotensos foram previamente incubados com ODQ, um inibidor seletivo da CGs, e foi observado um bloqueio significativo na resposta produzida pela FA, sugerindo o envolvimento da via NO/CGs/GMPc.

Todos estes resultados estão de acordo com os achados na literatura que descrevem os efeitos de extratos ricos em polifenóis sobre o sistema cardiovascular. Estudos têm mostrado que estes compostos induzem um efeito vasodilatador dependente do endotélio e que essa resposta envolve a participação do NO. Além disso, estes compostos fenólicos são capazes de ativar diferentes vias para produzir seus efeitos protetores cardiovasculares. Trabalhos com extratos provenientes da casca da jabuticaba, uma fonte rica em antocianinas, têm mostrado que o vasorrelaxamento induzido por estes compostos envolve a ativação da via NOS/NO/CGs com participação da via PI3K/Akt (Andrade, 2014; Lobo De Andrade *et al.*, 2015; Vogel, 2015). Em células endoteliais de aorta, a avaliação por citometria de fluxo, demonstrou que este extrato foi capaz de aumentar significativamente os níveis de NO citosólico, sugerindo um aumento na produção ou da biodisponibilidade do NO (Souza, 2017)

Após verificar que a NOS está envolvida no efeito produzido pela FA, objetivou-se avaliar qual isoforma da NOS estava participando desta resposta. É bem determinado que a NOS endotelial (eNOS) é a principal responsável pelo



vasorrelaxamento desencadeado pelos polifenóis, os quais modulam diversas vias que levam a ativação desta enzima e consequente liberação de NO. No entanto, alguns estudos relatam a presença da nNOS nas células endoteliais (Bachetti *et al.*, 2004). A nNOS foi descrita, inicialmente, nas células neuronais, por isso, foi denominada desta forma, mas sabe-se hoje que esta isoforma pode ser encontrada também em tecidos não neuronais, como miócitos e células endoteliais (Boulanger *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Bachetti *et al.*, 2004). Um estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que a nNOS também participa do efeito vasorrelaxante produzido pela acetilcolina em aorta isolada de camundongos (Costa *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas, a nNOS produz NO, de forma semelhante ao observado com a eNOS, no entanto, somente a nNOS é capaz de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células endoteliais. Em aorta de camundongo, o eixo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/nNOS foi descrito como participante no controle endotelial da função vascular, com uma atuação proporcional àquela observada pelo eixo NO/eNOS (Rabelo *et al.*, 2003; Capettini *et al.*, 2008; Capettini *et al.*, 2010). A formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela nNOS acontece diretamente pelo transporte de elétrons nos domínios redutase e oxidase desta enzima, previamente a clivagem da L-arginina. Uma vez formado, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a ativação de canais de K<sup>+</sup> nas células musculares lisas vasculares resultando em hiperpolarização (Barlow e White, 1998; Barlow *et al.*, 2000). Além deste mecanismo, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de ativar outra via responsável pelo controle do tônus vascular, a NOS/NO. Estudos utilizando ratos hipertensos têm mostrado que em baixas concentrações, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz a ativação da via do NO, contribuindo com o vasorrelaxamento neste modelo de animal (Silva *et al.*, 2017).

Visto que inúmeros estudos têm mostrado que o tratamento com extratos ricos em compostos fenólicos resulta numa redução da pressão arterial tanto em animais normotensos quanto hipertensos, sendo observado nestes últimos um aumento na biodisponibilidade de NO e consequente melhorada disfunção endotelial (Diebolt *et al.*, 2001), objetivou-se avaliar o efeito da administração aguda da FA em animais normotensos utilizando o método de pletismografia de cauda. Para isso, os animais foram divididos em grupos nos quais foi administrada uma injeção intraperitoneal (i.p.) de salina (grupo controle) e da FA nas doses de 10 e 30 mg/kg, e medidas da pressão arterial sistólica (PAS) foram realizadas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Nestas condições experimentais, a FA induziu uma resposta hipotensora dependente de dose. O início da resposta hipotensora foi observado no tempo de 30 minutos e o efeito

