

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA DE FÁTIMA REIS

Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae) e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila)

GOIÂNIA

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Carolina de Fátima Reis			
E-mail:		carolinareis-@hotmail.com			
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor		Não			
Agência de fomento:		Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior		Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Efeitos vasculares do oleorresina de <i>Pterodon</i> spp. Vogel (Fabaceae) e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila)				
Palavras-chave:	Pterodon spp.Vogel, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, Cav1.2, vasodilatação.				
Título em outra língua:	vascular relaxing effect of Pterodon spp. and its isolated diterpene methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate				
Palavras-chave em outra língua:	Pterodon spp.Vogel, methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oat, Cav1.2, vasorelaxation.				
Área de concentração:	Fármacos e Medicamentos				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	30 de junho de 2015				
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Farmacêuticas				
Orientador (a):	Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha				
E-mail:	matheuslr@gmail.com				

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CAROLINA DE FÁTIMA REIS

Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae) e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

GOIÂNIA

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

de Fátima Reis, Carolina

Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel
(Fabaceae) e do seu diterpeno isolado (6?-acetoxi-7?
hidroxivouacapano-17?-oato de metila) [manuscrito] / Carolina de
Fátima Reis. - 2015.

xcii, 91 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
Farmácia (FF) , Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Apêndice.

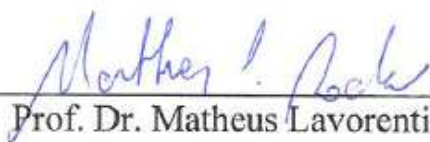
Inclui siglas, lista de figuras.

1. *Pterodon* spp.Vogel. 2. 6?-acetoxi-7?-hidroxivouacapano-17?-oato de
metila. 3. Cav1.2. 4. vasodilatação. I. Lavorenti Rocha, Matheus, orient.
II. Título.

Folha de Aprovação

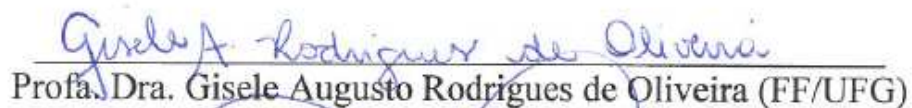
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 30 de junho de 2015, pela mestrande Carolina de Fátima Reis.

Banca Examinadora:

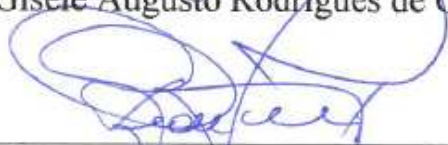


Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha (FF/UFG)

Presidente



Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG)



Prof. Dr. Paulo César Ghedini (ICB/UFG)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por fazer tudo diante de nossos olhos tomarem um enorme sentido quando nos dedicamos à certeza que Ele está sempre ao nosso lado.

Ao meu orientador, Dr. Matheus Lavorenti Rocha, pela confiança, atenção e incentivos em prosseguir na jornada da docência.

Aos meus queridos pais, Ariovaldo e Celita, quem dera existissem palavras para lhes agradecer. Obrigada por me apoiarem com o maior amor.

Ao Allisson, que me incentivou a fazer o mestrado. Pela inesgotável paciência e companheirismo incondicional e por me ensinar e amparar em todas as minhas dificuldades. Obrigada também por seu amor.

À Emmeline, obrigada pela amizade, por ter me guiado tantas vezes em minhas decisões. Pelo companheirismo, pelo exemplo de exímia profissional.

À Daniela (parça), minha amiga e colega de laboratório. Obrigada pelo companheirismo, risadas e lágrimas que compartilhamos nesses dois anos.

À Patrícia, aluna de doutorado, por ter me dado inúmeras dicas e bons conselhos.

À aluna de iniciação científica e amiga Emily por ter me ajudado em vários experimentos. Obrigada por tornar a rotina algo tão agradável.

À doutoranda Leandra de Almeida e Profa. Dra. Maria Tereza pelo fornecimento do oleorresina de sucupira e seu diterpeno isolado.

Ao doutorando Bruno Neves e à Profa. Dra. Carolina Horta pela colaboração nos experimentos de *docking*.

Ao pós doutorando José Felipe e ao Prof. Dr. Jader Cruz pela colaboração nos experimentos de *patch-clamp*.

À Profa. Dra. Ieda e ao Prof. Dr. Eric pelos momentos de distração e bons conselhos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas bem como aos professores Dr. Gustavo Pedrino e Dr. Carlos Castro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela enorme contribuição à minha formação profissional.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial à Luiza Toubas Chaul pelo aprendizado compartilhado e pela amizade incondicional.

Às minhas amigas, Samara, Joyce, Bruna e Lorrane, por serem meu porto seguro mesmo nos vendo tão pouco. Obrigada pelas orações compartilhadas em momentos difíceis.

Ao amigo Vinicius Gontijo pelas risadas e desabafos compartilhados desde a graduação.

Ao amigo Frederico Rocha pela companhia, palavras de incentivo e pelos momentos de distração.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço à **Universidade Federal de Goiás** e a **Faculdade de Farmácia** que tornaram possível a realização da pesquisa e do curso de pós-graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FF-UFG** por tornar possível uma pós-graduação de qualidade, pelo conhecimento adquirido através de disciplinas e atividades extracurriculares.

RESUMO

O uso de plantas medicinais para o tratamento da hipertensão tem sido bastante estudado. O gênero *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae), popularmente conhecido como sucupira, possui cinco espécies nativas do Cerrado brasileiro. Estudos indicam que *Pterodon* spp possui efeito antiespasmódico e miolorrelaxante. A caracterização fitoquímica da sucupira constatou a presença de diterpenos com esqueleto furânico do tipo vouacapânico em seus frutos, sendo esses metabólitos provavelmente responsáveis pelas funções terapêuticas do gênero. O objetivo deste estudo foi avaliar a possível atividade vasorrelaxante bem como os possíveis mecanismos de ação do oleorresina de sucupira (ORS) e do seu diterpeno isolado, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, em preparações isoladas de aorta de ratos. Para fins de comparação, curvas para verapamil (1 nM – 100 μ M) foram obtidas. Os resultados indicaram que tanto o ORS (0 – 56 μ g/mL) quanto o diterpeno (0 – 48 μ g/mL) possuem atividade vasorrelaxante reversível de maneira concentração-dependente. A remoção do endotélio vascular não alterou a atividade tanto do ORS quanto do seu diterpeno. Preparações estimuladas por KCl obtiveram um menor valor de IC₅₀ que preparações previamente contraídas por fenilefrina quando submetidas a concentrações crescentes das substâncias teste. O relaxamento induzido pelo ORS e diterpeno não foi alterado na presença do inibidor não seletivo de canal de K⁺, tetraetilamônio. Não houve envolvimento quanto à mobilização intracelular de Ca²⁺ quando as preparações foram incubadas com inibidor da SERCA, o ácido claclopiazônico. A utilização de ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel e MDL-12,330A, inibidor da adenilato ciclase, demonstrou que as vias dos nucleotídeos cíclicos guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico (GMPc) e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), também não estão envolvidas na atividade do ORS, embora suponha-se possível envolvimento da guanilato ciclase solúvel sGC na atividade vasorrelaxante do diterpeno. Ambos, ORS e diterpeno, impediram a contração induzida por solução de CaCl₂ em preparações estimuladas por fenilefrina (0,1 μ M) ou Bay K8644 (ativador específico de Ca_v1.2; 1 μ M) e por estímulo despolarizante com solução de KCl (40 mM). Estudos de *docking* molecular demonstraram que o efeito vasodilatador do diterpeno baseia-se no bloqueio de Ca_v1.2 e os resultados obtidos pela técnica de *patch-clamp* com o diterpeno mostraram substancial diminuição da corrente iônica através Ca_v1.2 em células de músculo liso vascular recentemente dissociados. Estes resultados sugerem que ORS e seu diterpeno isolado induzem relaxamento vascular endotélio independente, bloqueando o canal de Ca²⁺ do tipo L (Ca_v1.2).

Palavras-chave: *Pterodon* spp.Vogel, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, Ca_v1.2, vasodilatação.

ABSTRACT

The use of medicinal plants for the treatment of hypertension treatment has been extensively studied. The genus *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae), popularly known as sucupira, has five native Brazilian cerrado species. Studies demonstrated that the *Pterodon* spp has antispasmodic and myorelaxant activities. Phytochemical studies of sucupira found furanic diterpenes with vouacapanic skeleton in their fruits, and the therapeutics activities from this gender are essentially attributed to these compounds. The aim of this study was to evaluate the possible vasorelaxant activity and the mechanisms of action of the oil-resin of sucupira (SOR) and its isolated diterpene, methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate in isolated rat aorta preparations. For comparison, verapamil curves (1 nM – 100 μ M) were also obtained. The results demonstrated that both, SOR (0 – 56 μ g/mL) and the isolated diterpene (0 – 48 μ g/mL) have a reversible concentration-dependent vasorelaxant activity. Endothelium denudation did not impair in the relaxant effect of both, ORS and the diterpene. Aortic rings KCl-stimulated obtained a lower IC₅₀ value than rings contracted with phenylephrine under increasing concentrations of the tested substances. The SOR and diterpene relaxant activity was not impaired when non-selective K⁺ channels blockers were used (Tetraethylammonium). The use of cyclopiazonic acid (SERCA inhibitor) indicated that there was no involvement of the Ca²⁺ reuptake by sarcoplasmic reticulum and the use of ODQ (an inhibitor of guanylyl cyclase) and MDL-12,330A (an inhibitor of adenylyl cyclase), showed that the 3', 5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathways were not involved in SOR relaxant activity. However, the results indicate a possibly activity of the soluble guanylyl cyclase on diterpene relaxant effect. Both, SOR and isolated diterpene inhibited the CaCl₂ induced contractions in aortic rings stimulated with phenylephrine (0.1 μ M) or Bay K8644 (a Ca_v1.2 channel activator; 1 μ M) and by depolarizing KCl solution (40 mM). Computational molecular docking studies demonstrated that the vasodilator effect of diterpene relies on blocking the Ca_v1.2 channel, and patch clamp results showed that diterpene substantially decreased the ionic current through Ca_v1.2 in freshly dissociated vascular smooth muscle cells. These findings suggest that SOR and its isolated diterpene induce endothelium-independent vascular relaxation by blocking the L-type Ca²⁺ channel (Ca_v1.2).

Keywords: *Pterodon* spp.Vogel, methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oat, Ca_v1.2, vasorelaxation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	27
Figura 2	Diterpeno do tipo vouacapano. A) Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos. B) Estrutura química do diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila de <i>Pterodon</i> spp. Vogel.....	29
Figura 3	Corte transversal da parede arterial representando a camada adventícia, a camada média, constituída por células musculares lisas, e a camada íntima composta por uma fileira única de células endoteliais.....	31
Figura 4	Esquema da participação dos canais para cálcio dependente de voltagem (VOC) e operado por receptor (ROC) nos mecanismos de contração vascular.....	33
Figuras do artigo		
Figure 1	Structure of methyl-6 α -acetoxi-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate.....	68
Figure 2	Effect of SOR, diterpene and verapamil- induced relaxation in endothelium intact (E+) and denuded (E-) aortic rings.....	69
Figure 3	Concentration-response curves for SOR or diterpene in the absence or presence of CPA, TEA, ODQ or MDL-12,300A) in endothelium-denuded rings pre-contracted with phenylephrine.....	70
Figure 4	Effect of SOR, diterpene or verapamil on CaCl ₂ induced contractile response in endothelium-denuded rings.....	71

Figure 5	Effect of SOR, diterpene or verapamil on KCl-induced contraction in endothelium-denuded rings.....	72
Figure 6	Effect of diterpene on current through L type calcium channel...	73
Figure 7	Orientation of methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate and verapamil in the active site of the Ca _v 1.2 model.....	74

Figuras do Apêndice

Figura 5	Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório do ORS sobre a contração induzida por fenilefrina.....	89
Figura 6	Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório do diterpeno isolado sobre a contração induzida por fenilefrina.....	90
Figura 7	Efeito da Glib e 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo ORS em preparações E-.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
BK_{Ca}	Canal para potássio estimulado por alta condutância ao cálcio
[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
Ca_v1.2	Canal para cálcio operado por voltagem / canal para cálcio do tipo L
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLM	Cadeia Leve de Miosina
CPA	Ácido ciclopiazônico
CVML	Célula Vascular de Músculo Liso
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito Cardíaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E+	Preparações com endotélio
E-	Preparações sem endotélio
EC₅₀	Concentração da droga que produz 50% do efeito máximo
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
E_{MÁX}	Efeito máximo
Enos	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
GCs	Guanilato Ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3, 5- monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IC₅₀	Concentração da droga que produz 50% do efeito inibitório
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IP₃	1,4,5-Trifosfato de inositol
K_{ATP}	Canal para potássio dependente de ATP
KCl	Cloreto de potássio

KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
K_v	Canal para potássio operado por voltagem
MgSO₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one
ORS	Oleorresina de sucupira
PA	Pressão Arterial
PGI₂	Prostaciclina
PIP₂	Bifosfato de inositol
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
ROC	Canal para cálcio operado por receptor
RS	Retículo Sarcoplasmático
RVP	Resistência Vascular Periférica
RYR₂	Receptor de rianodina
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	Canal para potássio ativado por baixa condutância ao cálcio
TEA	Tetraetilamônio
VOC	Canal para cálcio operado por voltagem / canal para cálcio do tipo L

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS).....	23
2.2 TRATAMENTO CONVENCIONAL E ALTERNATIVO PARA A HAS.....	24
2.3 DITERPENOS NO CONTEXTO CARDIOPROTETOR.....	25
2.4 <i>Pterodon</i> spp. Vogel (Fabaceae).....	26
2.5 FISIOLÓGIA VASCULAR.....	29
2.6 MECANISMOS DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO VASCULAR.....	31
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 OBTENÇÃO DO OLEORRESINA DE <i>Pterodon</i> spp. E DITERPENOS 6 α -ACETOXI-7 β -HIDROXIVOUACAPANO-17 β -OATO DE METILA.....	39
4.2 ISOLAMENTO DO DITERPENOS 6 α -ACETOXI-7 β -HIDROXIVOUACAPANO-17 β -OATO DE METILA A PARTIR DE <i>Pterodon</i> spp.....	39
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO 6 α -ACETOXI-7 β -HIDROXIVOUACAPANO-17 β -OATO DE METILA POR ANÁLISES DE RMN E ESI FT-ICR MS....	39
4.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	40
4.5 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	40
4.5.1 Preparação dos anéis aórticos.....	40
4.5.2 Efeito vasodilatador do ORS e diterpeno isolado da sucupira.....	41
4.5.3 Estudo do tempo de reversibilidade do ORS e diterpeno isolado.....	41
4.6 ELUCIDAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE VASODILAÇÃO DO ORS E DITERPENOS ISOLADOS DE <i>Pterodon</i> spp.....	42
4.6.1 Estudo do envolvimento das enzimas vasodilatadoras GCs e AC na atividade do ORS e diterpeno isolado em preparações E-.....	42
4.6.2 Avaliação da participação dos canais para K⁺ sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo ORS e diterpeno isolado em preparações E-.....	42
4.6.2.1 Efeito do bloqueador tetraetilamônio sobre a vasodilação induzida pelo ORS e diterpeno isolado.....	42
4.6.2.2 Efeito dos bloqueadores específicos de canal para potássio sobre a	

<i>vasodilatação induzida pelo ORS</i>	42
4.6.3 Avaliação da participação do retículo sarcoplasmático sobre o efeito vasorrelaxante induzido pelo ORS e diterpeno isolado em preparações E-	43
4.6.4 Estudo do efeito do ORS e diterpeno isolado sobre a mobilização do Ca²⁺ extracelular - Envolvimento dos canais de Ca²⁺ do tipo ROC e VOC	43
4.7 ESTUDOS DE PATCH-CLAMP	44
4.8 DOCKING MOLECULAR	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. RESULTADOS	47
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE	89

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão contabiliza 9,4 milhões de mortes anualmente (LIM et al., 2012) sendo causa de morte devido a complicações como isquemia do coração e infarto agudo do miocárdio em 45% e 51% das mortes respectivamente (WHO, 2008). Trata-se de uma doença de caráter poligênico e multifatorial em que prevalecem níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) geralmente associado a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo como coração, encéfalo, rins, vasos sanguíneos e alterações metabólicas (SBH, 2010).

Segundo estudo de prevalência de Kearney et al. (2005), no ano de 2000 mais de um quarto da população adulta mundial era hipertensa (aproximadamente 1 bilhão) e a estimativa para 2025 é um aumento de 25%, que representará 1,56 bilhões de hipertensos. Dessa forma, a busca por novas terapias para o manejo da doença é uma necessidade crescente.

Apesar da diversidade de drogas anti-hipertensivas presentes no mercado, tratamentos eficazes são dificilmente alcançados. Nesse cenário, encontra-se o crescente consumo de plantas medicinais como alternativa para prevenção e tratamento da doença. Exemplos de fontes naturais que possuem atividade anti-hipertensiva incluem os seguintes alcalóides: reserpina presente na *Rauwolfia serpentina* Gled.; tetrandrina presente no extrato da *Stephania tetrandra* Moore.; rincofilina e hirsutina presentes em *Uncaria rhynchophylla* Miq. A Tetrametilpirazina, composto ativo extraído da *Ligusticum wallichii* Franch., também apresenta atividade anti-hipertensiva (FRISHMAN; GRATTAN; MAMTANI, 2005). Uma grande quantidade de compostos fenólicos também tem mostrado atividade quanto à prevenção e tratamento de doenças com caráter cardiovascular (COSTA et al., 2012; FLEENOR et al., 2013; KIM et al., 2013).

Vários estudos tem demonstrado efeitos cardiovasculares obtidos por algumas classes de compostos intitulados diterpenos. Dentre tais, estão labdanos (EL-BARDAI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; LAHLOU et al., 2007; SIMPLICIO et al., 2014), traquilobanos (BACCELLI et al., 2007; MARTINSEN et al., 2010), pimaranos (AMBROSIO et al., 2002; TIRAPELLI et al., 2008) e cauranos (TIRAPELLI et al., 2004; TIRAPELLI et al., 2002). Esse compostos são encontrados

em várias plantas medicinais, sendo atribuídos provavelmente a eles os efeitos cardiovasculares de tais plantas (TIRAPELLI et al., 2010).

A caracterização fitoquímica da sucupira, *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae) constatou a presença de diterpenos com esqueleto do tipo vouacapânico (CAMPOS et al., 1994). Provavelmente esses compostos são responsáveis por funções terapêuticas das espécies de sucupira. Na medicina popular a planta é usada para o tratamento do reumatismo a partir do óleo volátil extraído da casca e alvéolo das sementes, e para tratamento da diabetes a partir das túberas radiculares também denominadas “batatas de sucupira” (LORENZI, 2008). Há registro também do uso de suas sementes como analgésico e antiinflamatório (PINTO COELHO et al., 2001).

A literatura conceituou algumas atividades farmacológicas das espécies de *Pterodon* spp.: eficácia cercaricida (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973), fungicida e bactericida (SILVA et al., 2007), tripanosomida (IZUMI et al., 2011), anti-edematogênica (SILVA et al., 2004), antinociceptiva (COELHO et al., 2005; NUCCI et al., 2012) antiinflamatória (MORAES et al., 2009; HOSCHIED et al., 2013), antioxidante e antinitrosante (PAULA et al., 2005), antiproliferativa (VIEIRA et al., 2008) e antiartrite (PINTO COELHO et al., 2001).

