



UFG

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

JULIANA RODRIGUES CARDOSO

**Efeitos da acariçoba (*Hydrocotyle umbellata* L.) sobre as vias
aéreas isoladas de ratos**

**Goiânia/GO
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Juliana Rodrigues Cardoso

3. Título do trabalho

Efeitos da acariçoba (*Hydrocotyle umbellata* L.) sobre as vias aéreas isoladas de ratos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Lavorenti Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 10/06/2022, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **JULIANA RODRIGUES CARDOSO, Usuário Externo**, em 10/06/2022, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

JULIANA RODRIGUES CARDOSO

**Efeitos da acariçoba (*Hydrocotyle umbellata L.*) sobre as vias
aéreas isoladas de ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Linha de pesquisa: Planejamento, síntese e avaliação biológica de produtos naturais e moléculas bioativas.

Orientador(a): Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

**Goiânia/GO
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cardoso, Juliana Rodrigues

Efeitos da acariçoba (*Hydrocotyle umbellata* L.) sobre as vias aéreas isoladas de ratos [manuscrito] / Juliana Rodrigues Cardoso. - 2022.

LX, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti ; co-orientador Dr. Rocha .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, ,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia,
2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, lista de figuras.

1. *Hydrocotyle umbellata* L. 2. acariçoba. 3. relaxamento. 4. traqueia. 5. canais de cálcio. I. , Matheus Lavorenti , orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº 93 da sessão de Defesa de **Dissertação de Juliana Rodrigues Cardoso** que confere o título de Mestra em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **vinte e três dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois**, a partir das **19:00 horas**, através de **videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Efeitos da acariçoba (Hydrocotyle umbellata L.) sobre as vias aéreas isoladas de ratos”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Matheus Lavorenti Rocha (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor José Realino de Paula – (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular interno; **Professora Doutora Hellen Karine Paes Porto – (Faculdade União de Goyazes) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Matheus Lavorenti Rocha (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e três dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Lavorenti Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 23/05/2022, às 20:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Realino De Paula, Professor do Magistério Superior**, em 23/05/2022, às 20:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **HELLEN KARINE PAES PORTO, Usuário Externo**, em 26/05/2022, às 19:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Stephânia Fleury Taveira

**Goiânia-GO
2022**



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

BANCA EXAMINADORA

Aluno (a): Juliana Rodrigues Cardoso

Orientador (a): Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha / Presidente

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG

Prof. Dra. Hellen K Paes Porto / Membro Titular

Associação de Combate ao Câncer de Goiás

Prof. Dr. José Realino de Paula / Membro Titular

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG

Prof. Dr. Leonardo Luiz / Membro Suplente

Professor Titular da Universidade Estadual de Goiás, CCET/ UEG

Prof. Dr. Luiz Dantas / Membro Suplente

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG

Data: 23/05/2022

Dedico este trabalho à minha avó, Valdeci Maria Cardoso (*in memoriam*) e ao meu pai, Kerley Silas Cardoso (*in memoriam*), por me proporcionarem o maior e mais puro amor, que passará para meus filhos e resistirá ao tempo.

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	3
2.2 ACARIÇOBA (<i>Hydrocotyle Umbellata</i> L)	4
2.2.1 Uso popular da Acariçoba.....	5
2.2.1 Prospecção Fitoquímica	5
2.3 DOENÇAS RESPIRATÓRIAS	7
2.3.1 Asma.....	8
2.4 TÔNUS DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS	10
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DA <i>HYDROCOTYLE UMBELLATA</i> L.	15
4.1.1 Obtenção do extrato hidroetanólico de acariçoba (EHA)	15
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE HIBALACTONA POR CLAE	16
4.2.1 Co-validação do método CLAE.....	16
4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	17
4.3.1 Protocolos experimentais <i>in vitro</i>	17
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EHA EM TRAQUEIAS ISOLADAS.....	18
4.4.1 Investigação dos mecanismos envolvidos na resposta relaxante induzida pelo EHA.....	19
4.4.2 Efeito do EHA sobre a resposta de contração induzida por carbacol	19
4.4.3 Efeitos do EHA em respostas contráteis mediadas pelo influxo de Ca ²⁺	20
4.4.4 Efeito do EHA sobre a funcionalidade do reticulo sarcoplasmático	20
4.4.5 Avaliação do sinergismo entre o EHA e nitroprussiato de sódio ou isoprenalina	20
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21

5 RESULTADOS	22
RELAXING RESPONSES OF ISOLATED RAT AIRWAYS TO <i>Hydrocotyle umbellata</i> L. EXTRACT	23
6 CONCLUSÃO	43
7 REFERÊNCIAS	44

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: <i>Hydrocotyle umbellata</i> L. cultivada em Goiânia no horto de plantas medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.....	4
Figura 2: Estrutura química da hibalactona, nome IUPAC: (3E) -4-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil) -3-(1,3-benzodioxol-5ilmetileno) di-hidro-2(3H) -furanona).....	7
Figura 3: Mecanismo de contração do músculo liso vascular. Cálcio (Ca^{2+}), inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG), proteína G ($G\alpha/G\beta/G\gamma$), proteína quinase C (PKC), receptor (R).....	12
Figura 4: Cascata de sinalização nas células musculares lisas em resposta à ativação do canal de K^+ e à sua inibição.....	13
Figura 5: Montagem das preparações de anéis traqueais isoladas de ratos. Ilustração dos experimentos de reatividade das vias aéreas isoladas em banho de órgãos isolados para registro da tensão isométrica e submetidas a concentrações crescentes EHA.....	18
Quadro 1: Atividades biológicas e compostos isolados das espécies de <i>H. Umbellata</i> L. encontradas no Brasil	6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de Variância
Ca ²⁺	- Cálcio
COX	- Ciclooxigenase
EC ₅₀	- Concentração que promove 50% da resposta máxima
EC ₁₀₀	- Concentração que promove 100% da resposta máxima
EHA	- Extrato Hidroalcolico da Acariçoba
GCs	- Guanilato ciclase solúvel
GMPc	- Guanosina monofosfato cíclico
ISO	- Isoprenalina
KCl	- Cloreto de potássio
K ⁺	- Potássio
L-NAME	- Nitro-L-arginina Metil Éster
NANC	- Sistema Nervoso Não-Adrenérgico Não-Colinérgico
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NPS	- Nitroprussiato de Sódio
ODQ	- 1H-[1,2,4] oxidazol[4,3-a]quinoxaline1-one
TEA	- Tetraetilamônio