máximo alcançado em 60 minutos para ambas as doses. A duração do efeito hipotensor foi de pelo menos 120 minutos na dose de 30 mg/kg e de pelo menos 60 minutos na de 10 mg/kg. A relação da dose com o efeito máximo e a duração do efeito é compatível com a proporção de compostos ativos presentes na quantidade de FA administrada. A administração i.p. de FA teve como objetivo permitir o acesso da fração na circulação sistêmica com a maior biodisponibilidade possível. A título de cálculo, se considerarmos uma variação de biodisponibilidade entre 50 e 100 % para a via i.p., podemos, de forma bastante conservadora e preliminar, calcular que na dose de 30 mg/kg a concentração plasmática máxima pode variar entre 300 e 700 µg/mL. Este nível de concentração plasmática é superior à faixa de concentração com atividade vasodilatadora observada para esta fração em aorta de camundongo. Este cálculo aproximado sugere que o efeito hipotensor da FA pode estar relacionado com a atividade vasodilatadora desta fração e com a consequente redução da resistência periférica vascular.

Relatos da literatura mostram que a administração aguda e crônica de extratos ricos em polifenóis reduza pressão arterial em animais normotensos (Diebolt *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011). Além disso, a ingestão de compostos fenólicos por sujeitos saudáveis produziu um efeito vasodilatador em artéria braquial e melhorou a função endotelial (Djoussé *et al.*, 1999; Agewall *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos neste efeito hipotensor são múltiplos, sendo o principal deles a ativação da via da NOS/NO/GMPc resultando no aumento da biodisponibilidade de NO (Caramori e Zago, 2000; Ranaivo *et al.*, 2004; Schini-Kerth *et al.*, 2010). A disfunção da via do NO/eNOS já é um fato bem estabelecido em diversas patologias que provocam danos ao sistema cardiovascular, como a hipertensão, diabetes e dislipidemias (Mombouli, J.-V. e Vanhoutte, P. M., 1999; Caramori e Zago, 2000; Giannotti e Landmesser, 2007). Um estudo recente demonstrou que a ingestão crônica de extratos provenientes da casca da jabuticaba, em modelos de animais hipertensos, reduziu a pressão arterial, inibiu a disfunção endotelial, via liberação de NO, e aumentou a atividade vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina em aorta (De Souza *et al.*). Além disso, a administração oral de compostos fenólicos em diversos modelos de animais hipertensos resulta numa melhora e prevenção da disfunção endotelial, além de restabelecer a vasodilatação dependente de endotélio pela acetilcolina, tanto em anéis de aorta, quanto em artéria mesentérica isolada de animais

roedores (Al-Awwadi *et al.*, 2004; Schini-Kerth *et al.*, 2010). A propriedade antioxidante dos polifenóis também é considerada como um mecanismo envolvido nas suas atividades cardioprotetoras. A disfunção endotelial caracteriza-se pela elevação das ROS que levam a diversos danos moleculares como o desacoplamento da NOS e consequente diminuição de NO. Os extratos ricos em polifenóis têm a capacidade de reduzir a biodisponibilidade das ROS em células endoteliais. Esta atividade antioxidante não está associada à interação dos polifenóis com as ROS de per si, mas por meio da redução na expressão da NADPH oxidase, principal fonte de produção de ROS, ou por inibição da via do receptor de angiotensina 1 (AT1), resultando na diminuição da vasoconstrição, na produção de ROS e respostas pró-inflamatórias (Dal-Ros *et al.*, 2011; Khodja *et al.*, 2012). Portanto, estes relatos da literatura sugerem que o tratamento com extratos ou frações ricas em polifenóis pode reverter os danos endoteliais observados em doenças como hipertensão, diabetes e dislipidemias.

## 6 – CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados nos estudos realizados com o extrato e frações obtidos das folhas da *Plinia cauliflora*, foi possível concluir que o extrato e as frações ricas em compostos polifenólicos apresentam atividade vasodilatadora dependente da presença de um endotélio funcional. O mecanismo da atividade vasodilatadora foi dependente da ativação da eNOS pela via da PI3K e da ativação da GCs muscular. A atividade vasodilatadora de *Plinia cauliflora* pode contribuir para a redução da pressão arterial em camundongos normotensos.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.

AGEWALL, S. et al. Does a glass of red wine improve endothelial function? **European Heart Journal**, v. 21, p. 74-78, 2000.

AL-AWWADI, N. A. et al. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5593-5597, 2004.