Além disso, também foi constatada atividade das espécies de *Pterodon* sobre o músculo liso do íleo (LEONHARDT et al., 2010) e traquéia (EVANGELISTA et al., 2007) de animais, atuando de forma antiespasmódica e miorrelaxante respectivamente. Buscando avaliar se a sucupira também apresenta atividade sobre o relaxamento vascular, a fim de se tornar uma planta eficaz no tratamento da hipertensão, este trabalho objetivou estudar a atividade do oleorresina extraído dos frutos de *Pterodon* spp. e de seu diterpeno isolado, o 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila em preparações isoladas de rato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

Doenças cardiovasculares, das quais incluem doenças coronarianas, doenças vasculares periféricas, falência congestiva do miocárdio, dislipidemias e hipertensão, são responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano em todo o mundo (WHO, 2008). Somente a hipertensão contabiliza 9,4 milhões de mortes anualmente (LIM et al., 2012) e acomete mais de 800 milhões de pessoas sendo o principal fator de risco para doenças coronarianas e acidente vascular encefálico (PELINO; PIZZIMENTI, 2014).

A HAS é uma doença de caráter poligênico e multifatorial. Trata-se de níveis elevados e sustentados de PA, usualmente associado a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo: coração, encéfalo, rins, vasos sanguíneos e alterações metabólicas (SBH, 2010). Evidências de ensaios clínicos controlados e randomizados indicam que valores maiores que 140 mmHg de PA sistólica e ou maiores que 90 mmHg de PA diastólica, são indicativos da doença (MANCIA et al., 2013). Nos Estados Unidos, um a cada três indivíduos possuem valores de PA superior a 140 x 90 mmHg, ou estão em uso de anti-hipertensivos (SOOD; REINHART; BAKER, 2010).

A HAS é uma doença que possui prevalência crescente justificada pelo crescimento populacional, envelhecimento e fatores de risco comportamentais como maus hábitos alimentares, falta de atividade física, uso abusivo de álcool, obesidade e estresse (WHO, 2013). Cerca de 24% dos brasileiros com 18 anos ou mais são hipertensos (BRASIL, 2012). A maior proporção de casos refere-se ao sexo feminino - 26,9%, para 21,3% do sexo masculino. A região Sudeste é a que apresenta maior percentual de casos e a região Norte contém o menor número de registros (BRASIL, 2012). Considerando-se valores de PA $\geq$ 140/90 mmHg, vinte e dois estudos encontraram prevalência da hipertensão entre 22,3% e 43,9% (média de 32,5 %) sendo que mais de 50% destes são atribuídos à população entre 60 e 69 anos e 75 % são indivíduos acima de 70 anos (SBH, 2010). Além disso, trinta e três por cento dos óbitos com causa definida no Brasil são atribuídos à hipertensão (PASSOS; ASSIS; BARRETO, 2006).

2.2 TRATAMENTO CONVENCIONAL E ALTERNATIVO PARA A HAS

A monoterapia não é suficiente para controlar a PA em muitos pacientes com HAS. A maioria dos guias para manejo da hipertensão orienta, sobretudo para pacientes com hipertensão severa ou que apresentam envolvimento de órgãos-alvo, um tratamento com associação de pelo menos dois medicamentos para que ocorra o controle da PA sistêmica (CHOBANIAN et al., 2003; MANCIA et al., 2013). A combinação de anti-hipertensivos com mecanismos de ação complementares pode fornecer efeitos anti-hipertensivos aditivos ou sinérgicos, permitir a utilização de doses mais baixas além de possibilitar a redução de efeitos adversos (SOOD; REINHART; BAKER, 2010).

A PA é o produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica (RVP). Os medicamentos que atuam em seu controle agem sobre uma das variáveis isoladamente ou em ambas. A redução do DC ocorre por meio da inibição da contratilidade do músculo cardíaco ou diminuição da pressão de enchimento ventricular. A atividade de redução da RVP ocorre por mecanismos que atuam no músculo liso ou por ação sobre sistemas que promovem vasoconstrição.

Os métodos convencionais para o tratamento da HAS baseiam-se na associação das diferentes classes de anti-hipertensivos: diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de receptores de angiotensina II, β -bloqueadores, bloqueadores α -adrenérgicos, vasodilatadores diretos e bloqueadores de canais de cálcio. O uso de medicamentos anti-hipertensivos reduz o risco de desfechos clínicos relevantes em pacientes com hipertensão como acidente vascular cerebral fatal ou não fatal (30 – 40%) e eventos coronários adversos (20%) (SOOD; REINHART; BAKER, 2010). Mesmo assim, o controle de PA permanece baixo uma vez que nem sempre há êxito na elaboração de tratamentos eficazes.

O tratamento alternativo/complementar para HAS tem se popularizado. Segundo a revisão de literatura de Ernst (2005), os efeitos anti-hipertensivos são modestos e as práticas que tem demonstrado melhores resultados, são o uso do alho (*Allium sativum*), práticas de exercícios como treinamento autógeno e yoga. Práticas da medicina tradicional chinesa também tem sido frequentemente relatadas nesse panorama, com destaque para formulações com plantas medicinais chinesas (XIONG et al., 2013).

Nos últimos anos tem crescido o uso de plantas medicinais como alternativa para prevenção e tratamento de várias doenças. Em países desenvolvidos, como no Reino Unido, 49% da população declara ter usado plantas medicinais pelo menos uma vez na vida (HOMAR, 2005). Compostos isolados de plantas como alcalóides (FRISHMAN; GRATTAN; MAMTANI, 2005) e polifenóis tem sido bastante estudados para o tratamento e prevenção da HAS (COSTA et al., 2012; FLEENOR et al., 2013; KIM et al., 2013).

Diterpenos são metabólitos secundários derivados do isopreno que são classificados como terpenos constituídos por quatro unidades do isopreno em sua estrutura química (DEWICK, 2009). Esses compostos apresentam atividade protetora sobre o sistema cardiovascular (LEE et al., 2001; TIRAPELLI et al., 2002; EL BARDAI et al., 2003; TIRAPELLI et al., 2008; HIPÓLITO et al., 2009; SIMPLICIO et al., 2014) e são encontrados em várias plantas medicinais, sendo atribuídos provavelmente a eles os efeitos cardiovasculares de tais plantas (TIRAPELLI et al., 2010).

2.3 DITERPENOS NO CONTEXTO CARDIOPROTETOR

Vários estudos tem demonstrado efeitos cardiovasculares obtidos por algumas classes de diterpenos. Esteviosídeo é um diterpeno glicosídico extraído da *Stevia rebaudiana* Bertoli, que foi muito estudado quanto aos seus efeitos cardiovasculares. O composto promove diurese, redução da PA média e queda da frequência cardíaca, além disso, estudos demonstraram seu efeito hipotensivo em animais normotensos (MELIS; SAINATI, 1991) e anti-hipertensivo em animais espontaneamente hipertensos (LEE et al., 2001). Também foi testado em humanos em estudos duplo-cego controlado e concluiu-se que sua administração oral por 12 e 24 meses levou a redução dos níveis de PA sistólica, diastólica e média (CHAN et al., 2000; HSIEH et al., 2003). O mecanismo de ação do esteviosídeo consiste em bloqueio do influxo de cálcio extracelular (LEE et al., 2001) e liberação de prostaglandina vasodilatadora (TIRAPELLI et al., 2010).

Diterpenos com esqueleto furânico do tipo labdano também foram bastante estudados neste contexto (EL-BARDAI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; LAHLOU et al., 2007; SIMPLICIO et al., 2014). Forscolina é um exemplo que está presente em *Coleus forskohlii* Willd. Esse composto apresentou atividade hipotensora em

animais normotensos e hipertensos, além de potente efeito inotrópico positivo e vasodilatador (BHAT et al., 1983). A atividade vasorrelaxante ocorre por ativação da enzima adenilato ciclase (AC), gerando um aumento de 3'-5' monofosfato cíclico (AMPC) que então ativa a proteína quinase A (PKA) deflagrando em vasodilatação (LINCOLN; FISHER-SIMPSON, 1984). Também atua por extrusão de íons cálcio do interior celular por abertura de canais de potássio (DEN HERTOOG; PIELKENROOD; VAN DEN AKKER, 1984).

Croton zambescius Muell (Euphorbiaceae) também foi estudada. Diterpenos com esqueleto traquilobano isolados da espécie apresentam relaxamento concentração-dependente em aorta de ratos contraídas por KCl de forma mais potente do que para contrações induzidas por noradrenalina (BACCELLI et al., 2007; MARTINSEN et al., 2010). Tal efeito deve-se provavelmente ao bloqueio de canais para cálcio dependentes de voltagem ou também denominado canal para Ca^{2+} do tipo L ($\text{Ca}_v1.2$) (MARTINSEN et al., 2010).

A literatura também traz estudos sobre a atividade cardiovascular do ácido caurenóico da *Viguiera robusta* Gardner. Estudos em carótidas de ratos demonstraram que o composto possui atividade inibitória sobre a contração do músculo liso vascular (TIRAPELLI et al., 2002) e, posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores identificou que este age pelo bloqueio de canais para cálcio presentes na membrana que permitem o influxo do íon para o meio intracelular, ativação da via óxido nítrico / GMP cíclico (NO/GMPc), além de indução da produção endotelial de óxido nítrico (NO) (TIRAPELLI et al., 2004).

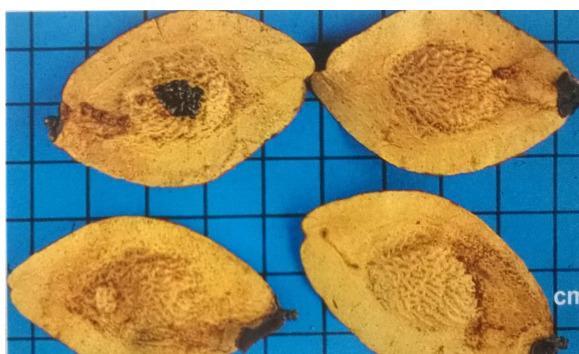
Outra classe de diterpenos descrita por sua atividade sobre o sistema cardiovascular são os pimaranos. Um exemplo da classe é o ácido pimaradienóico da *Viguiera arenaria* Baker. O composto inibiu contrações induzidas pela fenilefrina e alta concentrações de KCl em artéria de ratos (AMBROSIO et al., 2002), também induziu hipotensão em ratos normotensos com possível mecanismo de ação proposto por inibição do influxo extracelular de íon cálcio e liberação de NO e prostaglandina vasodilatadora (TIRAPELLI et al., 2008).

2.4 *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae)

O gênero *Pterodon* possui cinco espécies nativas do Brasil: *P. pubescens* Benth., popularmente conhecida como sucupira branca, *P. emarginatus* Vogel., *P.*

polygalaerflorus Benth., *P. apparicioi* Pedersoli. e *P. abruptus* Benth. (PIMENTA et al., 2006). A sucupira está presente em regiões de cerrado – abrange toda a região central do Brasil. Trata-se de árvores de aproximadamente 8 m de altura de madeira resistente que é empregada na construção civil. As flores de *P. emarginatus* são de cor rosada, dispostas em inflorescências paniculadas terminais e os frutos são leguminosos do tipo sâmara arredondadas, indeiscentes e aladas (Figura 1). Possuem apenas uma semente protegida por uma cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa. *P. polygalaerflorus* diferencia-se por ter flores de cor azul-violeta e as árvores são geralmente de maior porte (LORENZI, 2008).

Figura 1: Frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel.



Fonte: Lorenzi, 2002.

Na medicina popular, a sucupira é utilizada para o tratamento do reumatismo a partir do óleo volátil extraído da casca e alvéolo das sementes; e para o tratamento da diabetes utiliza-se as túberas radiculares ou “batatas de sucupira” (LORENZI, 2008). Também é utilizada como analgésico e antiinflamatório a partir de suas sementes (PINTO COELHO et al., 2001).

Vários estudos investigaram o potencial terapêutico das espécies de sucupira. Foi constatada atividade cercaricida contra *Schistosoma mansoni*, fungicida e bactericida, tripanosomida, anti-edematogênica, antinociceptiva, antiinflamatória, antioxidante e antinitrosante, antiproliferativa e anti-artrite (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; CARVALHO et al., 1999; PINTO COELHO et al., 2001; SILVA et al., 2004; COELHO et al., 2005; PAULA et al., 2005; SILVA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008; IZUMI et al., 2011; NUCCI et al., 2012; HOSCHEID et al., 2013). Também, Pimenta

et al. (2006) encontraram potencial atividade larvicida do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* contra larvas de estágio 3 de *Aedes aegypti*.

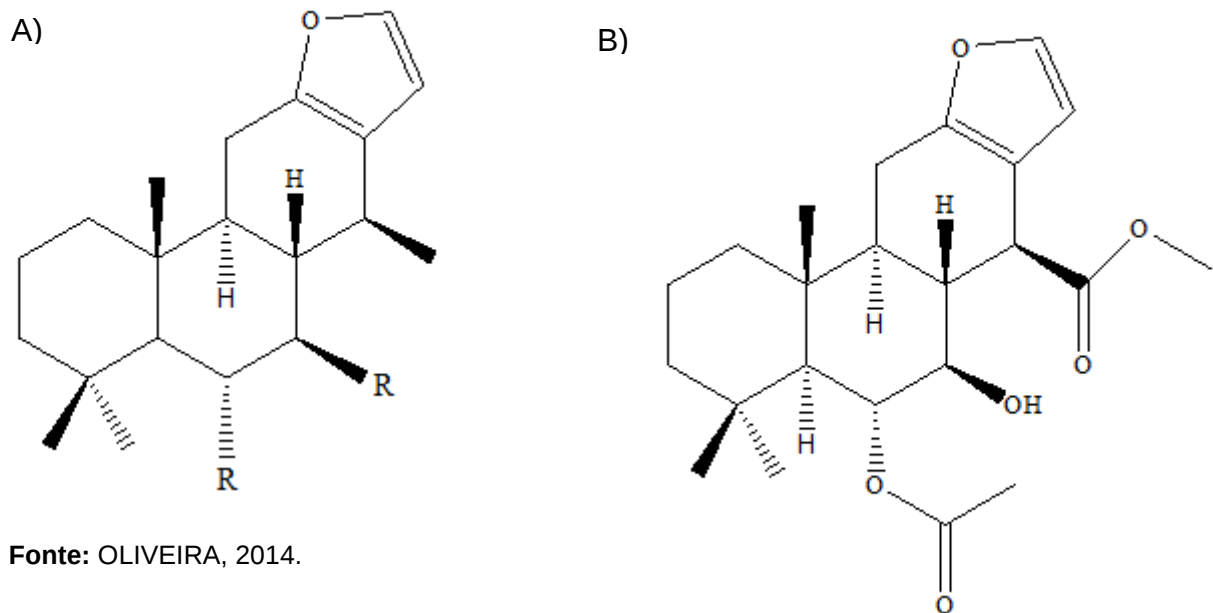
Pinto Coelho et al. (2001), demonstraram ausência de toxicidade subaguda (avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, peso relativo e absoluto de órgãos) de doses efetivas do extrato hidroalcoólico das sementes de *Pterodon pubescens* administrado a camundongos DBA1/J com artrite experimental induzida por colágeno do tipo II. Sabino et al. (1999), encontraram ausência de toxicidade aguda após administração do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* a doses significativamente superiores às administradas pela medicina popular para tratamento de artrite. Além disso, obteve ausência de mutagenicidade e citotoxicidade estudando células mononucleares de sangue periférico humano.

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* demonstraram a presença de alcalóides nas cascas das árvores, isoflavonas e triterpenos nas raízes e diterpenos e isoflavonas no óleo extraído dos frutos (BRAZ-FILHO; GOTTLIEB; VIEGAS, 1971). Também foram isolados e identificados diterpenos com esqueleto furânico do tipo vouacapano (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973; FASCIO et al., 1976; CAMPOS et al., 1994) como o diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (OLIVEIRA, 2014) (Figura 2).

A literatura tem demonstrado que diterpenos com esqueleto do tipo vouacapano isolados das espécies de *Pterodon* spp., possuem atividade antinociceptiva (SPINDOLA et al., 2011), atividade antiproliferativa sobre diferentes linhagens celulares (EUZEBIO et al., 2009; SPINDOLA et al., 2009; EUZÉBIO et al., 2010; PEREIRA et al., 2012), anti-inflamatória e analgésica (GALCERAN et al., 2011).

Belinelo et al. (2002), submeteu amidas derivadas do diterpeno ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oico (furanoditerpeno mais ubíquo) isolado de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. a triagem farmacológica *in vitro* a fim de determinar ação depressora sobre células neuronais. Utilizando o modelo experimental de contrações eletricamente estimuladas de íleo de cobaia, os autores obtiveram que os derivados furanoditerpenos causaram inibição da contração por um mecanismo não claro, mas que não está relacionado à ativação de receptores opióides ou α_2 -adrenérgico. Dessa forma, compostos isolados de *Pterodon* spp. podem compartilhar de ação direta sobre o músculo liso.

Figura 2: Diterpeno do tipo vouacapano. A) Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos. B) Estrutura química do diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila de *Pterodon* spp. Vogel



Fonte: OLIVEIRA, 2014.

Posteriormente, Leonhardt et al. (2010), estudando o efeito antiespasmódico do óleo essencial de *Pterodon polygalaeiflorus* e do seu composto majoritário, beta-cariofileno, em íleo de rato, encontrou que ambos relaxaram preparações previamente contraídas por KCl e acetilcolina. Além disso, em meio isento de cálcio, pré-exposição ao óleo essencial e beta-cariofileno reduziu a contração fásica estimulada pelo agonista muscarínico acetilcolina, sugerindo o envolvimento dos estoques de cálcio intracelular. Os autores concluíram que a atividade antiespasmódica deve-se possivelmente a um mecanismo direto miogênico intracelular.

A atividade do óleo essencial de *P. polygalaeiflorus* também foi estudada quanto à possível propriedade miorrelaxante sobre o músculo liso traqueal de ratos. (EVANGELISTA et al., 2007). Os autores identificaram efeito inibitório do óleo sobre contrações via acoplamento eletromecânico, uma vez que foi identificado envolvimento do potencial transmembrana na atividade do óleo.