Efeitos da acariçoba (*Hydrocotyle umbellata* L.) sobre as vias aéreas isoladas de ratos

Cardoso J. R.¹; Rocha M. L.²

¹ Mestranda da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. ² Professor orientador da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

Resumo

Embora a acariçoba *Hydrocotyle umbellata* L. – Araliaceae, apresente importantes efeitos biológicos, incluindo relatos na literatura para o tratamento da asma, suas ações sobre o sistema respiratório não foram verificadas. Os objetivos desse trabalho foram determinar os efeitos do extrato hidro-alcoólico das partes subterrâneas de acariçoba (EHA) sobre o músculo liso traqueal isolados de ratos. Para isto, anéis de traqueais foram montados isoladamente em banho de órgãos para registro da tensão isométrica. Foram avaliados o efeito dilatador do EHA em traqueias, a influência das vias NO/GCs e COX/prostanóides, dos canais de K⁺, do influxo extracelular de Ca²⁺ e o sinergismo entre EHA e fármaco doador de NO e agonista β-adrenérgico. Os resultados mostram que o EHA induz relaxamento do músculo liso das vias áreas de forma dose dependente (0-700 µg/mL). O pré-tratamento com inibidor da NO sintase (L-NAME), da GCs (ODQ), dos canais de K⁺ (tetraetilamônio) e da COX (diclofenaco sódico) não alteraram o relaxamento induzido pelo EHA. A contração estimulada por carbacol foi prejudicada pelo tratamento prévio com EHA. O EHA também inibiu a contração causada pelo influxo de Ca²⁺ estimulado por carbacol e KCl (75 mM). Não foi observado sinergismo entre o relaxamento estimulado pelo NO ou ativação de receptores β-adrenérgico e o EHA. Em conclusão, o EHA induz dilatação do músculo liso traqueal isolados de ratos e o bloqueio do influxo de Ca²⁺ pela membrana celular parece ser o mecanismo de ação principal responsável por esse efeito.

Palavras-chave: *Hydrocotyle umbellata* L.; acariçoba; relaxamento; traqueia; canais de cálcio.

Effects of acariçoba (*Hydrocotyle umbell* L.) on the isolated airways of rats

Cardoso J. R.¹; Rocha M. L.²

¹ Mestranda da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. ² Professor orientador da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

Abstract

Although the acariçoba *Hydrocotyle umbellata* L. – Araliaceae has important biological effects, including reports in the literature for the treatment of asthma, its actions on the respiratory system have not been verified. The goals of this work were to determine the effects of the hydro-alcoholic extract of the underground H. umbellata (HEHU) on tracheal smooth muscle isolated from rats. For this, tracheal rings were prepared separately in an organ bath to record the isometric tension. The relaxing effects of HEHU on tracheas, the influence of NO/GCs and COX/prostanoid pathways, K⁺ channels, extracellular Ca²⁺ influx and synergism between HEHU and nitric oxide donor drug and β -adrenergic agonist were also evaluated. The results show that HEHU induces airway smooth muscle relaxation in a dose-dependent manner (0-700 μ g/mL). The pre-treatment with NO synthase and guanylyl ciclase inhibitors (L-NAME and ODQ, respectively), K⁺ channel blockes (tetraethylammonium) and COX inhibitor (sodium diclofenac) did not alter the relaxation induced by HEHU. Carbachol-stimulated contraction was impaired by previous treatment with HEHU. The HEHU also inhibited the contraction caused by the influx of Ca²⁺ stimulated by carbachol and KCl (75 mM). No synergism was observed between nitric oxide-stimulated relaxation or activation of β -adrenergic receptors and HEHU. In conclusion, HEHU induces airways smooth muscle dilatation isolated from rats and the blocking of Ca²⁺ influx through the cell membrane seems to be the main mechanism of action responsible for this effect.

Keywords: *Hydrocotyle umbellata* L.; acariçoba; relaxation; trachea; calcium channels.

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias estão entre as mais comuns em todo o mundo, em grande parte devido ao pulmão ser um órgão muito exposto e vulnerável às infecções e lesões que podem ser propiciadas pelo ambiente externo, a exposição ocupacional às partículas ambientais, como a poeira e produtos químicos, alérgenos e o uso do tabaco (LABAKI; HAN, 2020).

Tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, as doenças respiratórias representam um grande problema de saúde pública por provocarem em graus elevados, incapacidades fisiológicas, comorbidades, e por fim repercussões econômicas com o alto número de internações e mortalidade hospitalar (XIE *et al.*, 2020).

Em conjunto, mais de um bilhão de pessoas sofrem de condições respiratórias agudas ou crônicas, condição esta que afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, limitando o paciente de acordo com a atividade exercida em razão dos fatores que contribuem para limitação da respiração (TORRE *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2020).

Dentre as principais doenças respiratórias podemos citar a asma, doença crônica caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas superiores e inferiores, promovendo alterações fisiológicas, morfológicas e remodelamento crônico nas próprias vias aéreas, levando a limitação variável do fluxo aéreo provocando tosse, dispneia, aperto no peito e sibilância (BURNEY *et al.*, 2015; DENG *et al.*, 2013).

O uso de plantas nativas para fins medicinais como possível alternativa para o tratamento da asma tem sido amplamente estudado, representando um enorme recurso natural com potencial para novos medicamentos com poucos efeitos colaterais. Bennett (1997), relata o uso da acariçoba por indígenas para o tratamento de asma e pneumonias. Para reforçar, Allen *et al.* (1986), descrevem o uso dessa planta medicinal por tribos nativas norte-americanas em corroboração a efeitos benéficos no tratamento para doenças respiratórias.

A acariçoba (*Hydrocotyle umbellata* L.), pertence ao gênero *Hydrocotyle*, família *Araliaceae* sendo considerada selvagem ou daninha (LORENZI; MATOS, 2002; SANTANA, 2001). Esta espécie pode ser encontrada espalhadas por regiões tropicais e temperadas do mundo todo. No Brasil, sua prevalência se dá nos estados do Centro-Sul

de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás (CORRÊA; PENA, 1984; FISCHER; KATO; OLIVEIRA, 1994; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2016).

Estudos recentes demonstraram atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das partes subterrâneas da espécie *H. umbellata* (OLIVEIRA *et al.*, 2017a). A hibalactona (substância usada como marcador químico da espécie e apontado como o princípio ativo de vários efeitos farmacológicos), é uma lignana que se mostra promissora no desenvolvimento de novos medicamentos devido ao seu efeito anti-inflamatório, analgésico e antioxidante.