ANDRADE, D. M. L. D. **Avaliação da atividade antioxidante, hipotensora e vasodilatadora da Jaboticaba, *Myrciaria cauliflora* Berg.** 2014. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

ANDRIANTSITOHAINA, R. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1532-49, 2012.

ANSELM, E. et al. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src-and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 404-413, 2007.

AP, C. A.; ABREU, P.; DANTAS-BARROS, A. Chemical characterization of the jaboticaba fruits (*Myrciaria cauliflora* Berg) and their fractions. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, p. 416-421, 2008.

ARAÚJO, C. R. et al. *Myrciaria cauliflora* peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, p. 262-267, 2014.

BACHETTI, T. et al. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, p. 939-945, 2004.

BARLOW, R. S.; EL-MOWAFY, A. M.; WHITE, R. E. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opens BK Ca channels via the PLA 2-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, p. H475-H483, 2000.

BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK Ca channel activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, p. H1283-H1289, 1998.

BARROS, J. D. Â. D. C.; CAMPOS, R. D. M. M.; MOREIRA, A. V. B. Atividade antioxidante em vinhos de jaboticaba e de uva. **Nutrire Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, p. 73-83, 2010.

BATISTA, A. G. et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 450-461, 2014.

BLUMBERG, J. B. et al. Cranberries and their bioactive constituents in human health. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, p. 618-632, 2013.

BOULANGER, C. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 83, p. 1271-1278, 1998.

BOURQUE, S. L.; DAVIDGE, S. T.; ADAMS, M. A. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, p. R1288-R1295, 2011.

BROPHY, C. et al. Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, p. H991-H997, 2000.

BURNS, J. et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CALLONI, C. et al. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15-22, 2015.

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

CAPETTINI, L. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, p. H2503-H2511, 2008.

CAPETTINI, L. S.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, p. 260-266, 2010.

CARAMORI, P. R. A.; ZAGO, A. J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 75, p. 163-172, 2000.

CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.

CAULIN-GLASER, T. et al.  $17\beta$ -estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic  $Ca^{2+}$  mobilization. **Circulation Research**, v. 81, p. 885-892, 1997.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 13-20, 2014.

CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 8, p. E239-E253, 2006.

COSTA, E. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase in vascular physiology and diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 206, 2016.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

DA SILVA, J. K. et al. Functional tea from a Brazilian berry: Overview of bioactives in the aqueous extract of jaboticaba peel. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 292-298, 2016.

DAL-ROS, S. et al. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, p. 743-9, 2011.

DE ANDRADE, D. M. L.; BORGES, L. L.; TORRES, I. M. S. Efeito Vasodilatador Independente do Endotélio Induzido pela Jaboticaba (*M. cauliflora*) em Artérias Isoladas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, p. 223-229, 2016.

DE SÁ, L. Z. M. et al. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 169-179, 2014.

DE SOUZA, C. G. et al. Radical scavenger capacity of jaboticaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) and its biological effects in hypertensives rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 10,

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818-92, 2013.



DELLACQUA, M. N. **Avaliação dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo liofilizado do vinho tinto Garziera do Vale do São Francisco em ratos.** 2012. Tese de Doutorado. Ciências de Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

DI CASTELNUOVO, A. et al. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. **Circulation**, v. 105, p. 2836-2844, 2002.

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

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, p. 601-605, 1999.

DJOUSSÉ, L. et al. Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects. **The American journal of cardiology**, v. 84, p. 660-664, 1999.

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

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health WHO**, v. 63, p. 965-981, 1985.

FELETOU, M.; KOHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current Hypertension Reports**, v. 12, p. 267-275, 2010.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: no longer an f-word. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 61, p. 91-92, 2013.

FITZPATRICK, D. F.; HIRSCHFIELD, S. L.; COFFEY, R. G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 265, p. H774-H778, 1993.

FLEMING, S. Malignant hypertension- the role of the paracrine renin-angiotensin system. **The Journal of Pathology**, v. 192, p. 135-139, 2000.

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

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.

GIANNOTTI, G.; LANDMESSER, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. **Herz**, v. 32, p. 568-572, 2007.

HASHIMOTO, M. et al. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. **The American Journal of Cardiology**, v. 88, p. 1457-1460, 2001.