2.5 FISIOLÓGIA VASCULAR

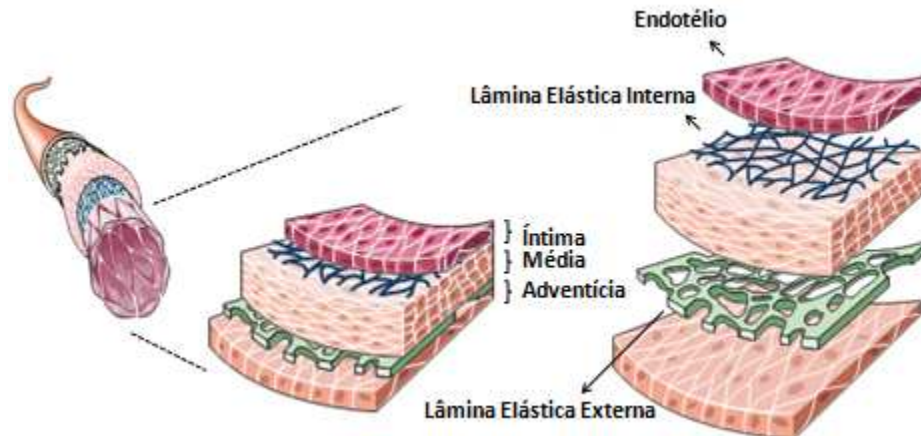
Os vasos sanguíneos apresentam três camadas ou túnicas (Figura 3): a adventícia que é a camada mais externa, composta por tecido conjuntivo frouxo e que recebe os nervos; a camada média em posição intermediária, que contém células musculares lisas dispostas circularmente, fibras colágenas e elastina; e a camada íntima, que fica em contato com o sangue, composta por células endoteliais que revestem a porção interna do vaso e uma lâmina subendotelial.(SEIDELMANN; LIGHTHOUSE ; GREIF, 2014). Nas artérias as túnicas são separadas entre si por lâminas elásticas interna e externa. As artérias de grande calibre, como a aorta possuem paredes que se distendem facilmente devido à grande quantidade de elastina presente na túnica média (LANNOY; SLOVE ; JACOB, 2014). A deposição desse material elástico as torna capazes de distenderem quando recebem o volume de ejeção durante a sístole ventricular e retornarem à sua forma original durante a diástole, ou seja, essas artérias são responsáveis pela manutenção da pressão e perfusão sanguínea (AIRES, 2012; SEIDELMANN; LIGHTHOUSE ; GREIF, 2014).

As células vasculares de músculo liso (CVML) possuem várias proteínas de interação ao Ca^{2+} , como por exemplo, canais para cálcio do tipo $\text{Ca}_v1.2$ e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Dessa forma, essas proteínas, juntamente com o retículo sarcoplasmático (RS), que está localizado intimamente (10 – 20 nm) à membrana plasmática da CVML, contribuem para a regulação da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]$) (AMBERG; NAVEDO, 2013).

Uma série de sinais extracelulares, sejam esses neurais, humorais, iônicos ou mecânicos (estiramento) induzem contração ou relaxamento das CVML. A dinâmica entre sinais de contração e relaxamento determina o tônus vascular que regulará o calibre dos vasos (WOODRUM; BROPHY, 2001). Alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ representam o principal mecanismo de regulação do estado de contração das CVLM, de tal modo que aumentos na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levam à contração vascular e o seu decréscimo resulta em relaxamento (MORGADO et al., 2012; AMBERG; NAVEDO, 2013).

Portanto, o músculo liso vascular é o principal responsável pelo funcionamento normal do sistema circulatório. Uma regulação prejudicada de sua contração é responsável por uma variedade de doenças como hipertensão, vasoespasmos, asma e síndrome do intestino irritado (IHARA; MACDONALD, 2007).

Figura 3: Corte transversal da parede arterial representando a camada adventícia, a camada média, constituída por células musculares lisas, e a camada íntima composta por uma fileira única de células endoteliais.



Fonte: Adaptado de Servier Medical Art, Powerpoint Image Bank (SERVIER, 2014).

2.6 MECANISMOS DA CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO VASCULAR

A contração das células musculares lisas ocorre por meio da interação dos filamentos grossos de miosina com os filamentos finos de actina. Para que isso ocorra, deve haver inicialmente a fosforilação da cadeia leve de miosina (CLM) (20 kDa) (SOMLYO, 2003). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$, levando à formação do complexo cálcio-calmodulina, ativa a proteína quinase da cadeia leve de miosina (ECKERT et al., 2000) que irá fosforilar a CLM tornando-a passível de interação com a actina. Quando ocorre redução dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$, uma segunda enzima é ativada, a fosfatase de CLM, que irá desfosforilar a CLM promovendo relaxamento vascular. Dessa forma, o balanço entre a atividade da quinase de CLM e da fosfatase de CLM controla o estado de tensão muscular (HIRANO et al., 2003; IHARA; MACDONALD, 2007; MURTADA; HOLZAPFEL, 2014).

A $[Ca^{2+}]_i$ é regulada por duas membranas (Figura 4), o plasmalema que está envolvido no controle do potencial de membrana e interação de agonistas (ex. neurotransmissores) e o RS que está relacionado à interação com segundos mensageiros (BREEMEN; SAIDA, 1989). A permeabilidade do plasmalema ao cálcio ocorre por canais para cálcio operados por voltagem (VOC) e canais para cálcio operados por receptor (ROC). Sendo que VOC são os principais responsáveis pelo influxo de íons cálcio para a célula muscular lisa (BOLTON, 1979).

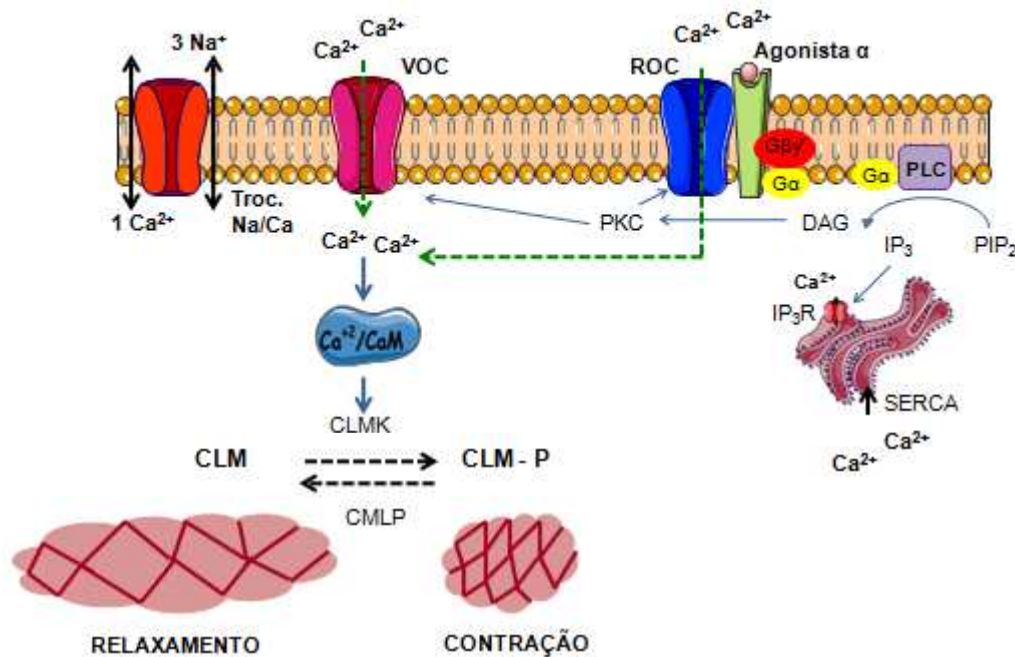
O aumento $[Ca^{2+}]_i$ pode ocorrer via despolarização da membrana das células vasculares, com envolvimento do bloqueio do efluxo de íons potássio – mecanismo denominado acoplamento eletromecânico, ou por mecanismos independentes de alterações do potencial de membrana - acoplamento farmacomecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1968; SOMLYO; SOMLYO, 1998).

A ligação de agonistas ao plasmalema, como a norepinefrina, serotonina, angiotensina II ou endotelina, via interação com receptores acoplados à proteína Gq/11 ativa a fosfolipase C (PLC), levando à liberação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) a partir do bifosfato de inositol (PIP_2) (SOMLYO et al., 1985). IP_3 difunde-se para o citosol, onde irá ativar receptores de IP_3 no RS. Esses receptores são responsáveis pela liberação de cálcio estocado no RS e o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ promovido por eles, pode por sua vez ativar liberação adicional de cálcio do RS via receptores de rianodina (RyR_2) (ORALLO, 1996). A saída de cálcio do RS é o principal mecanismo de acoplamento farmacomecânico descrito (SOMLYO et al., 1985). ATPases do retículo sarcoplasmático (SERCA), são responsáveis pela recaptação do cálcio liberado para o citoplasma durante a contração (CARAFOLI, 1987) contribuindo com os mecanismos de relaxamento vascular.

Em resposta a esse aumento de $[Ca^{2+}]_i$ a proteína quinase C (PKC), migra do citosol para a membrana, onde é ativada pelo diacilglicerol (DAG) que é também produto da quebra de PIP_2 (ORALLO, 1996). A PKC pode fosforilar proteínas transmembrana de canais para cálcio, levando à abertura dos mesmos e influxo do íon de forma independente às variações de voltagem (BREMEN; SAIDA, 1989), além de poder aumentar diretamente a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (ORALLO, 1996).

O endotélio vascular também está envolvido no controle do tônus vascular por meio da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. As células endoteliais produzem fator relaxante derivado do endotélio/NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), prostaciclina (PGI_2) (MONCADA et al., 1977), e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (CHEN; SUZUKI; WESTON, 1988), que agem como potentes vasodilatadores ao serem liberados pelo endotélio e se difundirem para o músculo liso vascular. O NO é o principal fator dentre tais a promover vasodilatação em artérias de grande condutância (MENDES et al., 2011), enquanto que o PGI_2 e EDHF tem efeito vasodilatador em vasos de menor calibre (SHIMOKAWA et al., 1996).

Figura 4: Representação esquemática da participação de VOC e ROC nos mecanismos de contração vascular.



Fonte: Próprio autor.

Notas: Bifosfato de Inositol (PIP_2); Cadeia Leve de Miosina (CLM); Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA); Complexo cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$); Diacilglicerol (DAG); Fosfatase de Cadeia Leve de Miosina (CMLP); Fosfolipase C (PLC); Quinase de Cadeia Leve de Miosina (CLMK); Proteína Quinase C (PKC), Receptor de Rianodina (IP_3R), 1,4,5-Trifosfato de Inositol (IP_3).

Nucleotídeos cíclicos como GMPc e AMPc estimulam Ca^{2+} ATPases no plasmalema e RS. Os aumentos dos níveis intracelulares desses nucleotídeos representa um dos principais mecanismos de relaxamento vascular por atuarem através de quatro mecanismos: diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via ativação da recaptação ou inibição da liberação de Ca^{2+} pelo RS e por aumento do efluxo de Ca^{2+} e/ou inibição do influxo; hiperpolarização da membrana vascular por ativação de correntes de efluxo de K^+ ; diminuição da sensibilidade da CLM ao cálcio por redução da atividade de quinase de CLM e/ou aumento da atividade de fosfatase de CLM e redução da sensibilidade da maquinaria contrátil por desacoplamento da CLM por mecanismos independentes de seu estado de fosforilação e da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (MORGADO et al., 2012).

Uma importante cascata de relaxamento vascular é a óxido nítrico / guanilato ciclase solúvel / GMP cíclico ($\text{NO}/\text{CGs}/\text{GMPc}$). O NO, como fator de relaxamento derivado do endotélio, foi descoberto na década de 80 por Furchgott e Zawadzki. Trata-se do ativador endógeno da enzima CGs que irá catalisar a formação do GMPc . Este por sua vez ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG)

promovendo o relaxamento pela diminuição dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ e/ou dessensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} (SCHLOSSMANN; FEIL; HOFMANN, 2003). As enzimas óxido nítrico sintase (NOS) são determinantes à biossíntese do NO. Existem três isoformas conhecidas, a forma induzível (iNOS) produzida em resposta a estímulos patológicos; e duas formas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) (FORSTERMANN et al., 1994).

Além da via do NO, Moncada e colaboradores (1977) descobriram que um anticoagulante era capaz de relaxar o músculo liso e posteriormente os mesmos autores concluíram a partir de estudo em aorta de coelho que o endotélio vascular produzia PGI_2 que possivelmente poderia estar envolvida na regulação do tônus vascular (MONCADA et al., 1977).

A PGI_2 promove predominantemente relaxamento vascular via aumento dos níveis de AMPc (IGNARRO et al., 1985). Este segundo mensageiro é sintetizado a partir do ATP via AC. Essa última se torna ativa via interação com neurotransmissores, drogas, entre outros que se ligam ao receptor acoplado a proteína G na membrana celular (MORGADO et al., 2012).

No entanto, na década de 90, Schini e Vanhoutt (1991) demonstraram que a L-arginina, precursor do NO, gera relaxamento dependente e independente do endotélio em aorta de ratos, observando assim, que o músculo liso vascular também possui vias bioquímicas para a conversão da L-arginina em NO. Ainda, produtos da ciclooxygenase de origem não endotelial tem sido descritos na indução de vasorelaxamento independente do endotélio (CHERRY et al., 1982; FORSTERMANN; HERTTING; NEUFANG, 1986).

Canais para potássio também estão envolvidos na regulação do tônus vascular via controle do potencial de membrana celular. Diferentes tipos desses canais já foram identificados em células endoteliais e células vasculares de músculo liso: canais para potássio dependentes de voltagem (K_v), canais para potássio ativados por baixa e alta condutância ao cálcio (SK_{Ca} e BK_{Ca} , respectivamente), canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e retificadores de corrente (K_{ir}) (KO et al., 2008). A abertura destes canais promove o efluxo dos íons K^+ que irá deflagrar em hiperpolarização da membrana muscular lisa e fechamento dos VOC com consequente relaxamento vascular. No sistema vascular, diferentes substâncias endógenas interferem com a função dos canais para K^+ , entre elas os segundos

mensageiros intracelulares GMPc e AMPc, que o fazem via ativação das enzimas PKG e PKA respectivamente (NELSON; QUAYLE, 1995).

Uma vez que o diâmetro vascular e o fluxo sanguíneo são determinados pela contratilidade das CVML (AMBERG; NAVEDO, 2013; MURTADA; HOLZAPFEL, 2014) e que o influxo de Ca^{2+} por essas células ocorre principalmente por VOC (ou $\text{Ca}_v1.2$) (BOLTON, 1979; JACKSON, 2000; MOOSMANG et al., 2003), substâncias que atuam bloqueando esses canais irão inibir o influxo do íon, impedindo o aumento de sua concentração intracelular gerando relaxamento vascular e vasodilatação. De fato, drogas com efeito vasodilatador representam a principal terapia anti-hipertensiva (WEI; HE; LV, 2012). Na clínica são empregadas três principais classes quimicamente distintas de bloqueadores de canais para cálcio: fenilalquilaminas (verapamil), benzotiazepinas (diltiazem) e dihidropiridinas (nifedipina) (RICHARD, 2005; MICHIELS et al., 2014). Esses fármacos se ligam à subunidade α_1C de $\text{Ca}_v1.2$ (RICHARD, 2005; SANCHEZ-PASTOR et al., 2014) em localizações distintas exibindo dessa forma diferentes efeitos fisiológicos. No entanto, possuem efeitos indesejados, como baixa duração de efeito e pouca seletividade vascular.

Dessa forma, considerando a atividade antiespasmódica e miorrelaxante de *P. polygalaeflorus*, com indícios de bloqueio de VOC, relatada na literatura (EVANGELISTA et al., 2007; LEONHARDT et al., 2010) nós hipotetizamos que o oleorresina extraído dos frutos de *Pterodon* spp. e o seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila) podem ter efeito como substâncias vasodilatadoras por bloqueio de VOC, representando assim um potencial agente terapêutico para a hipertensão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do oleorresina extraído dos frutos de *Pterodon* spp. e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila) sobre o tônus vascular usando artérias isoladas de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito vasorrelaxante do oleorresina de *Pterodon* spp. e do seu diterpeno isolado: 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila.
- Elucidar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação do oleorresina de *Pterodon* spp. e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila quanto à atividade vasodilatadora em aorta e células dissociadas a partir de metodologia de *patch clamp*.
- Realizar estudos de *docking* a fim de correlacionar o efeito vasorrelaxante do diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila à provável interação com canais para cálcio da membrana vascular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO OLEORRESINA DE *Pterodon* spp. E DITERPENOS 6 α -ACETOXI-7 β -HIDROXIVOUACAPANO-17 β -OATO DE METILA

Os frutos de *Pterodon* spp. foram adquiridos no mercado da cidade de Goiânia, GO. A identificação morfológica dos mesmos foi realizada pela Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). O oleorresina da sucupira (ORS) foi obtido por prensagem mecânica utilizando mini prensa contínua (MPE-40 E, ERCITEC). O procedimento foi realizado na Empresa Ercitec (Bauru, São Paulo).

A partir do ORS foi isolado e identificado o diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila (OLIVEIRA, 2014), gentilmente cedido pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG para a realização dos experimentos.

4.2 ISOLAMENTO DO DITERPENOS 6A-ACETOXI-7B-HIDROXIVOUACAPANO-17B-OATO DE METILA A PARTIR DE *Pterodon* spp.

Esta etapa foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da UFG e coordenada pelo Ms. Rangel Magalhães Luzin.

Foi utilizada CLAE Preparativa para o isolamento do diterpeno. Utilizou-se cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-8A, equipado com detector SPD-20A, coluna Shimadzu C18 (250 $\times$ 20 mm, 5 μ m) e fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada (0,05% v/v de ácido acético) na vazão de 8 mL/min. Os picos foram monitorados com detector UV nos comprimentos de 220 e 190 nm e o processamento dos dados foi feito através do programa *LC Solution*.

4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO 6A-ACETOXI-7B-HIDROXIVOUACAPANO-17B-OATO POR ANÁLISES DE RMN E ESI FT-ICR MS

Etapa realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear sob coordenação do Prof. Dr. Luciano Moraes Lião e Laboratório de Petroleômica e

Forense, sob coordenação do Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, ambos do Instituto de Química da UFG. A identificação do diterpeno foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono-13 (^{13}C), uni e bidimensionais (HMBC- *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, HSQC- *Heteonuclear Single Quantum Coherence*) e espectrometria de massas (Solarix 9.4 T, Bruker Daltonix, Bremen, Alemanha).

4.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos (200 – 300 g) provenientes do Biotério Central da UFG. Os protocolos experimentais descritos foram submetidos a análise e aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFG (Protocolo CEUA nº: 056/2013). Previamente aos experimentos os animais foram mantidos em caixas de propileno forradas com maravalha em ambiente com temperatura constante e controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de claro-escuro (12 horas cada), recebendo ração e água “*ad libitum*”.

4.5 ESTUDOS *IN VITRO*

4.5.1 Preparação dos anéis aórticos

Os animais foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação aórtica. Em seguida a aorta porção torácica foi retirada e isolada em um recipiente contendo solução nutritiva de Krebs (130 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 1,2 mM MgSO_4 ; 14,9 mM NaHCO_3 ; 5,5 mM glucose; 1,6 mM CaCl_2). Seguiu-se com a remoção dos tecidos conjuntivos e gordurosos adjacentes e o material foi seccionado em anéis contendo entre 3 a 5 mm cada. O endotélio vascular foi preservado ou removido mecanicamente com um estreito fio de metal, de acordo com o protocolo experimental a ser realizado.

As preparações foram montadas entre dois ganchos de metal, inseridos no lúmen dos anéis, para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo e o outro foi conectado a um transdutor de força isométrica, visando detectar alterações no tônus muscular. Estas preparações foram imersas verticalmente em cubas para banho de órgão isolado, contendo 10 mL de solução de Krebs

gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), mantido em pH 7,4 e temperatura constante de 37 ± 1°C.

As preparações foram submetidas à estabilização sob tensão basal de 1 g (previamente determinado por estudo piloto como tensão ótima) por 60 minutos, a fim de se obter manutenção do tensionamento fisiológico e adaptação às novas condições. Essa força exercida pelo tecido ao final da estabilização foi considerada como nível zero ou tônus basal da amostra.