Tomados em conjunto, os estudos apresentados por outros pesquisadores sobre esta planta medicinal nos levam então a associar possíveis efeitos benéficos do extrato da acariçoba para o tratamento de doenças respiratórias de hipersensibilidade que implicam no aumento do tônus da musculatura lisa levando à broncoconstrição, impossibilitando o relaxamento máximo da musculatura das vias aéreas. Neste trabalho, avaliamos a ação do extrato hidroalcolólico da acariçoba (EHA) e alguns mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso traqueal de ratos wistar, examinando principalmente o efeito da espécie sobre o influxo de Ca^{2+} através da membrana das células musculares lisas do trato respiratório.

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças é relatada desde o período neolítico (em torno 10.000 anos atrás), sendo passado o conhecimento do seu uso ao longo das gerações. Remédios à base de plantas medicinais são bastante utilizadas com fins terapêuticos e curativos há milhares de anos. Esta utilização veio perdurando com o passar dos anos e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende de drogas vegetais (ARGENTA *et al.*, 2011; BADKE *et al.*, 2011).

Apesar de utilizadas no mundo todo, as plantas medicinais são amplamente empregadas em países em desenvolvimento, onde a medicina tradicional se impõe como uma prática de baixo custo, garantindo acesso da população a algum tipo de terapia contra determinadas doenças e com diversos fins terapêuticos. Em países com rica biodiversidade e com conhecimentos populares bastante difundidos, como é o caso do Brasil, é elevado o consumo de plantas medicinais para fins terapêuticos quando comparado com a utilização de medicamentos sintéticos industrializados (ALVES, 2013).

Com a evolução dos estudos científicos adjuntos das comprovações das ações terapêuticas das plantas, o mercado de medicamentos fitoterápicos vem crescendo ao longo dos anos e a prática da utilização de plantas com propriedade medicinal vem se difundindo, sendo utilizada tanto por pessoas comuns da comunidade, quanto por profissionais de saúde (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

A fitoterapia estuda o uso das plantas para tratamento ou prevenção de doenças, apresentando efeito farmacológico comprovado cientificamente, uma vez que os fitoterápicos devem possuir um padrão de qualidade necessário a um medicamento, tanto da matéria prima quanto do produto final, para que este medicamento garanta segurança e eficácia ao paciente (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

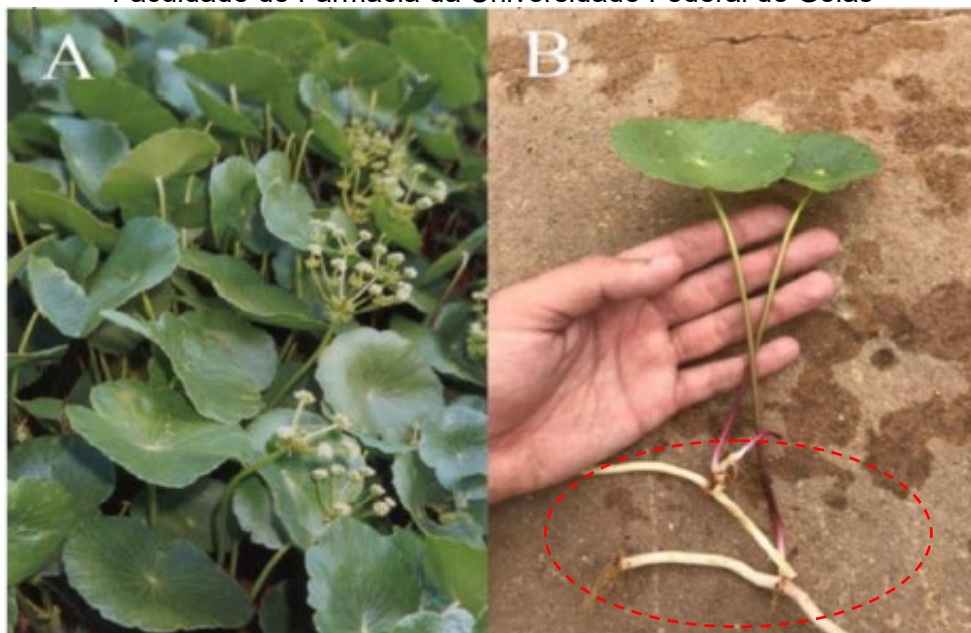
É amplamente descrito na literatura inúmeras espécies vegetais dotadas de compostos fitoquímicos que apresentam diversas propriedades terapêuticas. Dentre estes compostos que vem sendo amplamente explorados podemos citar alguns, os terpenos, as lignanas, as flavonas e compostos polifenólicos (GIRALDI; HANAZAKI, 2010).

2.2 ACARIÇOBA (*Hydrocotyle Umbellata* L)

A família Araliaceae da ordem Apiales está dividida em cerca de 43 gêneros e 1.500 espécies. O gênero *Hydrocotyle* L. (Araliaceae) abrange mais de 130 espécies espalhadas por regiões tropicais e regiões temperadas, sendo representado por 17 espécies que vem sendo alvo de estudos científicos devido à grande diversidade de bioativos com propriedades medicinais (CORRÊA; PENA, 1984; FISCHER; KATO; OLIVEIRA, 1994; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2016).

A espécie *Hydrocotyle umbellata* L., popularmente conhecida como acariçoba, possui características de uma planta rastejante, herbácea, perene, prostrada, rizomatosa, podendo ser encontrada em solo pantanoso, arenoso, restinga ou meio aquático. Se apresentando na natureza com folhas pecioladas, peltadas de coloração verde-escura ou arroxeada, as vezes marrom. Os caules são subterrâneos, do tipo estolho, de coloração amarelo-acastanhado e flores brancas pequenas e numerosas e uma pequena cápsula frutífera achatada tendo geralmente duas sementes dentro, pode-se observar na Figura 1 (LORENZI; MATOS, 2002; SANTANA, 2001).

Figura 1: *Hydrocotyle umbellata* L. cultivada em Goiânia no horto de plantas medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás



Legenda: (A) Aspecto geral de folhas e inflorescências; (B) *Hydrocotyle umbellata* L. por completa com ênfase nas partes subterrâneas.

Fonte: Oliveira (2018).

2.2.1 Uso popular da Acariçoba

A interação entre pessoas, plantas e cultura é conhecida como etnobotânica, sendo um dos aspectos mais intrigantes desta ciência o uso de plantas nativas para fins medicinais. As plantas nativas representam um enorme recurso natural local com potencial para novos medicamentos. Medicamentos fitoterápicos possuem compostos terapêuticos que ocorrem naturalmente em plantas recebendo um interesse renovado para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos modernos.