HERTOG, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 381-386, 1995.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 275-285, 2002.

HU, J. et al. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 327-331, 1995.

HUANG, A. et al. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. H429-H436, 2002.

IGNARRO, L. et al. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange: comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 4997-5002, 1986.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO- Actives Soluble Guanylate Cyclase and Kv Channels to Vasodilate Resistance Arteries. **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003.

JACKSON, W. F. Ion Channel and vascular tone. **Hypertension**, v. 32, p. 173-178, 2000.

KANE, M. O. et al. Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, p. 671-679, 2010.

KHODJA, N. I. et al. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. **PloS one**, v. 7, p. e32039, 2012.

KOLLURU, G. K.; SIAMWALA, J. H.; CHATTERJEE, S. eNOS phosphorylation in health and disease. **Biochimie**, v. 92, p. 1186-1198, 2010.

LEE, K.-H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 273-283, 2004.

LI, Y. et al. Green tea polyphenols down-regulate caveolin-1 expression via ERK1/2 and p38MAPK in endothelial cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 1021-1027, 2009.

LIMA, A. D. J. B. et al. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 877-887, 2011.

LOBO DE ANDRADE, D. M. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of jaboticaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) extract in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 8, 2015.

LUCIANO, M. N. et al. Uncovering the vasorelaxant effect induced by Vale do Sao Francisco red wine: a role for nitric oxide. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, p. 696-701, 2011.

MACEDO-COSTA, M. R. et al. Effectiveness of the *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. extract on oral bacteria. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 565-571, 2009.

MADEIRA, S. V. F. et al. eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 46, p. 406-416, 2009.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

MARTIN, S. et al. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1579-1587, 2002.

MICHELL, B. et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Current Biology**, v. 9, p. 845-S1, 1999.

MOMBOULI, J.-V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 61-74, 1999.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S. et al. The L-arginine-nitric-oxide pathway. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, p. S1-S9, 1991.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORALES, P. et al. Non-fermented and fermented jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) pomaces as valuable sources of functional ingredients. **Food Chemistry**, v. 208, p. 220-227, 2016.

MUKAMAL, K. J. et al. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 105, p. 2476-2481, 2002.

NDIAYE, M. et al. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 455-7, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

PAULIS, L.; UNGER, T. Novel therapeutic targets for hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 7, p. 431-41, 2010.

POHL, U.; DE WIT, C.; GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. **Acta Physiologica**, v. 168, p. 505-510, 2000.

RABELO, L. A. et al. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 1215-1220, 2003.

RAFIKOV, R. et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **Journal of Endocrinology**, v. 210, p. 271-284, 2011.

RANAIVO, H. R.; DIEBOLT, M.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 671-678, 2004.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 837-841, 1988.

SARR, M. et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 71, p. 794-802, 2006.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHINI-KERTH, V. B. et al. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, p. 853-862, 2010.

SERBAN, D. N.; NILIUS, B.; VANHOUTTE, P. M. The endothelial saga: the past, the present, the future. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, p. 787-792, 2010.

SILVA, B. et al. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, p. 87-94, 2017.

SILVA, G. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 709-713, 2011.

SOFI, F. et al. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 337, p. a1344, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 48-53, 2010.

SOUZA, C. G. D. **Efeitos do extrato padronizado de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) sobre o sistema cardiovascular de ratos hipertensos**. 2017. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas. , Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

STOCLET, J. et al. Endothelial no release caused by red wine polyphenols. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 50, p. 535-540, 1999.

STOCLET, J. C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **The European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 299-313, 2004.

TODA, N.; OKAMURA, T. The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 271-323, 2003.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, p. 383-385, 1986.

VANHOUTTE, P.; BOULANGER, C. Function of the endothelium in arterial hypertension. **La Revue du praticien**, v. 45, p. 2513, 1995.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium and control of vascular function. **Hypertension**, v. 13, p. 658-667, 1989.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, p. 595-601, 2009.

VOGEL, D. **Envolvimento das vias óxido nítrico/guanilato ciclase solúvel e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt no relaxamento vascular induzido por extratos hidroalcoólicos da casca da jabuticaba (*Plinia peruviana*)**. 2015. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

WEBB, A. et al. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 13683-13688, 2004.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 1874-1905, 2015.