Em seguida, as preparações foram estimuladas com a EC₅₀ da fenilefrina (agonista seletivo de receptores α_1 adrenérgicos; 0,1 μ M) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil (executado em triplicata, mediante sucessivas lavagens entre as repetições). Posteriormente, para avaliar a integridade do endotélio, as preparações pré-contraídas com fenilefrina foram expostas à acetilcolina (agonista muscarínico; 1 μ M). Dessa forma, preparações que apresentaram relaxamento superior a 80% foram consideradas como providas de endotélio (E+) e preparações que não apresentaram relaxamento foram consideradas desprovidas de endotélio (E-).

Todas as respostas contráteis foram registradas em um polígrafo multi-miógrafo (Narco Biosystems Inc., Houston, Texas – USA), acoplado a um sistema computadorizado (WinDaq Resource, DATAQ Instruments, Akron, OH, USA).

4.5.2 Efeito vasodilatador do ORS e do diterpeno isolado da sucupira

O efeito vasodilatador do ORS e do diterpeno isolado foi estudado a partir da obtenção de curvas concentração-efeito cumulativas. Após contração mediada pela EC₅₀ da fenilefrina (0,1 μ M) ou KCl (30 mM), as preparações E+ e E- foram submetidos à curva concentração-efeito por adição de concentrações crescentes do ORS (0 – 56 μ g/mL) ou diterpeno (0 – 48 μ g/mL). Também foram obtidas curvas de relaxamento na presença de dimetilmetilsulfóxido (DMSO) – solvente do ORS e diterpeno, que foram consideradas como controle negativo. Foram estabelecidas curvas para a droga padrão, verapamil (1 nM – 100 μ M) após contração mediada por fenilefrina (0,1 μ M) ou KCl (30 mM). Todas as respostas foram expressas em porcentagem de relaxamento.

4.5.3 Estudo do tempo de reversibilidade do ORS e diterpeno isolado

No intuito de avaliar se o efeito de relaxamento obtido pelas substâncias devia-se a um mecanismo de ação vasodilatador ou devido à perda de tensão dos anéis frente a possível citotoxicidade dos compostos, os anéis foram submetidos à concentração relativa ao efeito máximo (E_{MAX}) do ORS ou diterpeno isolado e, em seguida, foram lavados com solução de Krebs a cada 15 minutos e contraídos com fenilefrina ($0,1 \mu M$) a cada 30 minutos. Tal procedimento foi repetido durante 120 minutos. As respostas obtidas antes e após a incubação com ORS ou diterpeno isolado foram comparadas para a determinação do período no qual não mais se observou o efeito inibitório de tais sobre as preparações de aorta.

4.6 ELUCIDAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE VASODILATAÇÃO DO ORS E DITERPENOS ISOLADOS DE *Pterodon* spp.

4.6.1 Estudo do envolvimento das enzimas vasodilatadoras GCs e AC na atividade do ORS e diterpeno isolado em preparações E-

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o ORS e diterpeno isolado foram obtidas em anéis de aorta sem endotélio, pré-contraídos com a EC_{50} da fenilefrina. Os anéis de aorta foram incubados por 20 min com ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel – GCs; $1 \mu M$) ou MDL – 12,330A (inibidor da AC; $10 \mu M$).

4.6.2 Avaliação da participação dos canais de K^+ sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo ORS e diterpeno isolado em preparações E-

4.6.2.1 Efeito do bloqueador TEA sobre a vasodilatação induzida pelo ORS e diterpeno isolado

Nessas avaliações foram obtidas curvas concentração-efeito para ORS e diterpeno isolado em preparações E- previamente incubados por 20 min com inibidor não específico de canais para potássio, o TEA ($5 mM$).

4.6.2.2 Efeito dos bloqueadores específicos de canal para potássio sobre a vasodilatação induzida pelo ORS

Nesses estudos curvas concentração-resposta para o ORS foram obtidas em anéis de aorta sem endotélio, pré-contraídos com a EC_{50} da fenilefrina e previamente incubados por 20 minutos com os seguintes inibidores seletivos de canal para K^+ : 4-aminopiridina (inibidor dos canais para K^+ sensíveis a voltagem, K_v ; 1 mM) ou glibenclamida (inibidor dos canais para K^+ sensíveis ao ATP, K_{ATP} ; 3 μ M).

4.6.3 Avaliação da participação do RS sobre o efeito vasorrelaxante induzido pelo ORS e diterpeno isolado em preparações E-

Nesse protocolo foram obtidas curvas concentração-efeito para o ORS e diterpeno isolado em preparações E- previamente incubados por 20 min com ácido ciclopiazônico (CPA, inibidor da receptação de Ca^{2+} pela SERCA; 10 μ M). Findado o período de incubação, as preparações foram contraídas com a EC_{50} da fenilefrina e em seguida o ORS foi adicionado sob concentrações cumulativas a fim de avaliar possível envolvimento da SERCA no mecanismo de vasodilatação.

4.6.4 Estudo do efeito do ORS e diterpeno isolado sobre a mobilização do Ca^{2+} extracelular – Envolvimento dos canais de Ca^{2+} do tipo ROC e VOC

Para estudar o influxo de Ca^{2+} extracelular preparações de aorta E- foram previamente estimuladas com solução concentrada de KCl (75 mM) a fim de se obter um percentual de contração controle. Em seguida a solução fisiológica de Krebs foi substituída por uma solução de mesma constituição exceto pela ausência de Ca^{2+} (solução zero- Ca^{2+}). Posteriormente, as preparações receberam sucessivas estimulações com fenilefrina (0,1 μ M) com o intuito de depletar os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Foi então adicionado ou não, o ORS (28 μ g/mL) ou diterpeno isolado (16 μ g/mL) e seguiu-se com 30 minutos referentes ao período de incubação dos mesmos. Logo após, os anéis aórticos foram estimulados com fenilefrina (0,1 μ M). Para obtenção das curvas de concentração-efeito, foi acrescentada às preparações solução concentrada de cloreto de cálcio ($CaCl_2$; 0,1 – 3,0 mM). Também foram realizadas, para fim de comparação, curvas com a droga padrão, verapamil (0,3 μ M).

Protocolo similar, exceto pela ausência do passo de depleção do Ca^{2+} reticular e adição de pré-carga de solução de KCl (10mM) foi realizado com estimulação da contração por Bay K8644, ativador seletivo de $\text{Ca}_v1.2$ (1 μM).

Também foi desenvolvido protocolo no qual as preparações foram estimuladas por concentrações crescentes de solução concentrada de KCl (10, 20, 30, 40 mM) na presença ou ausência do ORS (16 $\mu\text{g/mL}$), diterpeno isolado (9,6 $\mu\text{g/mL}$) ou verapamil (0,3 μM).

4.7 ESTUDOS DE *PATCH-CLAMP*

Estudos de *patch-clamp* foram realizados no Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Correntes de $\text{Ca}_v1.2$ foram isoladas a partir da eliminação de correntes de K^+ através da inclusão de Cs^+ e TEA nas micropipetas. As pipetas foram preenchidas com a seguinte solução (em mM): 130 de CsCl, 10 TEA-Cl, 10 EGTA, 4 MgCl_2 , 4 ATP-Mg e 10 de HEPES, com o Ph ajustado para 7,2 com CsOH. A solução externa continha (mM): 130 NaCl, 20 BaCl_2 , 0,5 MgCl_2 , 10 HEPES e 5 glicose com o pH ajustado para 7,4 com NaOH (osmolaridade de 270-300 mOsM). Correntes através dos canais $\text{Ca}_v1.2$ foram avaliadas utilizando o Ba^{2+} como o carreador de carga após estimulação com Bay K8644 (1 μM) no intuito de aumentar o índice sinal-ruído. As correntes foram geradas por pulsos 100 ms para 10 mV a partir de um potencial de conservação de -50mV, a fim de isolar as correntes do Ca^{2+} do tipo-L, a cada 10 segundos. Uma concentração de 36 $\mu\text{g/mL}$ do diterpeno foi aplicada de forma aguda durante 5 minutos, correspondente ao tempo necessário para atingir uma condição de equilíbrio. Os dados foram coletados após a configuração de toda a célula e estabilização da amplitude da corrente.

4.8 *DOCKING MOLECULAR*

Estudos de *docking molecular* foram realizados no Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular da UFG, a fim de explorar as bases moleculares tridimensionais (3D) das interações do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila com o sítio ativo do $\text{Ca}_v1.2$. Inicialmente a

estrutura em 3D do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila e do (S)-verapamil foram importadas para a plataforma Maestro v.9.3 (Schrödinger, LCC, New York, 2012) e preparadas com o LigPrep v.2.5 (Schrödinger, LCC, New York, 2012). Todos os possíveis estados de ionização e tautomerização foram gerados para o pH 7.4 $\pm$ 1.0 usando o Epik v.2.3 (SHELLEY et al., 2007). Para a manutenção da configuração bioativa dos ligantes, as quiralidades específicas foram restringidas. As conformações dos ligantes foram geradas usando o ConfGen v.2.3 (WATTS et al., 2010) com o campo de força OPLS-2005 (BANKS et al., 2005) em módulo padrão. O confômero com menor energia potencial foi considerado para os estudos de *docking* do Ca_v1.2, nós decidimos usar o modelo teórico em 3D gerado e cedido pelo Dr. Zhorov (CHENG; TIKHONOV ; ZHOROV, 2009). O modelo 3D foi importado para a plataforma Maestro e preparado usando o *software Protein Preparation Wizard* da seguinte forma: átomos de hidrogênio foram adicionados de acordo com os cálculos do Epik v.2.3 (SHELLEY et al., 2007) para os valores de pKa (para pH 7.4 $\pm$ 1.0) e minimizado usando o campo de força OPLS-2005 (BANKS et al., 2005). Posteriormente, os resíduos dos sítios ativos foram definidos através da interpretação de vários estudos mutacionais com resíduos do Ca_v1.2. De forma particular, os resíduos das hélices transmembrana IIIS5, IIIS6, e IVS6 e P-loops das repetições III e IV foram escolhidas devido à sua contribuição para a ligação de fenilalquilaminas como o verapamil (DORING et al., 1996; HERING et al., 1997; HOCKERMAN et al., 1997; DILMAC; HILLIARD ; HOCKERMAN, 2004; HUBER et al., 2004). Portanto, uma caixa (grid) com dimensões de 1.48 Å $\times$ 2.30 Å $\times$ - 8.21 Å (x, y and z) e volume de 20 Å³ foi construída em torno desses segmentos transmembrana usando o painel de geração de grid do Glide v.5.8 (FRIESNER et al., 2004). Finalmente, simulações de estudo de *docking* foram realizadas utilizando a resolução Glide SP. A orientação das ligações do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila e do verapamil no sítio ativo foram analisadas e a conformação energética mais favorável foi selecionada através da função GlideScore (ELDRIDGE et al., 1997).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de tensão isométrica em preparações de aorta foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e tratados segundo o programa

GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.0). Foram obtidos valores de efeito máximo ($E_{MÁX}$) e da concentração da droga que produz 50% do efeito inibitório (IC_{50}), bem como gráficos das curvas de concentração-efeito cumulativas obtidas na presença ou ausência das substâncias em estudo e ferramentas farmacológicas pertinentes. A análise estatística utilizada para comparação entre os valores de $E_{MÁX}$ ou IC_{50} foi a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido do pós-teste de Newman Keuls e Teste t de Student. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Artigo submetido no periódico: **Pharmacological Research**

Blocking the L-type Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v1.2$) is the key mechanism for the vascular relaxing effect of *Pterodon spp.* and its isolated diterpene methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate

Carolina De Fátima Reis^a, Daniela Medeiros Lobo de Andrade^a, Bruno Junior Neves^c, Leandra de Almeida Ribeiro Oliveira^b, José Felipe Pinho^d, Leidiane Pinha da Silva^d, Jader Dos Santos Cruz^d; Maria Teresa Freitas Bara^b, Carolina Horta Andrade^c, Matheus Lavorenti Rocha^{a*}

^aLaboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^bLaboratory of Natural Products Research, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^cLaboratory for Molecular Modeling and Drug design, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^dLaboratory of Excitable Membranes and Cardiovascular Biology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, UFMG.

* Author of correspondence

UFG - Faculty of Pharmacy

Rua 240 esquina com 5^a Avenida s/n, Setor Universitário CEP: 74605-170 - Goiânia
- GO - Brazil

E-mail address: matheusroch@yahoo.com.br

Tel.: +55 62 3209-6440; Fax: +55 62 3209-6037

Chemical compounds studied in this article:

Acetylcholine chloride (PubChem CID: 6060)

Bay K8644 (PubChem CID: 2303)

cyclopiazonic acid (PubChem CID: 54682463)

ODQ ([1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) (PubChem CID: 1456)

Phenylephrine hydrochloride (PubChem CID: 5284443)

Tetraethylammonium chloride (PubChem CID: 5946)

Verapamil hydrochloride (PubChem CID: 62969)

1 INTRODUCTION

Cardiovascular disease is the major cause of death worldwide. Hypertension is responsible for 9.4 million deaths each year [1]. Nearly one billion adults suffer from hypertension and this number will be 25% higher by 2025, when there will be a total of 1.56 billion hypertensive people in the world [2].

The use of natural products as a possible alternative treatment for hypertension has been extensively studied. The genus *Pterodon* has five species widely distributed in the Latin America and Africa: *P. pubescens* Benth., *P. emarginatus* Vog, *P. polygalaeflorus* Benth., *P. apparicioi* Pedersoli and *P. abruptus* Benth [3]. *Pterodon* spp. fruits and seeds are widely used in folk medicine due to their anti-rheumatic, antinociceptive and anti-inflammatory effects and several ethnopharmacological studies have confirmed these actions [4-8].

In addition, when studying the possible effects of myorelaxant activities on rat smooth muscle, Evangelista and co-workers [9] found that the essential oil of *P. polygalaeflorus* produced inhibitory effects on contractions triggered by eletromechanical coupling in isolated tracheas. In the same way, Leonhardt et al., in their study of the essential oil of *P. polygalaeflorus*, showed an antispasmodic effect on rat isolated ileum [10]. They found that this antispasmodic effect is mediated through a myogenic intracellular mechanism, although a reduction in calcium influx through the cell membrane could not be ruled out.

Phytochemical studies of *Pterodon* spp. have demonstrated the presence of diterpenes [11-14]. These are natural compounds of plant origin which exert significant cardiovascular effects. Belinelo et al., [15] showed that amides derived

from furanditerpene 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid (the most ubiquitous furanditerpene) isolated from *P. polygalaeflorus* fruits inhibited contraction in isolated guinea pig smooth muscle. The mechanisms involved are not clear but the findings indicate a possible direct inhibition of smooth muscle cells.

Smooth muscle contractility is mainly regulated by changes in intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$). An increase in $[Ca^{2+}]_i$ results in contraction and a decrease in $[Ca^{2+}]_i$ results in relaxation. The increase of $[Ca^{2+}]_i$ occurs through membrane channels influx and the release of intracellular sources. The degree of vascular smooth muscle contraction is determinant in the long term regulation of arterial blood pressure [16] and the lack of adequate regulation of vascular tone can trigger hypertension [17]. As drugs such as verapamil, nifedipine and diltiazem, which act as Ca^{2+} channel blockers, produce vasodilatation and a reduction in systemic arterial pressure, and the fact that *Pterodon* spp could act as Ca^{2+} channel blockers [9,10,13,14], we hypothesized that the extract from *Pterodon polygalaeflorus* fruits and its isolated diterpene methyl-6 α -acetoxo-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate (Fig. 1) could also act on the vascular smooth muscle by blocking the calcium channels, and thereby promoting vasodilatation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant extraction and isolation of diterpene methyl-6 α -acetoxo-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate

Pterodon spp. fruits (popularly known as sucupira) were obtained in the local markets in Goiânia, Goiás, Brazil. Identification of the genus was confirmed by Dr. Maria Teresa Freitas Bara of the School of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG). The seeds were pressed by mini continuous press (MPE-40 Ercitec) to obtain the sucupira oil-resin (SOR). The SOR isolated diterpene methyl-6 α -acetoxo-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate was kindly provided by Dr. Maria Teresa Freitas Bara of UFG. Preliminary separation of the diterpene from SOR was carried out via preparative HPLC (Shimadzu, model LC-8A, equipped with SPD-20A detector). The structural elucidation was carried out by ESI FT-ICR mass spectra and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis in the Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil. All 1H NMR analyses were performed on a Bruker

Avance III 500-11.75 Tesla spectrometer, at 298 K, using a 5 mm inverse probe-head [18,19].

2.2 Pharmacological studies

2.2.1 Aortic preparations

Male Wistar rats (200-230g) from the Central Animal House, at the Federal University of Goiás, were used for the experiments. The animals were housed in a temperature- and light-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$; 12h light/dark cycle) in our laboratory with free access to water and rodent chow and acclimatized for a period of at least one week before starting the experiment. They were handled in accordance with internationally accepted standard guidelines for the use of animals. All procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil (protocol: 056/2013).

The rats were anaesthetized and killed by abdominal aortic exsanguinations. The thoracic aorta was isolated and connective and fat tissues were removed. The isolated aortas were cut into rings of approximately 4 mm in length, placed between two stainless-steel stirrups and connected to an isometric force transducer (Panlab SLU, Barcelona, Spain). The responses were recorded using a computerized system and a WinDaq Resource (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) data acquisition unit to measure tension in the preparations. The aortic rings were placed in a 10 ml organ chamber containing a Krebs solution of the following composition: 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 14.9 mM NaHCO_3 , 5.5 mM glucose, and 1.6 mM CaCl_2 . The solution was maintained at pH 7.4, and gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C . The rings were initially stretched to a basal tension of 1.0 g (optimal basal tone, previously determined by length–tension relationship experiments) before allowing them to equilibrate in the bathing medium.

In some preparations, the endothelial cells were mechanically removed by rubbing the internal artery surface with a fine metallic wire (200 μm in diameter) and the effectiveness of the removal was demonstrated by the absence of relaxation to acetylcholine (1 μM) pre-contracted with phenylephrine (Phe) (0.1 μM , the EC_{50} previously determined in our laboratory). For studies in preparations with

endothelium, the rings were discarded when the relaxation to acetylcholine was less than 80%.

2.2.2 Experimental protocols in isolated artery

Aortic rings with or without endothelium (E+/E-) were contracted with Phe (0.1 μ M) or KCl (30 mM) and then SOR (0 – 56 μ g/mL) or diterpene (0 – 48 μ g/mL) were added cumulatively. For comparison, the effect of verapamil (1 nM – 100 μ M), a well known blocker of voltage-dependent channels ($\text{Ca}_v1.2$), was also evaluated.

To investigate the possible mechanism(s) of SOR and diterpene induced relaxation, E- rings were contracted with Phe (0.1 μ M) 30 min after incubation with one of the following drugs: reticular Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor, cyclopiazonic acid (CPA, 10 μ M); non-selective K^+ channels blocker, Tetraethylammonium (TEA, 5 mM); selective soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 1 μ M); selective adenylyl cyclase inhibitor (MDL-12,330A, 10 μ M).