Tomados em conjunto, os estudos relatados por outros pesquisadores sobre a acariçoba e seu princípio ativo hibalactona, sugerem atividades biológicas e funções farmacológicas como analgesia e ação anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais. O que nos leva então a associar possíveis efeitos benéficos do extrato da acariçoba para o tratamento de doenças respiratórias de hipersensibilidade que geram inflamação no músculo liso que implicam no tônus muscular aumentado levando à broncoconstrição, impossibilitando o relaxamento máximo da musculatura das vias aéreas (SOLÉ *et al.*, 2014).

Como dito anteriormente, alguns relatos na literatura mostram o uso dessa espécie para o tratamento de doenças do trato respiratório como asma e pneumonias por algumas tribos indígenas (BENNETT, 1997). Além disso, Allen *et al.* (1986), relatam a utilização dessa planta medicinal por tribos nativas norte-americanas para o tratamento de afecções respiratórias.

2.2.1 Prospecção Fitoquímica

Em relação ao estudo da prospecção fitoquímica da *H.umbellata* L., foram encontradas uma grande diversidade de produtos químicos bioativos de variáveis estruturas e foi também verificada nas partes subterrâneas a presença de metabólitos secundários, flavonóides, saponinas esteróides, triterpenos e outros fenóis como citados no Quadro 1 (ADAMS; NORRIS; MABRY, 1989; FISCHER; KATO; OLIVEIRA, 1994).

Quadro 1: Atividades biológicas e compostos isolados das espécies de *H. Umbellata* L. encontradas no Brasil

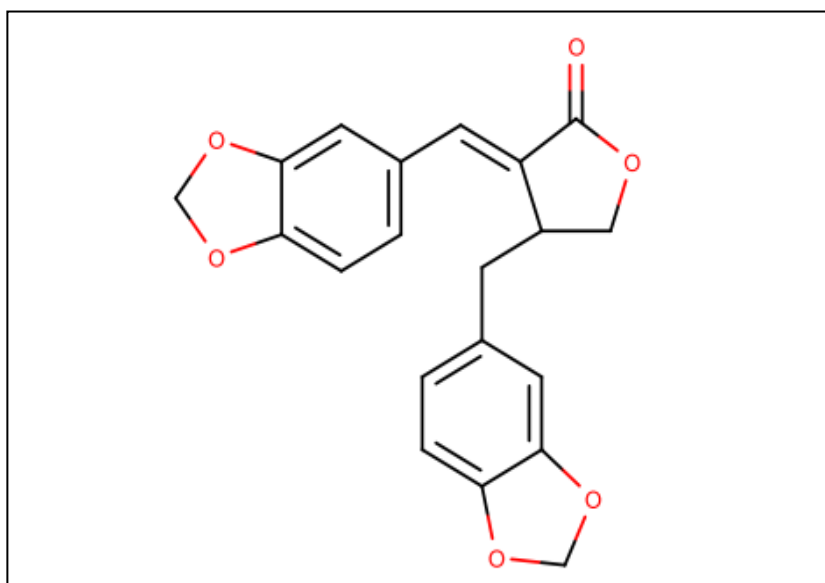
Espécie:	<i>Hydrocotyle umbellata</i> L			
Atividade biológica	anti-inflamatória; antinociceptiva; antioxidante; ansiolítica			
Compostos isolados	Flavonoides quercetina e quercetina-3-O-galactosídeo	Esteroides estigmasterol, estigmasta-7,25-dien-3-ol e estigmasteril-3-O-β-D-glucopiranosídeo	Triterpenos metil-oleanolato 3-O-β-D-glucopiranosídeo	Lignana: Hibalactona
Fonte	Adams; Norris; Mabry (1989)	Chavasiri <i>et al.</i> (2005)	Chavasiri <i>et al.</i> (2005)	Oliveira <i>et al.</i> (2017a)

Fonte: Autoria própria (2021).

Estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2017a), revelaram atividades anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva do extrato etanólico das partes subterrâneas da espécie *H. umbellata* e estas atividades foram atribuídas, em parte, a presença da hibalactona.

A hibalactona (figura 2) também conhecida como “savinin”, é uma lignana da classe das dibenzilbutirolactonas, moléculas orgânicas que se mostram promissoras no desenvolvimento de novos medicamentos devido ao seu efeito anti-inflamatório, analgésico e antioxidante. Além dessas atividades da hibalactona relacionadas à *H. umbellata* (OLIVEIRA *et al.*, 2017b), diversas atividades biológicas foram atribuídas para essa lignana, incluindo atividade anticolinesterásica (JUNG *et al.*, 2015), antiestrogênica (LEE *et al.*, 2005), antitumoral (MANSOOR *et al.*, 2013), larvicida (MATSUBARA, 1972) e neuroprotetora (YOON *et al.*, 2008).

Figura 1: Estrutura química da hibalactona, nome IUPAC: (3E) -4-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil) -3-(1,3-benzodioxol-5-ilmetileno) di-hidro-2(3H) -furanona



Fonte: Oliveira *et al.* (2017b).

As propriedades biológicas das ligninas e lignanas, incluindo anti-inflamatórias e antioxidantes estão em constante estudo para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos (SÉFARA-SOUSA; ANGELIS-PEREIRA, 2013).

Estudos mostram que diferentes frações extrativas da *H. umbellata* ricas em hibalactona apresentaram vários efeitos farmacológicos como redução de mediadores inflamatórios gerais, histamina, bradicinina e prostaglandinas, reduzindo também a produção dos leucotrienos pró-inflamatórios devido à inibição de lipoxigenase e ciclooxygenase (COX), causando a redução dos mediadores inflamatórios prostanóides mediado pela COX-2. Sugere-se que a estrutura molecular da hibalactona é viável para interação com as enzimas-chave como 5-LOX e COX-2, realizando interações intermolecular nos sítios ativos das enzimas e, assim, modulando esta dupla alvo (OLIVEIRA *et al.*, 2017a). Ainda mais, achados *in silico* sugerem a hipótese de que hibalactona apresenta atividade anti-inflamatória por interferir nas vias metabólicas do ácido araquidônico (HWANG *et al.*, 2013).

2.3 DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

Em diversos países com diferentes poderes econômicos, as doenças que acometem o trato respiratório se tornaram um problema de saúde pública, acometendo a

economia governamental pelo elevado número de casos que demandam tratamento específico e a ocupação de leitos hospitalares (XIE *et al.*, 2020).