The role of extracellular Ca^{2+} mobilization induced by 2 different stimuli was investigated by CaCl_2 -induced contraction in the presence of $\alpha 1$ -adrenergic agonist (phenylephrine) or L-type Ca^{2+} channel activator (Bay K8644). First of all, endothelium-denuded rings were contracted with a concentrated solution of KCl (75 mM) to produce maximal contraction to each preparation (100% of contraction), and then rinsed with Ca^{2+} -free Krebs solution until it reaches the baseline. So, the arterial rings were contracted with Phe (0.1 μ M) in Ca^{2+} -free Krebs solution (approximately 5 or 6 times in 60 min) until the disappearance of any contractile response in order to deplete intracellular Ca^{2+} stores. The preparations were rinsed again in Ca^{2+} -free Krebs solution and the rings were incubated with IC_{50} of SOR (28 μ g/mL) or diterpene (16 μ g/mL) for 30 minutes. After that, the cumulative concentration–response curves for CaCl_2 (0.0–3.0 mM) were obtained after stimulus with phenylephrine (0.1 μ M) or Bay K8644 (1 μ M). In the case of Bay K8644 stimulus, the KCl of Krebs solution was increased to 10 mM to facilitate Ca^{2+} influx through voltage-dependent calcium channels.

In another protocol, endothelium-denuded rings incubated (30 min) with SOR (16 μ g/mL) or diterpene (9.6 μ g/mL) were contracted with the KCl concentrated solution (10, 20, 30, 40 mM) and the contraction levels were recorded. The values 16

and 9.6 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} for SOR and diterpene, respectively) were found in concentration curve effects under pre-contraction with KCl 30mM. In all protocols, the L-type calcium channel blocker verapamil (0.3 μM), was used as a control and its results used for comparison.

2.3 Whole-cell patch-clamp recording

2.3.1 Freshly dissociated smooth muscle cell preparation

Smooth muscle cells of the thoracic aorta were dissociated moments before the electrophysiological recordings using the enzymatic process previously described by Pinho JF and Medeiros MA with some modifications [20]. Subsequent to the dissociation process, the cells freshly dispersed in PSS (Ca^{2+} 2.6mM) solution were placed on clean glass plates where they remained for 30 minutes for adhesion.

2.3.2 Whole-cell patch-clamp recording

Ca_v 1.2 currents were isolated by eliminating K^+ currents through the inclusion of Cs^+ and TEA in the patch pipette. Patch pipettes were filled with the following solution (in mM): 130 CsCl, 10 TEA-Cl, 10 EGTA, 4 MgCl_2 , 4 ATP-Mg and 10 HEPES with the solution adjusted to pH 7.2 with CsOH. The external solution contained (in mM): 130 NaCl, 20 BaCl_2 , 0.5 MgCl_2 , 10 Hepes and 5 glucose with the pH set to 7.4 with NaOH (osmolarity of 270–300 mOsm). Currents through the Ca_v 1.2 channels were evaluated using Ba^{2+} as the charge carrier after further stimulation with Bay K8644 (1 μM) to increase the signal-to-noise ratio. The currents were generated by 100 ms steps to 10 mV from a holding potential of – 50 mV, in order to isolate the L-type Ca^{2+} currents, every 10 s. A concentration of 36 $\mu\text{g/mL}$ of diterpene was applied acutely during current recordings for 5 min, the length of time required to reach steady-state conditions. Data were collected after the whole-cell configuration was obtained and the current amplitude had stabilized.

2.4 Molecular Docking

In order to explore the molecular basis of ligand–channel interactions for methyl-6 α -acetox-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate within the binding site of L-type Ca^{2+} channel (LTCC), molecular docking studies were performed. In the absence of

x-ray structure, we used the 3D homology model of the LTCC kindly provided by Dr. Zhorov [21]. This model contains transmembrane segments S5 and S6 and P-loops from the four repeats. The structure was imported to Maestro v. 10.0 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) and prepared using Protein Preparation Wizard [22] workflow as follows: hydrogen atoms were added according to Epik v. 2.7 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) [23] for pKa values ($\text{pH } 7.4 \pm 1.0$) and minimized using the OPLS-2005 force field [24]. The binding site residues were defined through a carefully examination of various mutational studies with residues of the $\text{Ca}_v1.2$ [25-29]. Domains III and IV contain the specific binding site for all Ca^{2+} channel blockers. Residues in transmembrane segments IIIS5, IIS6, and IVS6 and P-loops of domains III and IV were chosen because their contribution to the binding of phenylalkylamine drugs, such as verapamil [25-29]. Then, the grid was defined to include the full ligand-binding site of $\text{Ca}_v1.2$, with dimensions of $1.48 \text{ \AA} \times 2.30 \text{ \AA} \times 8.21 \text{ \AA}$ (x, y and z) and volume of $20 \text{ \AA}^3$ around the transmembrane segments using the receptor grid generation panel of the Glide v. 6.2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) [30].

Previous to docking studies, the 3D structures of the ligands methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate and (S)-verapamil were built in Marvin 6.3.1 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>), imported into Maestro and prepared with LigPrep v.2.5 (Schrödinger, LCC, New York, 2012). All possible ionization and tautomeric states were generated at $\text{pH } 7.4 \pm 1.0$ using Epik v. 2.7 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) [23]. Ligand conformations were generated using ConfGen v. 2.7 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) [31] with the OPLS-2005 force field [24] without any constraints. The lowest potential energy conformers were retained as input for docking studies.

Molecular docking of the methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate at the LTCC homology model was investigated using Glide software v. 6.2, with the standard precision (SP) scoring function [30]. Finally, the binding orientations of methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate and verapamil in the binding site were analyzed and the most energetically favorable conformations were selected.

2.5 Drugs and Solutions

The SOR and isolated diterpene were obtained from the Laboratory of Natural Products Research, School of Pharmacy, Federal University of Goias by Dr. Maria Teresa Freitas Bara. The drugs which included phenylephrine, acetylcholine, ODQ, CPA, MDL-12,330A Hydrochloride, Bay K8644, TEA and verapamil, used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used in the study were commercially available and of reagent grade. Bay K8644 was dissolved in ethanol. ODQ, CPA and MDL-12,330A were dissolved in DMSO while the other drugs were dissolved in distilled water. SOR and diterpene were dissolved in DMSO 10%.

2.6 Statistical analysis

The maximum effect (E_{MAX}) was considered as the maximal amplitude response reached in the concentration–effect curves. The IC_{50} value (concentration to produce 50% of the E_{MAX} response) was determined from the concentration–response curve by linear interpolation (SOR 0-56 $\mu\text{g/mL}$; diterpene 0-48 $\mu\text{g/mL}$ and verapamil 1nM-100 μM). For verapamil, the pD_2 values = $-\log EC_{50}$.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Comparisons between groups were performed using one-way ANOVA followed by Newman–Keuls. The Student's t test was used to evaluate the IC_{50} . The significance level was set in 0.05. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. The values for reactivity and response to SOR, diterpene and verapamil are expressed as a percentage of the preceding contraction.

3 RESULTS

3.1 Effect of SOR and diterpene on isolated arteries pre-contracted with Phe or KCl

As shown in Fig. 2A, when the SOR was cumulatively added to the bath, it induced relaxation in rings pre-contracted with both Phe and KCl in a concentration-dependent way. The E_{MAX} induced by SOR in aortic rings pre-contracted with Phe were similar ($p>0.05$) in E+ ($86.7\pm7.1\%$, $n=8$) and E- ($92.3\pm4.7\%$, $n=5$) preparations. These results show that vasodilators released by endothelium are not involved in

SOR relaxation. In the same way, the relaxation in E- aortic preparations pre-contracted with KCl was not different ($97.1 \pm 2.8\%$, $n=5$). However, IC_{50} values showed a significant difference ($p < 0.05$) as can be seen by the leftward shift of preparations stimulated with KCl ($15.2 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) when compared with the Phe E- ($23.6 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$).

The E_{MAX} induced by diterpene in aortic preparations E+ and E- pre-contracted with Phe are not statistically different ($94.5 \pm 3.6\%$, $n=5$ and $92.2 \pm 3.4\%$, $n=5$, respectively) (Fig. 2B). These values are also similar ($p > 0.05$) to those obtained from KCl contracted denuded-rings ($99.7 \pm 1.2\%$, $n=6$). In the same way as occurs for SOR, IC_{50} values of diterpene showed significant difference ($p < 0.05$) in preparations pre-contracted with Phe E- ($10.4 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$) as compared to pre-contraction with KCl ($5.4 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$).

The relaxing effects induced by SOR and its isolated diterpene were totally reversed after successive washings. The contraction levels to Phe before and after the carrying out of concentration-effect curves to SOR or diterpene were similar. This observation suggests the absence of a cytotoxic effect relative to myocyte injury. Moreover, the concentration of DMSO in the organ chamber did not exceed 0.1% and had no effect on tension generation in these preparations (data was not shown).

Verapamil (used as a positive control) also showed a potent effect in the calcium influx inhibition as can be seen by the significant difference ($p < 0.05$) with an analogous leftward shift in KCl-contracted curves (pD_2 : 6.92 ± 0.09) as compared to Phe-contracted preparations (pD_2 : 5.99 ± 0.14). It can be seen in Fig. 2C that the verapamil-induced relaxation in Phe-contracted vessels E+ ($100.6 \pm 1.4\%$, $n=5$) was not different from E- ($99.6 \pm 1.2\%$, $n=4$). In the same way, values obtained in KCl-contracted arteries E- were not different in terms of the E_{MAX} ($104.3 \pm 3.5\%$, $n=4$).

3.2 Effect of CPA , TEA, ODQ and MDL-12,330A on relaxation induced by SOR and diterpene

The reticular Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor, CPA, non-selective K^+ channel Blocker, TEA, or the adenylyl cyclase inhibitor, MDL-12,330A, did not have any significant effect on SOR ($87.7 \pm 3.0\%$, $n=5$; $82.9 \pm 5.8\%$, $n=5$; and 94.1 ± 5.2 , $n=5$,

respectively) induced relaxation in E- preparations when compared to control preparations ($92.3 \pm 4.7\%$, $n=5$) (Fig. 3A).

Similarly, the E_{MAX} values obtained for preparations relaxed with the diterpene ($92.2 \pm 3.4\%$, $n=5$) were not different from the CPA, TEA or MDL-12,300-treated rings ($97.1 \pm 1.6\%$, $n=5$; $90.3 \pm 1.7\%$, $n=5$; and 88.5 ± 3.9 , $n=4$, respectively) (Fig. 3B). Based on these findings, we can suggest that calcium reuptake or membrane hyperpolarization induced by K^+ efflux are not involved in SOR or diterpene vascular relaxation mechanisms.

To investigate whether the soluble guanylyl cyclase enzyme is involved in smooth muscle relaxation induced by SOR and diterpene, the rings were incubated with the selective inhibitor ODQ. The E_{MAX} for SOR in the control ($92.3 \pm 4.7\%$, $n=5$) was not different from that of the preparations incubated with ODQ ($80.3 \pm 3.2\%$, $n=5$) (Fig 3A). In contrast, ODQ reduced the E_{MAX} induced by diterpene ($81.4 \pm 3.1\%$, $n=5$) (Fig. 3B) when compared to control preparations ($92.2 \pm 3.4\%$, $n=5$) ($p < 0.05$). No difference was observed in the potency to SOR or diterpene after CPA, TEA or ODQ treatment.

3.3 Effect of SOR and diterpene on contractions induced by Ca^{2+} influx in arteries stimulated by Phe, Bay K8644 or KCl

In terms of the external Ca^{2+} -induced contraction stimulated by Phe, pre-incubation with SOR reduced the E_{max} values from $127.5 \pm 4.3\%$ ($n=5$) to $60.5 \pm 6.1\%$, $n=6$ ($p < 0.001$) and pre-incubation with diterpene inhibited approximately 80% of the E_{max} ($25.1 \pm 5.4\%$, $n=5$). The treatment with verapamil also presented a statistically significant inhibitory effect on E_{max} ($63.4 \pm 6.04\%$, $n=5$) (Fig. 4A).

As shown in Fig. 4B, the contraction induced by Ca^{2+} influx stimulated by Bay K8644 was almost abolished after pre-incubation with SOR ($12.9 \pm 3.2\%$, $n=5$) or diterpene ($4.6 \pm 0.9\%$, $n=5$) when compared to control preparations ($93.2 \pm 6.8\%$, $n=5$). The verapamil also presented a significant ($p < 0.01$) inhibition in this contraction ($50.8 \pm 13.2\%$, $n=5$).

A marked inhibition of high KCl (10, 20, 30 and 40 mM) stimulated contraction was seen with the SOR pre-treatment ($n=5$), from 0.36 ± 0.12 g, 1.0 ± 0.13 g, 1.44 ± 0.19 g and 1.62 ± 0.25 g, respectively, to 0.05 ± 0.01 g, 0.12 ± 0.02 g, 0.16 ± 0.02 g and 0.18 ± 0.01 g ($n=5$) (Fig. 5). Diterpene incubation reduced the E_{max} values to

0.05±0.01 g, 0.16±0.02 g, 0.36±0.03 g e 0.57±0.03 g (n=5). Pre-treatment with verapamil (n=5) also reduced the E_{max} value to 0.1±0.01 g, 0.2±0.02 g, 0.27±0.03 g and 0.34±0.03 g, respectively. The SOR, diterpene and verapamil values were statistically significant when compared with the control.

3.4 Whole-cell patch-clamp recording

Inward currents were initially recorded using Bay K8644 (1 μM) and Ba^{2+} (20 mM) as the charge carrier in the external solution. In vascular smooth muscle cells (VSMCs), I_{Ba} was evoked by a depolarizing step pulse from the – 50mV holding potential (HP) to + 10 mV at 10 s intervals. Representative current traces, which were obtained using 100 ms depolarizing pulses to + 10 mV, were recorded under control conditions ("i" Fig. 6A; white bar Fig. 6C). The current density through L-type calcium channels decreased from -9.2 ± 1.3 pA/pF (N=9) to -4.6 ± 0.9 pA/pF (N=8, $p < 0.05$) under the diterpene effect ("ii" Fig. 6A; black bar Fig 6C) and after washout ("iii" Fig. 6A; gray bar Fig 6C), it recovered to -5.8 ± 1.2 pA/pF (N=7).

3.5 Molecular Docking

We checked if the isolated diterpene methyl-6 α -acetox-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate enter inside the binding pocket of a previously built LTCC model, kindly provided by Dr. Zhorov [21]. The model was validated by using verapamil, which was docked itself in the same spot that was previously docked on this model, and for which the interactions were already described [21]. Verapamil was the molecule docked as control (Fig. 7B), because it was also the positive control used in our experiments. We found that both compounds methyl-6 α -acetox-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate and verapamil bind to critical hydrophobic amino acid residues of the binding pocket in a similar way (Fig. 7A). In particular, the hydrophobic fused rings of the diterpene and the aromatic rings of verapamil interact with the hydrophobic pocket of the channel formed by Y⁴¹¹, M⁴¹², I⁴¹⁸, and M³¹⁸, and a specific pocket formed by M³¹⁹, F³⁴⁹, F³²², and I⁴¹⁹. These interactions indicated that the presence of the hydrophobic scaffold of methyl-6 α -acetox-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate is important for binding into the binding pocket of the channel. However, the 3-methoxyl groups of the verapamil are making two hydrogen bonds (represented as green dashed lines) with Y⁴¹¹ and Q³⁰¹⁸ residues, while no

hydrogen bond was observed between methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate and the amino acid residues of the channel. The predicted binding affinities of verapamil and methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate were also very close, - 8.7 kcal/mol and - 7.5 kcal/mol, respectively, showing that these two compounds could have similar effect on blocking the channel.

4 DISCUSSION

The major finding of this study was that *Pterodon polygalaeflorus* marked induced vasodilatation in rat isolated aorta by blocking Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle cells. There is no involvement of endothelium or K⁺ channels activation to produce relaxation by membrane hyperpolarization. The Ca²⁺ reuptake by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase after contraction may not be involved in the vasorelaxant action either. Moreover, the effects induced by SOR and its isolated diterpene were totally reversed after successive washings. This observation suggests that the SOR and diterpene have no cytotoxic effect relative to myocyte injury.

Diterpenes with a vouacapan skeleton are responsible for many of the *Pterodon* spp pharmacological activities [7, 15, 32]. Some diterpenes with this skeleton have been identified and isolated from *Pterodon* spp [32]. Moreover, data in the literature have suggested that diterpenes have cardioprotective effects [33-38]. We speculated that these compounds could be involved in the relaxant effect of the SOR.

It has been reported that the *Pterodon* spp. presents relaxant activity in rat trachea and cobaia ileum and this activity could be associated with the Ca²⁺ channel blocking, although no scientific work has effectively shown this [9, 10]. Thus, we believe that the relaxant effect induced by SOR and its constituent diterpene, could occur through the Ca_v1.2 blocking, since both strongly inhibited the contraction induced by Phe, Bay K8644 and KCl.

An increase in calcium intracellular levels leads to the formation of the calcium calmodulin-complex which triggers muscular contraction [39,40]. The calcium influx through cell membrane occurs by voltage and receptor-operated channels. High K⁺-induced contraction is electromechanically mediated by cell membrane depolarization, and then an increase in calcium influx through voltage-operated channels, whereas Phe contraction occurs by calcium influx through booth voltage

and receptor operated channels [39-42]. Previous incubation with SOR and diterpene inhibited contractions stimulated with KCl and Phe. Furthermore, in this study, we observed a relaxant effect of both on KCl and Phe contracted vessels, although a higher inhibitory effect was observed in KCl induced contraction when compared with the $\alpha 1$ -adrenoceptor agonist. These results suggest that SOR and diterpene, like verapamil, are more effective as voltage operated channel blockers than receptor operated ones.

The Phe-induced contraction stimulates Gq/11 protein that acts on phospholipase C leading to IP_3 formation, which stimulates IP_3 receptors in the sarcoplasmic reticulum. This pathway leads to Ca^{2+} release and increases $[Ca^{2+}]_i$ [42]. In order to promote muscle relaxation, the SERCA is activated on the sarcoplasmic reticulum and moves Ca^{2+} from cytoplasm to intracellular stores after contraction [43,44]. When a SERCA inhibitor (CPA) was used, the SOR and diterpene effects were maintained. This result demonstrated that Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum is not involved in those mechanisms.

Natural products have constantly shown the involvement of K^+ channels in their mechanism of vasorelaxation [45]. Several types of K^+ channels have been demonstrated in vascular smooth muscle cell and endothelium [46]. When these channels are opened, a K^+ efflux occurs triggering membrane hyperpolarization, decreasing Ca^{2+} influx through voltage-operated Ca^{2+} channels and vasodilatation occurs [47]. TEA, a non-selective K^+ channel blocker, did not alter the SOR or diterpene-induced vascular relaxation demonstrating that they do not act by opening these channels. Furthermore, a putative SOR/diterpene-induced K^+ opening is unlikely since the compound totally relaxes the contraction induced by KCl 30 mM.

Increases in cytosolic levels of cyclic nucleotide cAMP cause vasodilation by activating protein kinase A (PKA). This activation induces many cellular effects that reduce intracellular Ca^{2+} levels and promote relaxation [47]. The present study revealed that MDL-12,330A (inhibitor of adenylyl cyclase) did not alter the SOR or diterpene-induced vascular relaxation. These results imply that SOR or diterpene-induced relaxation in endothelium-denuded aorta does not involve the cAMP/PKA pathway.

The influential role of soluble guanylyl cyclase in the smooth muscle relaxation, leading to cGMP activation, has been well established [48]. This nucleotide stimulates kinase-dependent cGMP (PKG) that reduces intracellular

calcium $[Ca^{2+}]_i$ in smooth muscle cells and can also act by calcium desensitization of the actin-myosin contractile elements [48,49]. As the SOR relaxant effect was not reduced when endothelium was removed (demonstrating that endothelial release of NO and prostanoids is not involved) and the selective sGC enzyme inhibitor, ODQ, did not inhibit the vascular relaxation, we can exclude the participation of the NO/sGC/cGMP pathway in SOR activity. However, ODQ reduced the maximal relaxation induced by the diterpene which may be due to the involvement of the sGC in diterpene activity. It is difficult to explain the unexpected effect of ODQ on diterpene-induced relaxation. Maybe in high concentrations, this compound is able to activate some intracellular pathways dependent of the sGC. This is an interesting point and more studies should be carried out to explore this possibility.

In order to clarify the *Pterodon* spp. mechanism of action, experiments were done under Ca^{2+} -free conditions. We used the agonist Bay K8644 that specifically activates the voltage operated Ca^{2+} channel in vascular cells. This compound is a dihydropyridine-like nifedipine and binds at the same site [50, 51]. However Bay K8644 potentiates the contractile effects produced by a moderate depolarization induced by KCl [51]. SOR and diterpene strongly inhibited the contraction induced by Bay K8644 providing further evidence of the involvement of Ca^{2+} influx through voltage-operated Ca^{2+} channels. Corroborating this result, when we evaluated the SOR and diterpene effects on contractions induced by increasing concentrations of KCl, that involves Ca^{2+} influx only by voltage-operated Ca^{2+} channels, we observed a strong inhibition of the contraction, suggesting a $Ca_v1.2$ channel blocking. $Ca_v1.2$ is the principal pathway by which Ca^{2+} enters in vascular smooth muscle cells [51]. The patch-clamp results showed that diterpene substantially decreased the Ca^{2+} current through $Ca_v1.2$ in freshly dissociated VSMCs. These results further demonstrate that sucupira diterpene causes vascular relaxation through the inhibition of Ca^{2+} influx by blocking $Ca_v1.2$ channels.

The molecular modeling studies showed that the diterpene could bind to the channel in a similar way that verapamil does, with similar binding affinities and interactions with hydrophobic residues of domains III and IV of the channel. The docking studies utilized Zhorov's model of the LTCC, in which they modeled LTCC inhibition using the phenylalkylamines such as verapamil [21,52]. The binding site of the diterpene was the same of the phenylalkylamines, located in the interface

between the repeats III and IV. Therefore, our molecular model could provide a structural basis to understanding the blocker effect of this compound.

In conclusion, our results report for the first time, the Ca^{2+} influx block induced by *Pterodon polygalaeflorus* on smooth muscle. These results support a possible cardiovascular effect of this specimen through vascular dilatation. This plant or its isolated diterpene are interesting candidates for investigation with a view to developing drugs with cardioprotective actions.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

1. S.S. Lim, T. Vos, A.D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, et al., A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet* 380 (2012) 2224-2260.
2. P.M. Kearney, M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P.K. Whelton, J. He, Global burden of hypertension: analysis of worldwide data, *Lancet* 365 (2005) 217-223.
3. A.T. Pimenta, G.M.P. Santiago, A.M.C. Arriaga, G.H.A. Menezes, S.B. Bezerra, Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(4) (2006) 501-505.

4. M.G. Pinto Coelho, P.R. Marques, C.R. Gayer, L.C. Vaz, J.F. Neto, K.C. Sabino, Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis, *J. Ethnopharmacol.* 77 (2001) 159-164.
5. C. Nucci, L. Mazzardo-Martins, J. Stramosk, L.C. Brethanha, M.G. Pizzolatti, A.R. Santos, et al., Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain, *J. Ethnopharmacol.* 143 (2012) 170-178.
6. L.P. Coelho, P.A. Reis, F.L. de Castro, C.R. Gayer, C. da Silva Lopes, M.C. da Costa e Silva, et al., Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth seeds, *J. Ethnopharmacol.* 98 (2005) 109-116.
7. J.C.T. Carvalho, J.A.A. Sertié, M.V.J. Barbosa, K.C.M. Patrício, L.R.G. Caputo, S.J. Sarti, et al., Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vogel, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1999) 127-133.
8. J. Hoscheid, C.A. Bersani-Amado, B.A. da Rocha, P.M. Outuki, M.A.R.C.P. da Silva, D.L. Froehlich, et al., Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. *Evid Based Complement. Alternat. Med.* 2013 (2013) 272795-272802.
9. G.L. Evangelista, A.N. Coelho-de-Souza, C.F. Santos, J.H. Leal-Cardoso, E.A. Lopes, M.V. dos Santos, et al., Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 515-522.
10. V. Leonhardt, J.H. Leal-Cardoso, S. Lahlou, A.A.C. Albuquerque, R.S. Porto, N.R. Celedônio, et al., Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24 (2010) 749-758.
11. R. Braz-Filho, O.R. Gottlieb, R.M. Viegas Assumpção, The isoflavones of *Pterodon pubescens*, *Phytochemistry* 10 (1971) 2835-2836.

12. J.R. Mahajan, M.B. Monteiro, New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 5 (1973) 520-525.
13. M. Fascio, W.B. Mors, B. Gilbert, J.R. Mahajan, M.B. Monteiro, D.D.S. Filho, et al., Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry* 15 (1976) 201-203.
14. A.M. Campos, E.R. Silveira, R. Braz-Filho, T.C. Teixeira, Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*, *Phytochemistry* 36 (1994) 403-406.
15. V.J. Belinelo V.J., Reis G.T., Stefani G.M., Ferreira-Alves D.L., Piló-Veloso D, Synthesis of 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oic acid derivatives. Part IV: mannich base derivatives and its activities on the electrically stimulated Guinea-pig ileum preparation, J. Braz. Chem. Soc. 13 (2002) 830-837.
16. E.H. Baker, Ion channels and the control of blood pressure, Br. J. Clin. Pharmacol. 49 (2000) 185-198.
17. E. Ihara, J.A. MacDonald, The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase, Can. J. Physiol. Pharmacol. 85 (2007) 79-87.
18. L.Z.C. Martins de Sá, P.F.S. Castro, F.M.A. Lino, M.J.C. Bernardes, J.C.J. Viegas, T.C.P. Dinis, et al, Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*), J. Funct. foods 8 (2014) 169–179
19. L.A.R. Oliveira, Furanoditerpenes isolation and evaluating biological activities of the sucupira oil-resin (*Pterodon* spp Vog. Fabaceae), [MSc Thesis in Pharmaceutical Sciences], Goiânia, Federal University of Goiás, School of Pharmacy, 2014.
20. J.F. Pinho, M.A. Medeiros, L.S. Capettini, B.A. Rezende, P.P. Campos, S.P. Andrade, et al., Phosphatidylinositol 3-kinase-delta up-regulates L-type Ca^{2+} currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes, Br. J. Pharmacol. 161 (2010) 1458-1471.
21. R.C. Cheng, D.B. Tikhonov, B.S. Zhorov, Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium Channel, J. Biol. Chem. 284 (2009) 28332-28342.

22. J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, M. Uchimaya, Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 681-691.
23. K.S. Watts, P. Dalal, R.B. Murphy, W. Sherman, R.A. Friesner, J.C. Shelley, ConfGen: a conformational search method for efficient generation of bioactive conformers, *J. Chem. Inf. Model.* 50 (2010) 534-546.
24. J.L. Banks, H.S. Beard, Y. Cao, A.E. Cho, W. Damm, R. Farid, et al., Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT), *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1752-1780.
25. G.H. Hockerman, B.D. Johnson, M.R. Abbott, T. Scheuer, W.A. Catterall, Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18759-18765.
26. S. Hering, S. Aczel, R.L. Kraus, S. Berjukow, J. Striessnig, E.N. Timin, Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (1997) 13323-13328.
27. N. Dilmac, N. Hilliard, G.H. Hockerman, Molecular determinants of frequency dependence and Ca²⁺ potentiation of verapamil block in the pore region of Cav1.2, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 1236-1247.
28. F. Doring, V.E. Degtiar, M. Grabner, J. Striessnig, S. Hering, H. Glossman, Transfer of L-type calcium channel IVS6 segment increases phenylalkylamine sensitivity of alpha1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11745-11749.
29. I.G. Huber, E. Wappl-Kornherr, M.J. Sinnegger-Brauns, J.C. Hoda, D. Walter-Bastl, J. Striessnig, Opposite effects of a single IIIS5 mutation on phenylalkylamine and dihydropyridine interaction with L-type Ca²⁺ Channel, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 55211-55217.

30. R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, et al., Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739-1749.
31. M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 11 (1997) 425-445.
32. H.M. Spindola, J.E.D. Carvalho, A.L.T.G. Ruiz, R.A.F. Rodrigues, C. Denny, I.M.D.O. Sousa, et al., Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 569-575.
33. M.C. Silva, C.R. Gayer, C.S. Lopes, N.O. Calixto, P.A. Reis, C.P. Passaes, et al., Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 135-141.
34. C.N. Lee, K.L. Wong, J.C. Liu, Y.J. Chen, J.T. Cheng, P. Chan, Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension, *Planta Med.* 67 (2001) 796-799.
35. C.R. Tirapelli, S.R. Ambrosio, F.B. da Costa, A.M. de Oliveira, Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid constriction, *Fitoterapia* 73 (2002) 56-62.
36. S. El Bardai, N. Morel, M. Wibo, N. Fabre, G. Llabres, B. Lyoussi, et al., The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*, *Planta Med.* 69 (2003) 75-77.
37. U.V. Hipólito, G.J. Rodrigues, C.N. Lunardi, D. Bonaventura, S.R. Ambrosio, A.M. de Oliveira, et al., Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3 β -ol in the isolated rat aorta, *Eur. J. Pharmacol.* 616 (2009) 183-191.
38. J.A. Simplicio, L. Pernomian, M.R. Simao, E.C. Carnio, M.E. Batalhao, S.R. Ambrosio, et al., Mechanisms underlying the vascular and hypotensive actions of the

labdane ent-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid, *Eur. J. Pharmacol.* 726 (2014) 66-76.

39. R.E. Eckert, A.J. Karsten, J. Utz, M. Ziegler, Regulation of renal artery smooth muscle tone by α 1-adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores, *Urol. Res.* 28 (2000) 122-127.

40. A.V. Somlyo, A.P. Somlyo, Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159 (1968) 129-145.

41. T. Godfraind, A. Kaba, Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle, *Br. J. Pharmacol.* 36 (1969) 549-560.

42. C.H. Lee, D. Poburko, P. Sahota, J. Sandhu, D.O. Ruehlmann, C. van Breemen, The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava, *J. Physiol.* 534 (2001) 641-650.

43. A.V. Somlyo, M. Bond, A.P. Somlyo, A. Scarpa, Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 (1985) 5231-5235.

44. E. Carafoli, Intracellular calcium homeostasis, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 395-433.

45. J.R. McNeill, T.M. Jurgens, A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 (2006) 803-821.

46. E.A. Ko, J. Han, I.D. Jung, W.S. Park, Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells, *J. Smooth Muscle Res.* 44 (2008) 65-81.

47. M.T. Nelson, J.M. Quayle, Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle, *Am. J. Physiol - Cell Physiol.* 268 (1995) C799-C822.

48. T.S. Brito, F.J. Lima, K.S. Aragao, R.J. de Siqueira, P.J. Sousa, J.G. Maia, et al., The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway, *Biochem. Pharmacol.* 85 (2013) 780-788.
49. J. Schlossmann, R. Feil, F. Hofmann, Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases, *Ann. Med.* 35 (2003) 21-27.
50. C.F. Michiels, C.E. Van Hove, W. Martinet, G.R. de Meyer, P. Fransen, L-type Ca^{2+} channel blockers inhibit the window contraction of mouse aorta segments with high affinity, *Eur. J. Pharmacol.* 738 (2014) 170-178.
51. L. Lacinova, Voltage-dependent calcium Channel, *Gen. Physiol. Biophys.* 24 (2005) 1-78.
52. D.B. Tikhonov, B.S. Zhorov, Molecular modeling of benzothiazepine binding in the L-type calcium channel, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17594-17604.

Figures

Fig.1. Structure of methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate.

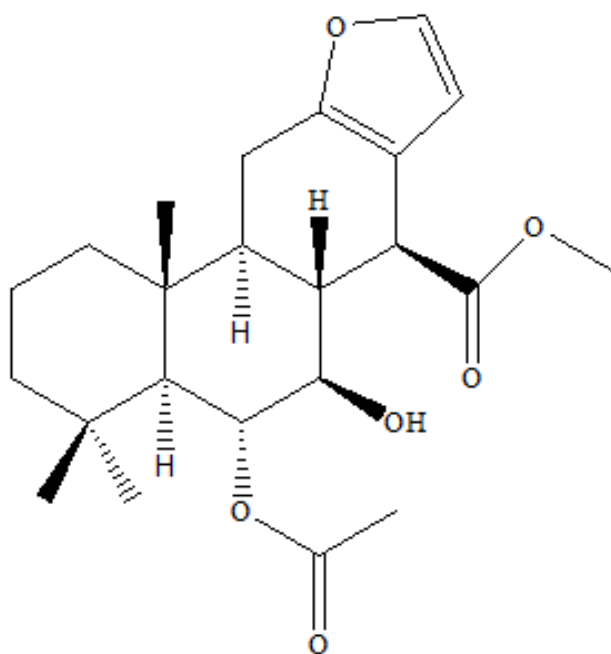


Fig. 2. Effect of SOR, diterpene and verapamil- induced relaxation in endothelium intact (E+) and denuded (E-) aortic rings. **(A)** Cumulative concentration-response curves for SOR E+/E- pre-contracted with phenylephrine or KCl E-; **(B)** Cumulative concentration-response curves for diterpene E+/E- pre-contracted with phenylephrine or KCl E-; **(C)** Effect of verapamil induced relaxation E+/E- rings pre-contracted with phenylephrine or KCl E-. The data points represent mean $\pm$ S.E.M. of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference $*p<0.05$ (KCl E- vs. Phenylephrine E-).

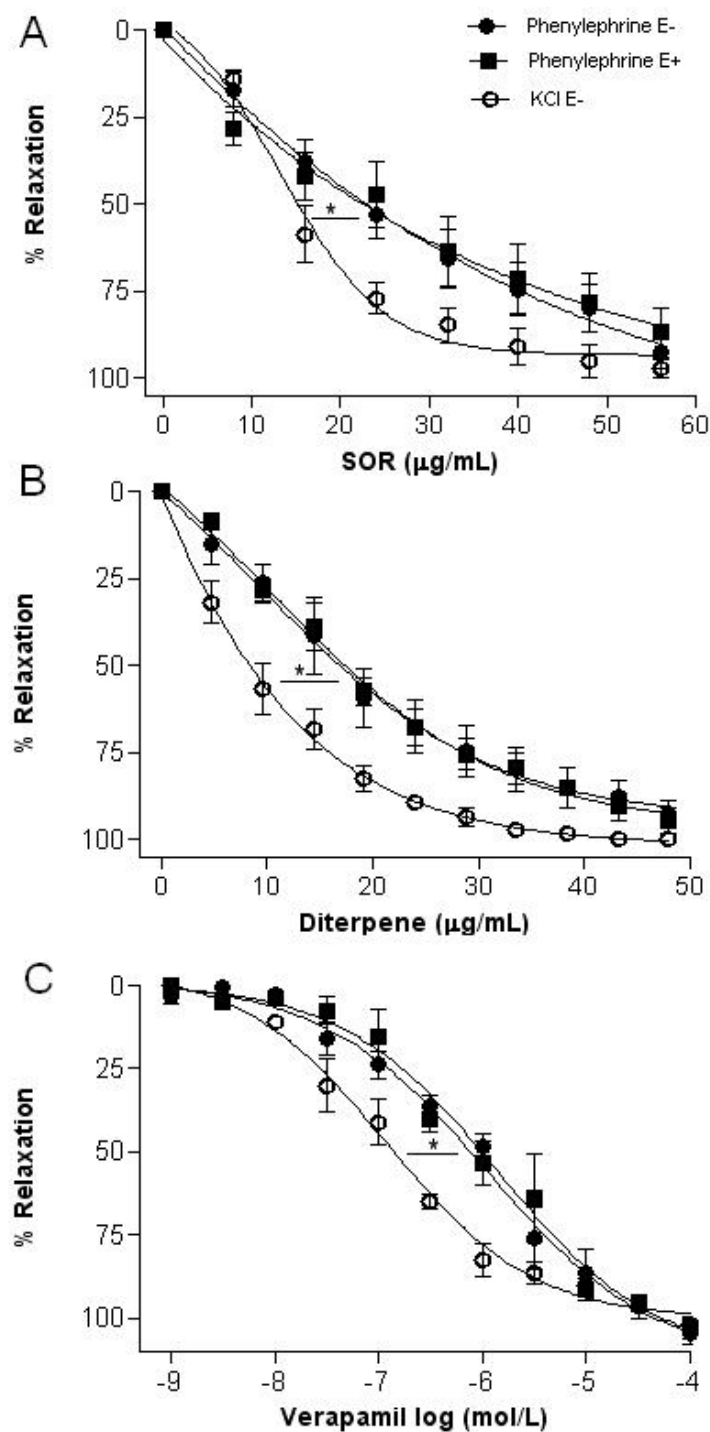


Fig. 3. Concentration-response curves for SOR (**A**) or diterpene (**B**) in the absence or presence (30 min) of cyclopiazonic acid (CPA, 10 μ M), tetraethylammonium (TEA, 5 mM), ODQ (1 μ M) or MDL-12,300A (10 μ M) in endothelium-denuded rings pre-contracted with phenylephrine. The data points represent mean $\pm$ S.E.M. of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference * $p < 0.05$ compared to control.

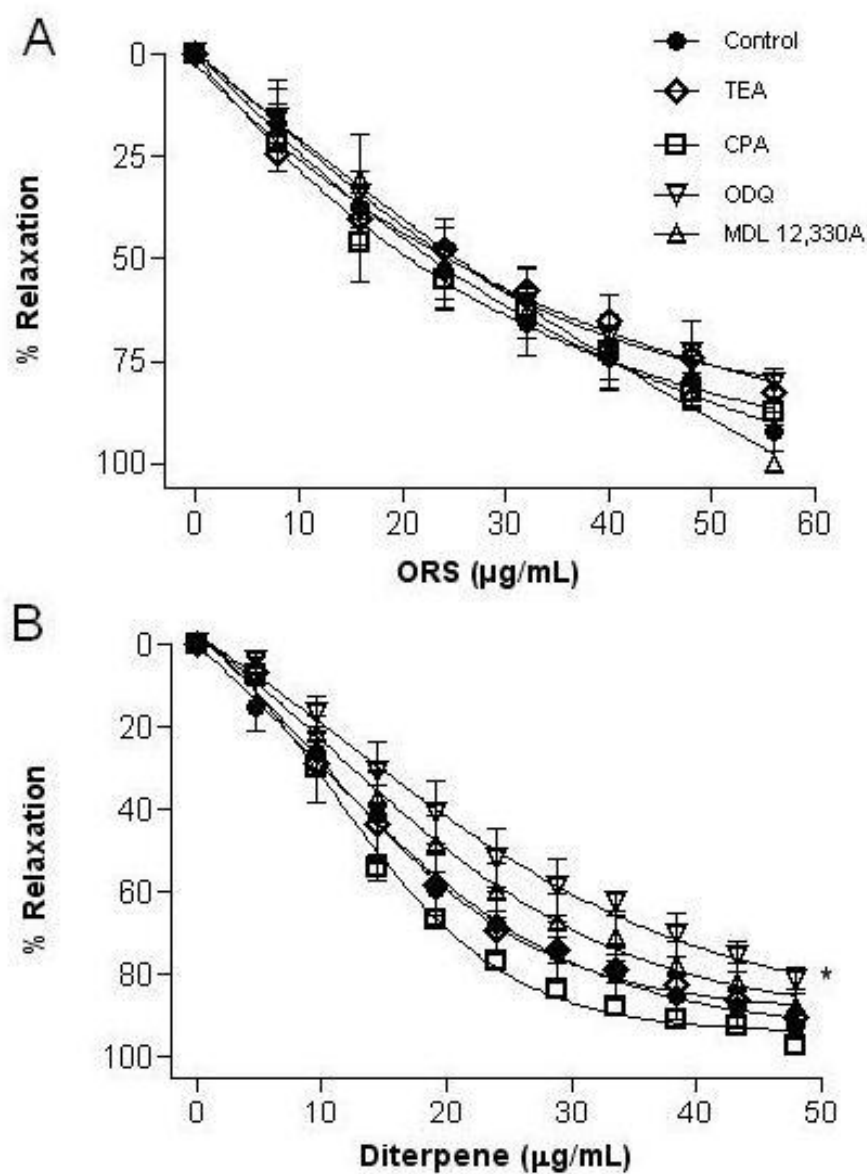


Fig. 4. Effect of SOR, diterpene or verapamil on CaCl_2 induced contractile response in endothelium-denuded rings. Concentration-response curves for CaCl_2 were stimulated by phenylephrine (**A**) or Bay K8644 (**B**) under control conditions or after 30 min incubation with SOR (28 $\mu\text{g/mL}$), diterpene (16 $\mu\text{g/mL}$) or verapamil (0.3 μM). The data points represent mean $\pm$ S.E.M. of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control.