Joan Soriano e colegas (2020), aproveitam o Estudo de Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de Risco – GBD (2017), para estimar a prevalência e a carga de saúde atribuível de doenças respiratórias crônicas. Eles descobriram que cerca de 545 milhões de pessoas no mundo tinham uma doença respiratória crônica. Um aumento de 39,8% desde 1990 até aquele ano.

Em conjunto, mais de um bilhão de pessoas sofrem de condições respiratórias agudas ou crônicas, condição esta que afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, acarretando a essas pessoas uma série de prejuízos ao decorrer dos anos, de acordo com o desajuste da capacidade respiratória, autolimitando o paciente de acordo com a atividade exercida em razão dos fatores que contribuem para limitação da respiração (TORRE *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2020).

As doenças de hipersensibilidade que acometem o trato respiratório, provocam alterações nas próprias vias aéreas através da formação de mediadores pró-inflamatórios, desencadeando efeitos tais como edema com exsudação de plasma, inflamação, aumento na secreção de muco e contração da musculatura brônquica (CALHOUN *et al.*, 1992).

Dentre as principais doenças respiratórias de hipersensibilidade e inflamação podemos citar a asma, que se caracteriza como doença crônica mais comum da infância, sensibilizando 14% das crianças em todo o mundo, considerando que 334 milhões de pessoas em todo o mundo é portador desta doença (BURNEY *et al.*, 2015).

2.3.1 Asma

Os estudos epidemiológicos sobre a asma demonstram que ela é uma doença de alta prevalência e impacto em crianças e adolescentes com diversos fatores de risco, apresentando condição multifatorial determinada pela interação entre a predisposição genética e fatores ambientais importantes, devendo, portanto, ser encarada como um sério e dispendioso problema de saúde pública (SOLÉ *et al.*, 2014).

Os fatores de risco que elevam a gravidade da asma e retardam a resposta ao tratamento podem ser divididos em ambientais e próprios do paciente, como é o caso dos

fatores genéticos. Os fatores ambientais são representados pela exposição à poluição atmosférica, redução da ingestão de antioxidantes, elevada exposição ao tabagismo, levando à diminuição da função pulmonar e infecções virais, as quais favorecem o aumento da asma e outras doenças respiratórias (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2010).

A principal característica fisiopatogênica da asma é limitar o fluxo aéreo, levando à alguns sinais característicos como tosse, dispneia e sibilos causado pela inflamação crônica e hiper-responsividade das vias aéreas inferiores além de gerar a inflamação brônquica, reflexo de um extenso e complexo espectro de interações entre mediadores inflamatórios, migração de células inflamatórias como linfócitos, produção de mediadores químicos como interleucinas, imunoglobulina E e células estruturais das vias aéreas como mastócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliais e linfócitos T auxiliares ativados, atuando sobre suas próprias células musculares lisas alterando o tônus muscular das vias aéreas (DENG *et al.*, 2013; PATEL, 2014).

O padrão inflamatório é característico e composto por mastócitos ativados, macrófagos, prostanóides derivados da via ácido araquidônico/COX, eosinófilos e linfócitos T auxiliares (do tipo Th2) que produzem citocinas envolvidas na coordenação, amplificação e perpetuação da resposta inflamatória e pela atração de células inflamatórias adicionais responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório, liberando mediadores provocando broncoespasmo e edema. A interleucina 4 (IL-4) tem uma função no aumento da produção de anticorpos (imunoglobulina E), assim diversos mediadores inflamatórios são liberados de células que migram para o foco inflamatório como mastócitos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), macrófagos (TNF-alfa), linfócitos (interleucinas 2-5; fator de crescimento de colônia de granulócitos), eosinófilos (citocinas), neutrófilos e pelas células epiteliais (mediadores lipídicos, óxido nítrico) (BALZARY; COCKS, 2006; ICHINOSE, 2009).

Todos esses mediadores inflamatórios atuam sobre suas próprias células musculares lisas contribuindo para ocasionar lesões e podendo causar hipertrofia e hiperplasia levando a um estreitamento das vias respiratórias e alterações na integridade epitelial alterando o tônus muscular da via aérea e aumento da reatividade do músculo liso, propiciando maior contração da musculatura lisa das vias aéreas (GOLAN *et al.*, 2009).

2.4 TÔNUS DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS

Formado por associação de células longas fusiformes, mais espessa ao centro e atenuando-se em direção às extremidades, variando seu tamanho entre 20 μm a 500 μm . As células musculares lisas são revestidas por lâmina basal e são interligadas por junções de comunicação especializadas, por uma rede muito delicada de fibras reticulares, sendo que essas fibras promovem contração simultânea das células pois unem as células umas às outras de tal maneira que a contração de apenas algumas células se transforma na contração do feixe muscular inteiro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Moléculas pequenas ou íons passam por essas junções de uma célula para outra e proporciona elos de comunicação que então regulam a contração de todo feixe ou folheto de músculo liso (ROSS; PAWLINA, 2008).

O controle das vias respiratórias ocorre através dos neurônios não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) e da inervação aferente, promovida pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Essas duas últimas inervações podem ser estimuladas por compostos químicos provocando o reflexo para tosse, broncoconstrição e aumento da secreção de muco, ou por mediadores da inflamação, como, histamina, bradicinina, prostanoídes, leucotrienos e outros (BARNES, 1995).

A participação simpática no controle da respiração se dá, especialmente, por receptores β_2 -adrenérgicos presentes no músculo liso, epitélio, glândulas e alvéolos. Esse receptor leva ao efeito relaxante das vias aéreas que ocorre pelas catecolaminas circulantes, já que não há inervação simpática direta no músculo liso brônquico (BARNES, 1995; GOYAL; JASEJA; VERMA, 2010).

Os receptores β -adrenérgicos são ligados a proteína G (metabotrópicos) que passa 7 vezes pela membrana celular e quando são ativados por agonistas, a subunidade α da proteína G ativa a adenilato ciclase. Esta, é capaz de transformar ATP em AMPc e este segundo mensageiro leva a vários efeitos celulares, incluindo redução da concentração de Ca^{2+} citoplasmática e desfosforilação da miosina, impedindo o acoplamento com actina levando ao relaxamento do músculo liso (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A participação parassimpática se dá pela ação dos receptores muscarínicos (M_3), que está presente no músculo liso e quando ativado, leva à broncoconstrição

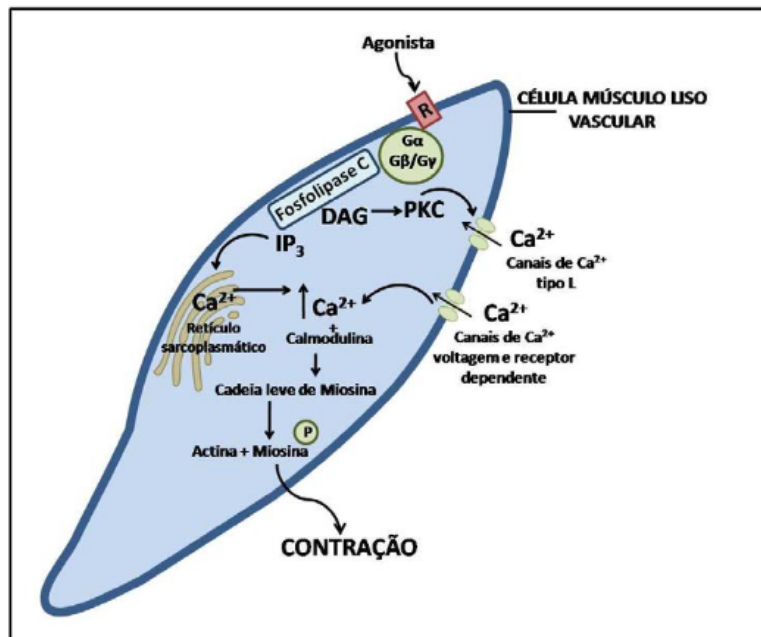
principalmente por induzir a entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas (BARNES, 1995).

Para a contração muscular das vias aéreas (Figura 3), as fontes de Ca^{2+} podem ser de origem intracelular e extracelular ou ambas. Assim, os íons Ca^{2+} responsáveis pela indução da contração do músculo liso das vias aéreas são encontrados em dois compartimentos diferentes: meio externo (Ca^{2+} extracelular, o qual irá infundir pela membrana celular através dos canais de Ca^{2+} até a parte interna da célula, quando esta for estimulada a contrair) e interno (vindo da mitocôndria, mas principalmente do retículo sarcoplasmático, organela responsável pelo armazenamento e liberação do Ca^{2+} no processo de relaxamento e contração, respectivamente) (CASTRO *et al.*, 2011).

A contração do músculo liso ocorre após o aumento do Ca^{2+} citoplasmático, o qual irá formar um complexo com a proteína calmodulina e irá promover fosforilação da miosina quinase de cadeia leve, a qual fosforila as cadeias leves de miosina e promove sua interação com actina, permitindo a contração. Os mediadores químicos endógenos mais importantes que participam dos processos de contração são acetilcolina (através da inervação parassimpática), histamina, leucotrienos e prostaglandinas (WEBB, 2003).

Após o estímulo contrátil, a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático ocorre principalmente através do receptor rianodina em duas formas de destaque no músculo liso: liberação de Ca^{2+} induzida pelo influxo do Ca^{2+} proveniente dos espaços extracelulares (influxo de Ca^{2+}), conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , e também pela liberação de Ca^{2+} reticular induzido por segundos mensageiros (sobretudo trifosfato de inositol - IP_3) gerados nas células do músculo liso após estímulo contrátil induzido por agonista (acetilcolina, histamina, tromboxano A_2 , prostaglandinas, etc) (FLORES-SOTO *et al.*, 2013).

Figura 3: Mecanismo de contração do músculo liso vascular. Cálcio (Ca^{2+}), inositol-1,4,5- trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG), proteína G ($\text{G}\alpha/\text{G}\beta/\text{G}\gamma$), proteína quinase C (PKC), receptor (R)

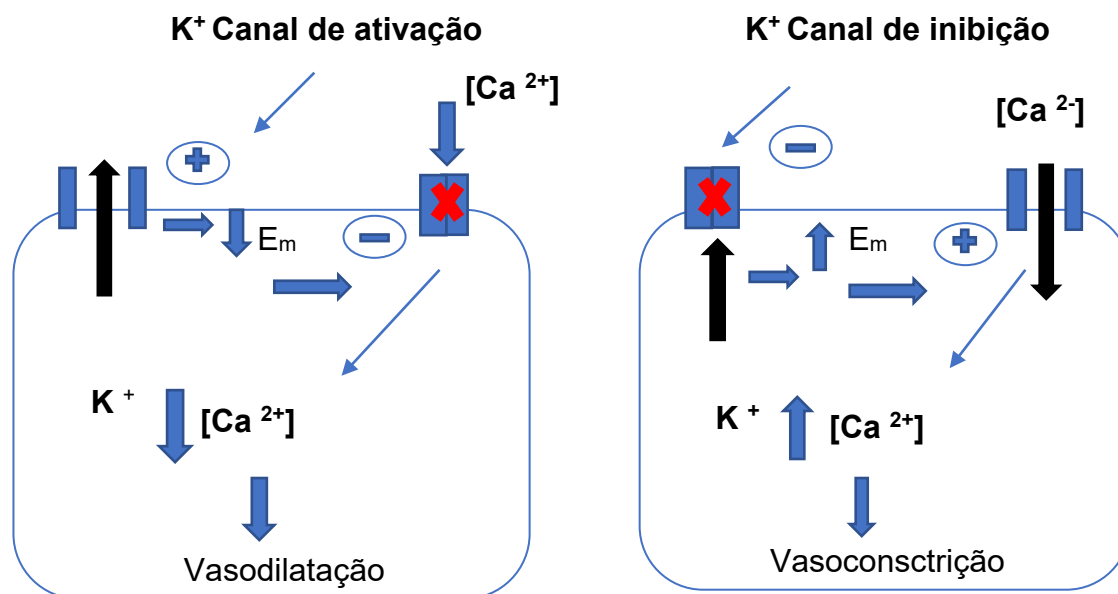


Fonte: Delbin e Zanesco (2013).

Em relação aos canais para K^+ , estes desempenham um papel fundamental na regulação da contratilidade muscular e, por conseguinte, em seu tônus. A ativação de canais de K^+ nas células musculares lisas do trato respiratório pode causar vasodilatação e aumentar o fluxo aéreo. Este é um mecanismo de ação exercido pelo óxido nítrico ao induzir dilatação da musculatura lisa (BOLOTINA *et al.*, 1994).