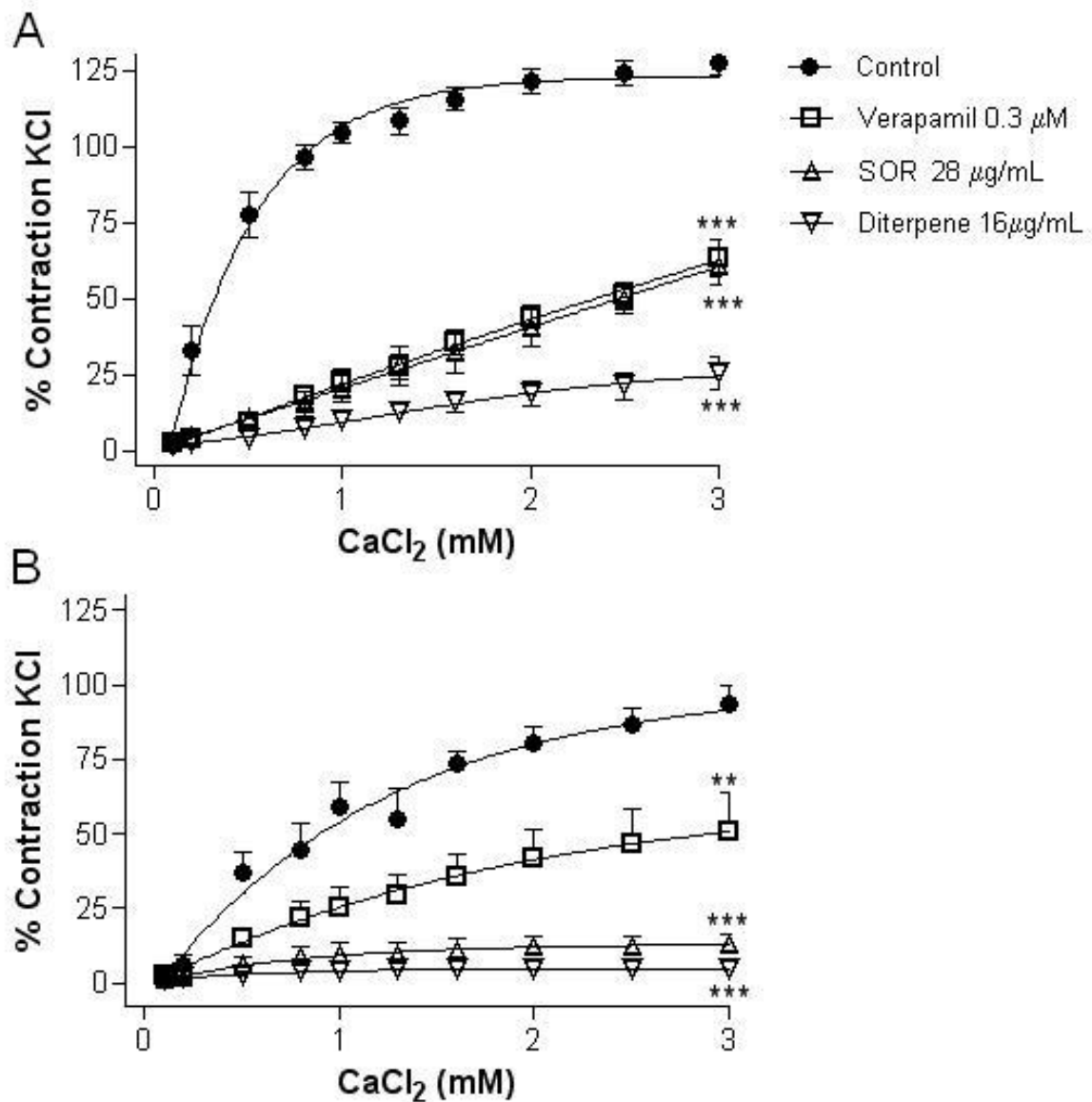


Fig. 5. Effect of SOR, diterpene or verapamil on KCl-induced contraction in endothelium-denuded rings. Concentration-response curves were generated under control conditions or after 30 min incubation with SOR (16 $\mu\text{g/mL}$ $n=5$), diterpene (9.6 $\mu\text{g/mL}$ $n=5$) or verapamil (0.3 μM $n=5$) and stimulated by KCl (10, 20, 30 and 40 Mm). The data points represent mean $\pm$ S.E.M. of the relaxing effect expressed as a percentage. Significant difference * $p<0.05$; *** $p<0.001$ compared to control.

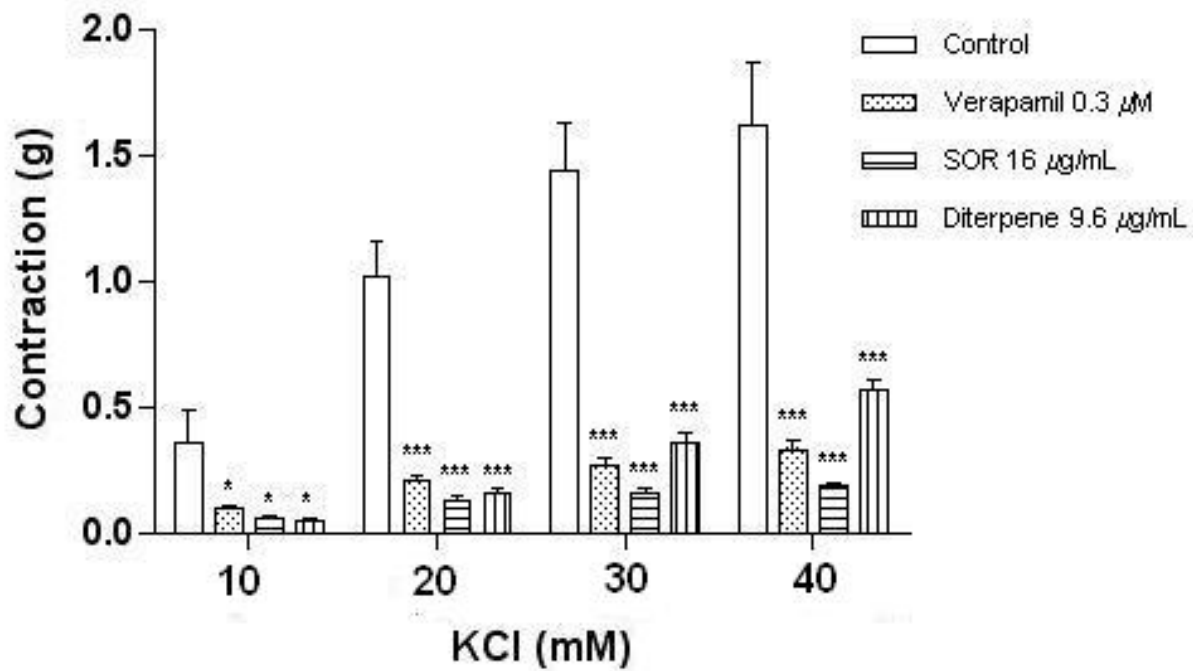


Fig. 6. Effect of diterpene on current through L type calcium channel. **A.** Representative recordings of I_{Ca} in isolated arterial smooth muscle cells. Control (i), during drug (diterpene) effect (36 $\mu\text{g/mL}$) (ii) and after washout (iii). **B.** Time course from calcium current density with and without the diterpene. **C.** Current density (averaged data). The bar graphs show the mean $\pm$ S.E.M. of current density with significance indicated as * $p < 0.05$.

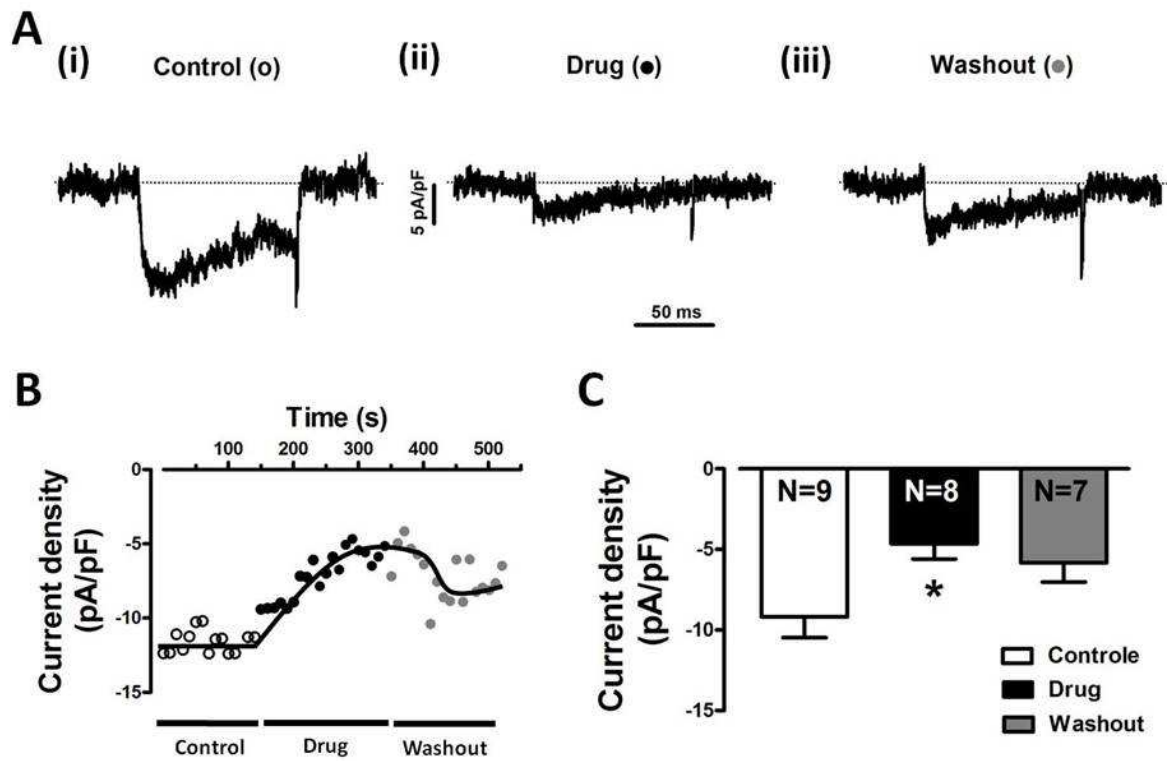
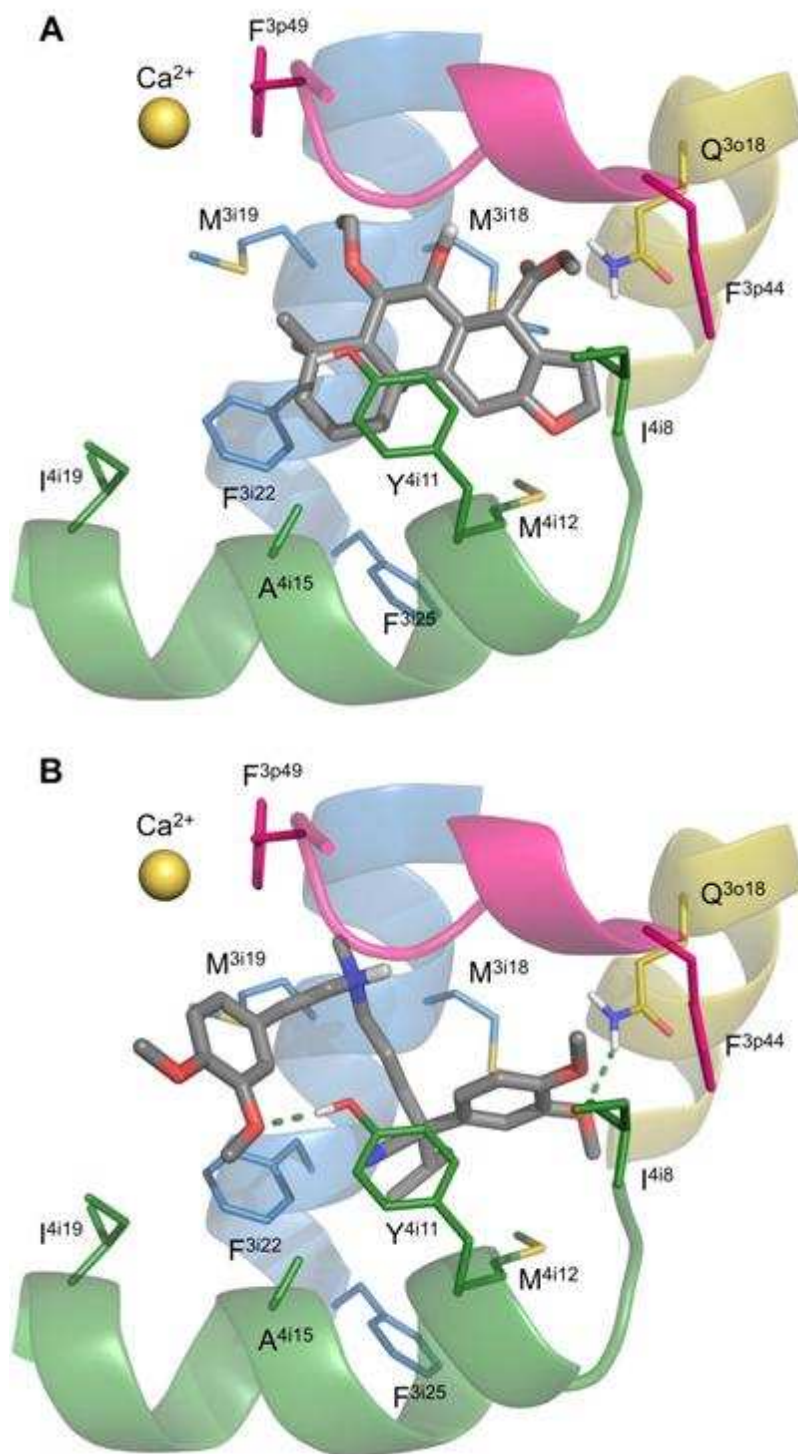


Fig. 7. Orientation of methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate (**A**) and verapamil (**B**) in the active site of the Ca_v1.2 model. Secondary structure of channel colored by blue, green, magenta, and yellow represents IIIS6, IVS6, IIIP, and IIIS5 segments, respectively. The residue labels were classified according to domain number (1 to 4), segment type (p, P-loop; i, the inner helix; o, the outer helix), and relative number of the residues in the segment. Ca²⁺ ion is shown as a yellow sphere.



6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o oleorresina extraído de *Pterdon* spp.Vogel (Fabaceae), popularmente conhecida como sucupira, possui atividade vasodilatadora em aorta de ratos por possível bloqueio de $Ca_v1.2$.

Uma vez que foram identificados diterpenos com esqueleto vouacapano em sua constituição fitoquímica, buscando-se uma possível correlação do efeito do ORS com um composto responsável por seu efeito vasodilatador, avaliamos a atividade *in vitro* do diterpeno 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila, que foi isolado e identificado a partir do ORS. Os resultados encontrados para o ORS se repetem e o diterpeno isolado tem efeito sobre o bloqueio de $Ca_v1.2$. Estudos de *patch-clamp* e *docking* foram comprobatórios sobre os efeitos do diterpeno sobre $Ca_v1.2$, dado que foi demonstrado pela substancial diminuição da corrente iônica através $Ca_v1.2$ em células de músculo liso vascular e interação da molécula do diterpeno com sítios ativos da proteína do canal, respectivamente.

Não há envolvimento do endotélio, canais para potássio e recaptação de cálcio pelo RS na atividade vasorrelaxante induzida pelo ORS e diterpeno. Os nossos achados sugerem que o ORS ou o diterpeno não promovem danos ao músculo liso vascular, uma vez que a maquinaria contrátil está preservada após exposição dos mesmos ao tecido vascular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2012. 1335.

AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. **Microcirculation**, v. 20, p. 281-289, 2013.

AMBROSIO, S. R. et al. Pimarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 484-9, 2002.

BACCELLI, C. et al. Vasorelaxant activity of diterpenes from *Croton zambesicus* and synthetic trachylobanes and their structure-activity relationships. **J Nat Prod**, v. 70, n. 6, p. 910-7, 2007.

BANKS, J. L. et al. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). **J Comput Chem**, v. 26, n. 16, p. 1752-80, 2005.

BELINELO, V. J. et al. Synthesis of 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oic acid derivatives. Part IV: mannich base derivatives and its activities on the electrically stimulated Guinea-pig ileum preparation. **J Braz Chem Soc**, v. 13, p. 830-837, 2002.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 844

BHAT, S. V. et al. The antihypertensive and positive inotropic diterpene forskolin: effects of structural modifications on its activity. **J Med Chem**, v. 26, n. 4, p. 486-92, 1983.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BRASIL. **Prevalência de hipertensão arterial**. (DATASUS), M. D. S. D. I. D. S. Ú. D. S. 2012.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; VIEGAS, A., R. M. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 11, p. 2835-2836, 1971.

BREEMEN, C. V.; SAIDA, K. Cellular Mechanisms Regulating $[Ca^{2+}]_i$ Smooth Muscle. **Annu Rev Physiol**, v. 51, n. 1, p. 315-329, 1989.

CAMPOS, A. M. et al. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 403-406, 1994.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 395-433, 1987.

CARVALHO, J. C. T. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **J Ethnopharmacol**, v. 64, n. 2, p. 127-133, 1999.

CHAN, P. et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **Brit J Clin Pharmacol** v. 50, n. 3, p. 215-220, 2000.

CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **Br J Pharmacol**, v. 95, n. 4, p. 1165-74, 1988.

CHENG, R. C.; TIKHONOV, D. B.; ZHOROV, B. S. Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. **J Biol Chem**, v. 284, n. 41, p. 28332-42, 2009.

CHERRY, P. D. et al. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 79, n. 6, p. 2106-2110, 1982.

CHOBANIAN, A. V. et al. Joint National Committee on Prevention DE, Treatment of High Blood Pressure. National Heart L, Blood I, National High Blood Pressure Education Program Coordinating C. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206–1252, 2003.

COELHO, L. P. et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 98, n. 1-2, p. 109-16, 2005.

COSTA, C. A. et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 385, n. 12, p. 1199-1209, 2012.

DEN HERTOOG, A.; PIELKENROOD, J.; VAN DEN AKKER, J. The effect of forskolin on smooth muscle cells of guinea-pig taenia caeci. **Eur J Pharmacol**, v. 106, n. 1, p. 181-4, 1984.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: Terpenoids and steroids In: (Ed.). **Medicinal Natural Products – a biosynthetic approach**. Chennai, India: Wiley e Sons Ltd, cap. 5, p. 187. 2009.

DILMAC, N.; HILLIARD, N.; HOCKERMAN, G. H. Molecular determinants of frequency dependence and Ca^{2+} potentiation of verapamil block in the pore region of Cav1.2. *Mol Pharmacol*, v. 66, n. 5, p. 1236-47, 2004.

DORING, F. et al. Transfer of L-type calcium channel IVS6 segment increases phenylalkylamine sensitivity of α_1A . *J Biol Chem*, v. 271, n. 20, p. 11745-9, 1996.

ECKERT, R. E. et al. Regulation of renal artery smooth muscle tone by α_1 -adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores. *Urol Res*, v. 28, n. 2, p. 122-127, 2000.

EL-BARDAI, S. et al. Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *Br J Pharmacol*, v. 140, n. 7, p. 1211-6, 2003.

EL BARDAI, S. et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med*, v. 69, n. 1, p. 75-7, 2003.

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des*, v. 11, n. 5, p. 425-45, 1997.

ERNST, E. Complementary/alternative medicine for hypertension: a mini-review. *Wien Med Wochenschr*, v. 155, n. 17-18, p. 386-91, 2005.

EUZEBIO, F. P. et al. Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorg Chem*, v. 37, n. 3, p. 96-100, 2009.

EUZÉBIO, F. P. G. et al. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid Mannich base derivatives. *Bioorgan Med Chem*, v. 18, n. 23, p. 8172-8177, 2010.

EVANGELISTA, G. L. et al. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. *J Ethnopharmacol*, v. 109, n. 3, p. 515-22, 2007.

FASCIO, M. et al. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry*, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1976.

FLEENOR, B. S. et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp Gerontol*, v. 48, n. 2, p. 269-76, 2013.

FORSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121-31, 1994.

FORSTERMANN, U.; HERTTING, G.; NEUFANG, B. The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. **Br J Pharmacol**, v. 87, n. 3, p. 521-32, 1986.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*, v. 47, n. 7, p. 1739-49, 2004.

FRISHMAN, W. H.; GRATTAN, J. G.; MAMTANI, R. Alternative and complementary medical approaches in the prevention and treatment of cardiovascular disease. **Curr Probl Cardiol**, v. 30, n. 8, p. 383-459, 2005.

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

GALCERAN, C. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 139-143, 2011.

HERING, S. et al. Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 24, p. 13323-8, 1997.

HIPÓLITO, U. V. et al. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3 β -ol in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 183-191, 2009.

HIRANO, K. et al. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. **Mol Cell Biochem**, v. 248, n. 1-2, p. 105-14, 2003.

HOCKERMAN, G. H. et al. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the α 1 subunit. *J Biol Chem*, v. 272, n. 30, p. 18759-65, 1997.

HOMAR, J. C. ¿Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, n. 8, p. 389-391, 2005.

HOSCHEID, J. et al. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 7, 2013.

HSIEH, M. H. et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. **Clin Ther**, v. 25, n. 11, p. 2797-808, 2003.

HUBER, I. G. et al. Opposite effects of a single IIIS5 mutation on phenylalkylamine and dihydropyridine interaction with L-type Ca²⁺ channels. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55211-7, 2004.

IGNARRO, L. J. et al. Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 233, n. 3, p. 560-9, 1985.

IHARA, E.; MACDONALD, J. A. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 1, p. 79-87, 2007.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat Prod Rep**, v. 28, n. 4, p. 809-823, 2011.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000.

KEARNEY, P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-23, 2005.

KIM, J. H. et al. *Aronia melanocarpa* juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 54-64, 2013.

KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **J Smooth Muscle Res**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

LAHLOU, S. et al. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. **Vascul Pharmacol**, v. 46, n. 1, p. 60-6, 2007.

LANNOY, M.; SLOVE, S.; JACOB, M. P. The function of elastic fibers in the arteries: Beyond elasticity. *Pathologie Biologie*, v. 62, n. 2, p. 79-83, 2014.

LEE, C. N. et al. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med*, v. 67, n. 9, p. 796-9, 2001.

LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 24, n. 6, p. 749-758, 2010.

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, v. 380, n. 9859, p. 2224-60, 2012.

LINCOLN, T. M.; FISHER-SIMPSON, V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*, v. 101, n. 1-2, p. 17-27, 1984.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Plantarum, 2008. 512.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, n. 0, p. 520-525, 1973.

MANCIA, G. et al. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*, v. 31, n. 10, p. 1925-38, 2013.

MARTINSEN, A. et al. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. *Vascul Pharmacol*, v. 52, n. 1-2, p. 63-9, 2010.

MELIS, M. S.; SAINATI, A. R. Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside. *J Ethnopharmacol*, v. 33, n. 3, p. 257-62, 1991.

MENDES, L. J. et al. Endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxant effect of isotirumalin, a dihydroflavonol from *Derris urucu*, on the rat aorta. *Biol Pharm Bull*, v. 34, n. 9, p. 1499-500, 2011.

MICHIELS, C. F. et al. L-type Ca^{2+} channel blockers inhibit the window contraction of mouse aorta segments with high affinity. **Eur J Pharmacol**, v. 738, p. 170-8, 2014.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb Res**, v. 11, n. 3, p. 323-44, 1977.

MOOSMANG, S. et al. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ for blood pressure regulation. **EMBO J**, v. 22, n. 22, p. 6027-34, 2003.

MORAES, W. F. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Pterodon emarginatus* stem bark alcohol extract. **Pharm Biol** v. 47, n. 2, p. 146-150, 2009.

MORGADO, M. et al. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 2, p. 247-266, 2012.

MURTADA, S.-I.; HOLZAPFEL, G. A. Investigating the role of smooth muscle cells in large elastic arteries: A finite element analysis. **J Theor Biol**, v. 358, n. 0, p. 1-10, 2014.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J physiol - Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799-C822, 1995.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 170-8, 2012.

OLIVEIRA, A. P. et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 338-44, 2006.

OLIVEIRA, L. A. R. **Isolamento, quantificação e avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida de furanoditerpenos do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae)**. 2014. 120 p Dissertação de Mestrado (Mestre). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacol Ther**, v. 69, n. 3, p. 153-71, 1996.

PASSOS, V. M. A.; ASSIS, T. D.; BARRETO, S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 15, n. 1, p. 35-45, 2006.

PAULA, F. B. et al. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 5, p. 17, 2005.

PELINO, C. J.; PIZZIMENTI, J. J. Essentials of hypertension: high blood pressure remains a major health issue worldwide, with profound--and often silent--multisystemic effects.(effect of hypertension in ocular physiology). **Review of Optometry**, v. 151, n. 9, p. 88, 2014.

PEREIRA, M. F. et al. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 231, 2012.

PIMENTA, A. T. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvícida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. Phytotochemical study and evaluation of larvicidal activity of *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) against *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 4, p. 501, 2006.

PINTO COELHO, M. G. et al. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **J Ethnopharmacol**, v. 77, n. 2-3, p. 159-64, 2001.

RICHARD, S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. **Drugs**, v. 65 Suppl 2, p. 1-10, 2005.

SABINO, K. C. et al. In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicol Lett**, v. 108, n. 1, p. 27-35, 1999.

SANCHEZ-PASTOR, E. et al. Cannabinoid receptor type 1 activation by arachidonylcyclopropylamide in rat aortic rings causes vasorelaxation involving calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 and calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit. **Eur J Pharmacol**, v. 729, p. 100-6, 2014.

SBH. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão**. Brasil: Sociedade Brasileira de Hipertensão, Arq Bras Cardiol: 51 p. 2010.

SCHINI, V. B.; VANHOUTTE, P. M. L-arginine evokes both endothelium-dependent and -independent relaxations in L-arginine-depleted aortas of the rat. **Circ Res**, v. 68, n. 1, p. 209-16, 1991.

SCHLOSSMANN, J.; FEIL, R.; HOFMANN, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann Med**, v. 35, n. 1, p. 21-7, 2003.

SEIDELMANN, S. B.; LIGHTHOUSE, J. K.; GREIF, D. M. Development and pathologies of the arterial wall. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 11, p. 1977-1999, 2014.

SERVIER. Servier Medical Art – Powerpoint Image Bank. Acesso em: 04/11/2014.

SHELLEY, J. C. et al. Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J Comput Aided Mol Des*, v. 21, n. 12, p. 681-91, 2007.

SHIMOKAWA, H. et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 28, n. 5, p. 703-11, 1996.

SILVA, I. H. et al. Effect the sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) extract on the development of plant pathogenic fungi and bacteria. **Pesqui Agropecu Trop**, v. 35, n. 2, p. 109, 2007.

SILVA, M. C. et al. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 135-41, 2004.

SIMPLICIO, J. A. et al. Mechanisms underlying the vascular and hypotensive actions of the labdane ent-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid. **Eur J Pharmacol**, v. 726, p. 66-76, 2014.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiol Scand**, v. 164, n. 4, p. 437-48, 1998.

SOMLYO, A. P. S. A. V. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiol Rev**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. V. et al. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 15, p. 5231-5, 1985.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 159, n. 1, p. 129-45, 1968.

SOOD, N.; REINHART, K. M.; BAKER, W. L. Combination therapy for the management of hypertension: A review of the evidence. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 67, p. 885-894, 2010.

SPINDOLA, H. M. et al. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **J Braz Chem Soc**, v. 20, p. 569-575, 2009.

SPINDOLA, H. M. et al. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 656, n. 1-3, p. 45-51, 2011.

TIRAPELLI, C. R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 492, n. 2-3, p. 233-41, 2004.

TIRAPELLI, C. R. et al. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 56-62, 2002.

TIRAPELLI, C. R. et al. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 690-702, 2010.

TIRAPELLI, C. R. et al. Pimaradienoic acid inhibits vascular contraction and induces hypotension in normotensive rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 453-9, 2008.

VIEIRA, C. R. et al. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 528-32, 2008.

WATTS, K. S. et al. ConfGen: a conformational search method for efficient generation of bioactive conformers. **J Chem Inf Model**, v. 50, n. 4, p. 534-46, 2010.

WEI, D.; HE, W. Y.; LV, Q. Z. Effect of nisoldipine and olmesartan on endothelium-dependent vasodilation in essential hypertensive patients. **CNS Neurosci Ther**, v. 18, n. 5, p. 400-5, 2012.

WHO. **Causes of Death 2008 [online database]**. Geneva 2008.

_____. **A global brief on Hypertension. World Health Day [online database]** 2013.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Mol Cell Endocrinol**, v. 177, n. 1–2, p. 135-143, 2001.

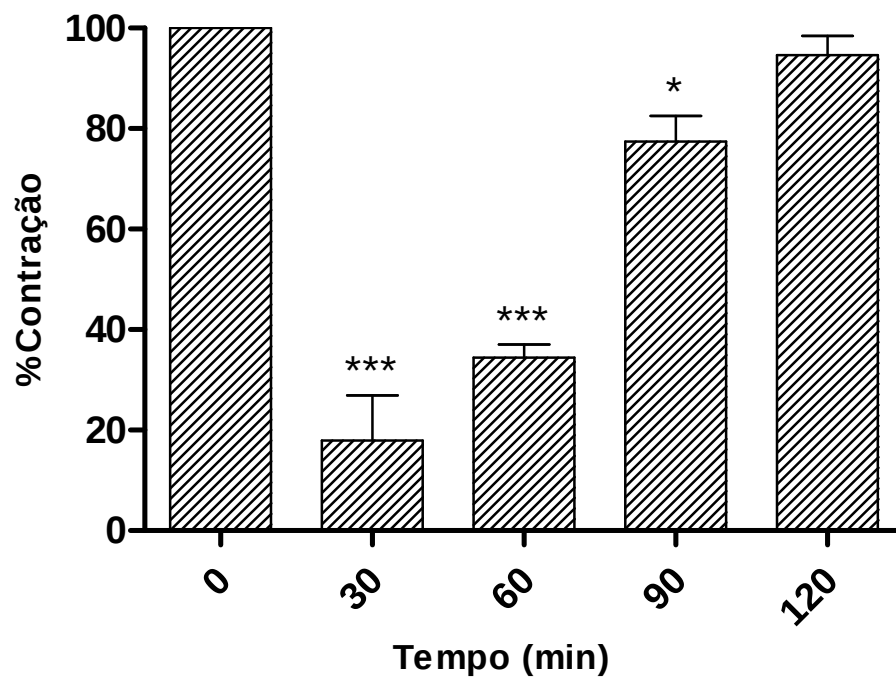
XIONG, X. et al. Chinese herbal formulas for treating hypertension in traditional Chinese medicine: perspective of modern science. **Hypertens Res**, v. 36, n. 7, p. 570-9, 2013.

APÊNDICE

A - Efeito da inibição da contração induzida pelo ORS em aortas isoladas.

A figura 5 mostra que o efeito vasorrelaxante obtido para o ORS não advém de injúria sobre miócitos uma vez que o teste de reversibilidade indicou que o efeito inibitório sobre a contração foi revertido após 120 minutos da remoção do ORS da solução do banho sob constante lavagem com solução de Krebs e estimulação com fenilefrina.

Figura 5. Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório do ORS sobre a contração induzida por fenilefrina.

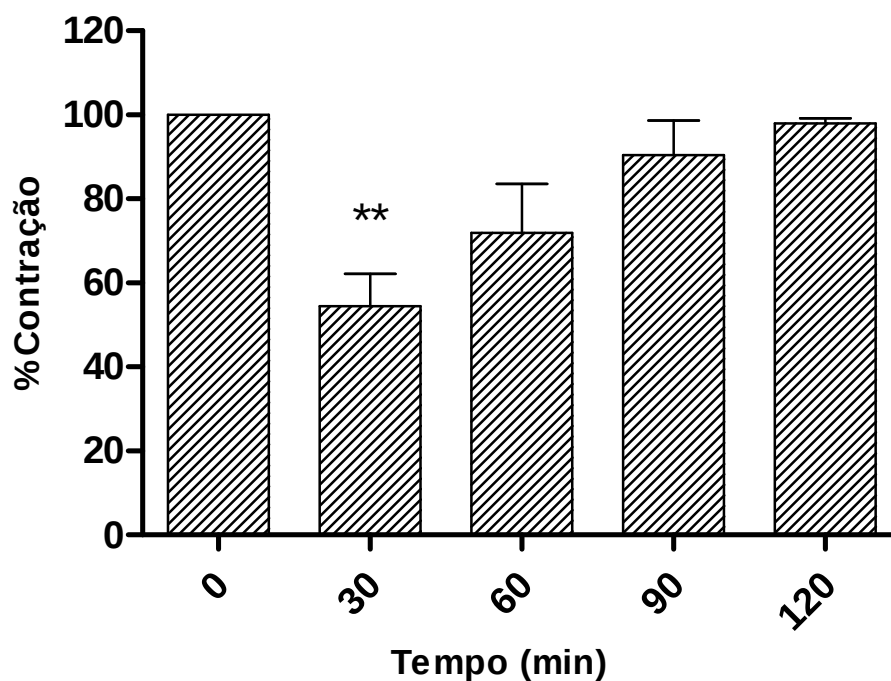


Preparações E+ (n=3) foram contraídas com fenilefrina nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min após exposição das preparações ao ORS.* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

B - Efeito da inibição da contração induzida pelo diterpeno isolado em preparações isoladas.

A figura 6 mostra que o efeito vasorrelaxante obtido para o diterpeno isolado não advém de injúria sobre miócitos uma vez que o teste de reversibilidade indicou que o efeito inibitório sobre a contração foi revertido após 30 minutos da remoção do composto da solução do banho de órgãos isolado sob constante lavagem com solução de Krebs e estimulação com fenilefrina.

Figura 6. Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório do diterpeno isolado sobre a contração induzida por fenilefrina.

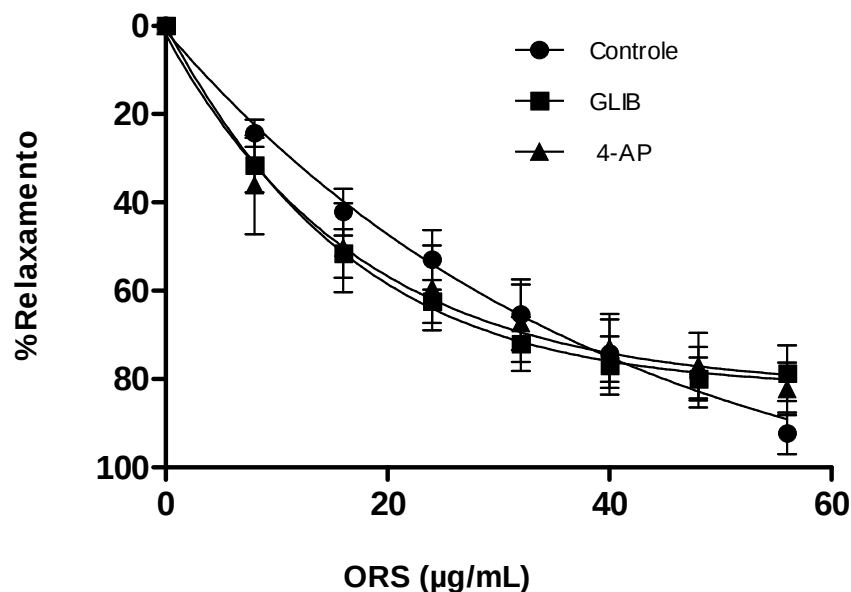


Preparações E+ (n=3) foram contraídas com fenilefrina nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min após exposição ao diterpeno isolado. ** $p < 0,01$.

C - Efeito dos bloqueadores seletivos de canais para K^+ - Glib e 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo ORS em aortas isoladas.

A figura 7 demonstra que preparações E- incubadas com Glib ($E_{MÁX}$ $78,78 \pm 6,29\%$) não tiveram alteração da atividade vasorrelaxante induzida pelo ORS quando comparada a preparações que não foram submetidas ao inibidor ($E_{MÁX}$ $92,35 \pm 4,71\%$). Da mesma forma, preparações submetidas ao inibidor específico 4-AP ($E_{MÁX}$ $82,31 \pm 5,90\%$) também não tiveram o relaxamento prejudicado. Dessa forma, concordante com os resultados obtidos para o efeito do inibidor não seletivo de canais para K^+ , o TEA, em que também não se houve prejuízo do relaxamento induzido pelo ORS, infere-se a não participação da atividade de canais para K^+ na atividade vasodilatadora do ORS.

Figura 7. Efeito da Glib e 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo ORS em preparações E-



Curvas concentração-efeito para o ORS antes ou após (30 min) de incubação com Glib ($3 \mu M$, $n=4$) e 4-AP ($1mM$, $n=4$) em artérias E- pré-contraídas com fenilefrina.