A atividade dos canais para K^+ constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares lisas, sendo um determinante para o tônus muscular. A abertura do canal de potássio presente na membrana das células musculares lisas, provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular. Este estado conduz ao fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (ou canais de Ca^{2+} do tipo L) e conseqüente diminuição da entrada de íons Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento muscular (COELHO *et al.*, 2008).

Figura 2: Cascata de sinalização nas células musculares lisas em resposta à ativação do canal de K^+ e à sua inibição



Fonte: Adaptado de Sobey (2001).

Os efeitos patológicos causados nas vias aéreas pelas doenças respiratórias, principalmente para aquelas que acometem o tônus da musculatura lisa, comprometendo assim a sua responsividade, em especial a asma, desperta um enorme interesse em diferentes grupos de pesquisas, a respeito dos compostos naturais que apresentam atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e atividades que beneficiem o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, com o objetivo de prevenir a limitação crônica do fluxo aéreo otimizando a função pulmonar, afim de evitar crises agudas, reduzindo o uso de fármacos broncodilatadores e minimizando eventos adversos de vários medicamentos utilizados na farmacoterapia desses pacientes.

Diante do interesse biológico e medicinal em determinar o efeito da acariçoba nas vias áreas, a hipótese do presente trabalho é que a espécie atue nos mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso das vias aéreas isoladas de animais de laboratório, apontando possíveis vantagens relacionado ao uso desta planta medicinal, trazendo a elucidação dos possíveis mecanismos de ação no músculo liso respiratório como uma nova modalidade terapêutica no tratamento de doenças respiratórias, especialmente a asma.

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do extrato hidroalcoólico das partes subterrâneas de acariçoba (EHA) sobre o músculo liso das vias aéreas isoladas de ratos, visando identificar seu mecanismo de ação envolvido na regulação do tônus muscular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação das vias NO/GCs/COX sobre o relaxamento induzido pelo EHA;
- Avaliar a influência dos canais de K^+ de membrana das células do músculo liso sobre o relaxamento induzido pelo EHA;
- Avaliar a influência do EHA sobre a contração induzida por estímulo colinérgico (carbacol);
- Avaliar a participação do EHA sobre a contração mediada pelo influxo de Ca^{2+} ;
- Avaliar a participação do retículo sarcoplasmático sobre o relaxamento induzido pelo EHA;
- Avaliar o possível efeito sinérgico entre doadores de óxido nítrico (NPS) ou ativação de receptores β -adrenérgico (isoprenalina) com EHA.

4.1 COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL DA *HYDROCOTYLE UMBELLATA* L.

Para a realização do estudo proposto foi utilizada a espécie *H. umbellata* cultivada na zona rural de Hidrolândia, Goiás a 16° 40' 33" S de Latitude e 49° 14' 39" W de Longitude, no condomínio de Chácaras Miraflores em altitude de 768 m, entre o período de outubro de 2018 a dezembro de 2019. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula e a exsicata do material botânico foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o registro: UFG-22394.

As partes subterrâneas coletadas foram lavadas com água corrente, dessecadas em estufa com circulação forçada de ar à 40 °C e trituradas em moinho de facas (modelo Tipo WILLYE), sendo a droga vegetal obtida na forma de pó acondicionado ao abrigo de luz e umidade até a preparação do extrato.

4.1.1 Obtenção do extrato hidroetanólico de acariçoba (EHA)

O extrato hidroetanólico foi obtido por processo de maceração estática, partindo-se de 1 kg das partes subterrâneas de *H. umbellata* e empregando etanol 96 °G.L como solvente extrator, com proporção, droga: solvente de 1:5 (uma parte do material pulverizado para cinco partes de solução etanólica), em um período de três dias, com agitação ocasional. Após a extração, realizou-se a filtração e posteriormente o resíduo vegetal foi submetido a mais duas extrações de maneira análoga à primeira, a fim de aumentar a eficiência da extração. O extrato bruto obtido foi concentrado em evaporador rotativo, modelo MA-120 (TECNAL®), a uma temperatura de 40 °C, mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A partir do extrato bruto, foram confeccionadas então soluções de extrato de acariçoba, contendo 200 mg do extrato bruto para 1000 µL de água destilada. Estas amostras foram armazenadas em eppendorfs e guardadas no freezer do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular/UFG, a - 20°C até o dia dos experimentos.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE HIBALACTONA POR CLAE

O método analítico proposto por Oliveira *et al.* (2019), foi usado para a realização da quantificação de hibalactona. As análises procederam utilizando um sistema cromatográfico da marca Waters® modelo HPLC Alliance® com módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodo (DAD) 2998 e sistema de processamento de dados Empower 2.0. As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel empregada foi uma mistura de metanol grau HPLC, acetonitrila grau HPLC e água ultrapura (Mili-Q®) na proporção 65:10:25, respectivamente, com modo de eluição isocrático e vazão de 0,8 mL/min por 20 min e detecção a 290 nm. O volume de injeção foi de 10 µL. As análises foram realizadas a temperatura ambiente (25 °C). A fase móvel foi previamente filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Millex®) e desgaseificada usando banho de ultrassom (USC 1800A, 40 kHz, Uniques).

4.2.1 Co-validação do método CLAE

Na análise da seletividade do método, o pico correspondente ao padrão de hibalactona foi observado com tempo de retenção similar ao do extrato. O espectro de absorvância na região do ultravioleta determinado para o padrão de hibalactona, através do detector DAD, revela regiões de absorvância equivalentes do padrão e extrato (Figura 1). Os espectros de absorção demonstram que o método é capaz de mensurar o composto hibalactona na presença de outros constituintes, sendo seletivo conforme definição da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 166/2017 para categorias referentes aos testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2017).

A seletividade para o diluente metanol foi realizada também por varredura no sistema detector DAD e não exibiu máximos de absorção que pudessem interferir na detecção do marcador hibalactona à 290 nm conforme o método co-validado. Portanto, não apresentou interferências nos cromatogramas do extrato ou do padrão de hibalactona.

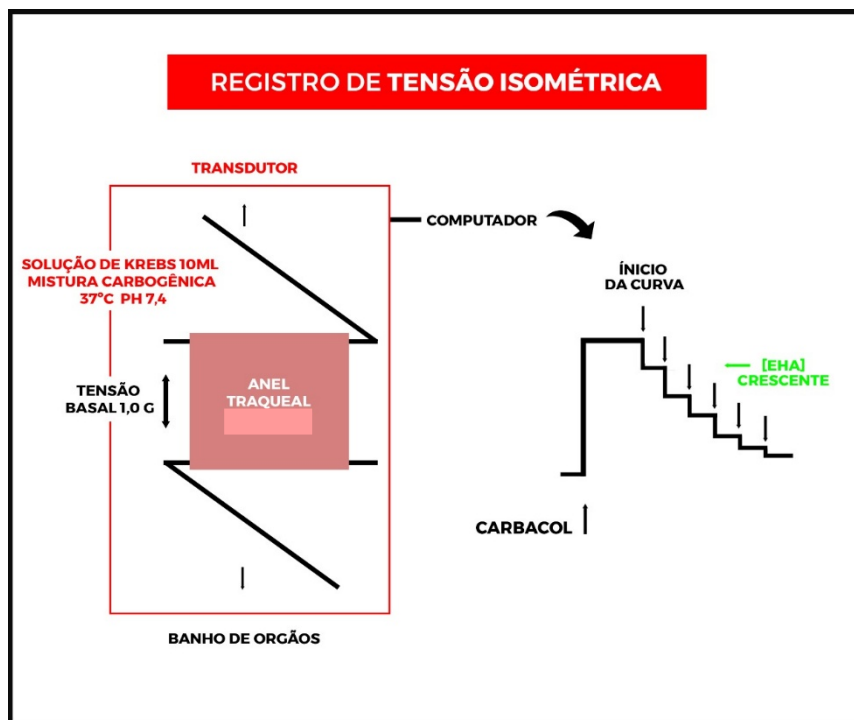
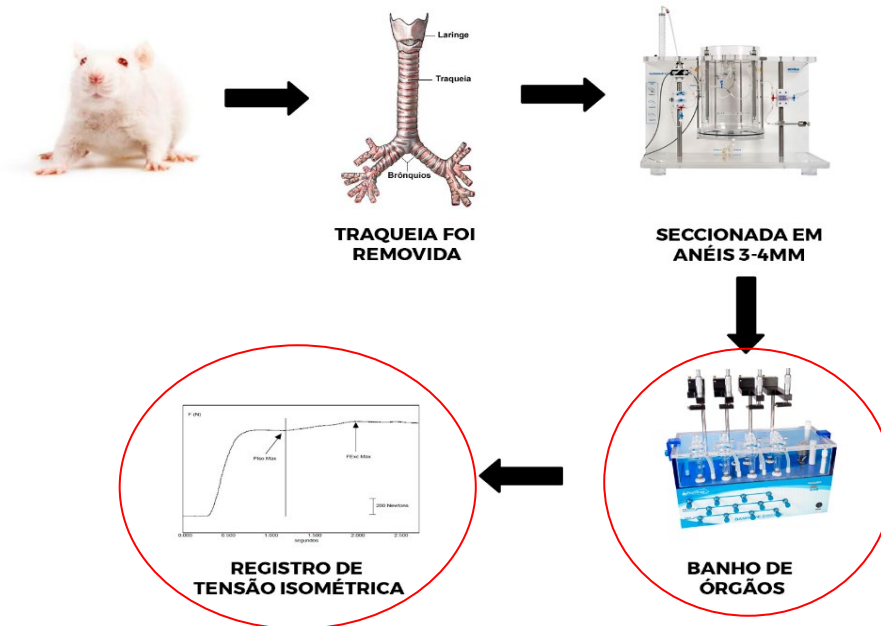
4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos machos Wistar (200-250g) provenientes do Biotério Central da UFG foram utilizados neste para os experimentos. Os animais foram alojados em uma sala do biotério da Faculdade de Farmácia – UFG. Antes dos experimentos os animais foram mantidos em caixas de propileno forradas com maravalha, com controle de temperatura e luz ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclo claro/escuro de 12h), com livre acesso a água e ração para roedores e aclimatados por um período de no mínimo 7 dias antes de iniciar os experimentos. Estes procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, sob o protocolo de número 116/2019.

4.3.1 Protocolos experimentais *in vitro*

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia inalatória de isoflurano, em seguida dissecado abrindo-se a região cervical-torácica. O tecido conjuntivo e gorduroso envolto do órgão foram removidos, a traqueia foi retirada e isolada em um recipiente contendo solução nutritiva (Figura 5). O órgão foi cortado em anéis (3 ± 4 mm) gerando quatro anéis no total, estes foram montados entre dois estribos de aço inoxidável, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba para órgão isolado para registro da tensão isométrica (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA). Os anéis foram colocados em câmaras para órgãos isolados contendo solução de Krebs modificada com a seguinte composição (em mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, e mantidas a uma tensão basal de 1 g (tensão de repouso ideal, previamente padronizada em nosso laboratório), por um período de 60 min para estabilização. Após o equilíbrio, todas as preparações foram expostas à solução concentrada de KCl (75 mM) para obter sua contração máxima (100 % contração). Logo após, os tecidos foram lavados com solução de Krebs por no mínimo três vezes de 15 a 20 min para nova estabilização e início dos protocolos experimentais descritos a seguir.

Figura 5: Montagem das preparações de anéis traqueais isoladas de ratos. Ilustração dos experimentos de reatividade das vias aéreas isoladas em banho de órgãos isolados para registro da tensão isométrica e submetidas a concentrações crescentes EHA



Fonte: Autoria própria (2021).

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EHA EM TRAQUEIAS ISOLADAS

Sob o efeito de pré-contração mediada pelo carbacol (EC_{50} : $0,5 \mu\text{M}$ determinado anteriormente no nosso laboratório), as preparações de traqueia foram submetidas à

curva concentração-efeito relaxante para o EHA, usando concentrações crescentes de 0 à 700 µg/mL. Dessa forma foi possível determinar a concentração do EHA capaz de produzir 100% do relaxamento (IC_{100}) e também a concentração que produz 50% da resposta relaxante máxima (IC_{50}) as preparações isoladas. As respostas foram expressas em percentual relativo de relaxamento após a contração máxima estimulada com carbacol (0,5 µM).

4.4.1 Investigação dos mecanismos envolvidos na resposta relaxante induzida pelo EHA

Para investigação dos mecanismos envolvidos na resposta tensora das traqueias, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: L-NAME (inibidor não seletivo da NO sintase, 100 µM), ODQ (inibidor da guanilil ciclase solúvel; 1 µM), diclofenaco de sódio (inibidor não seletivo da COX, 10 µM) e tetraetilamônio (TEA, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , 1 mM). Nessas avaliações, foram obtidas curvas concentração-efeito para o EHA, em preparações previamente incubada (20 min) com os inibidores.

A contração das preparações incubadas com os inibidores citados foi induzida com o agonista colinérgico carbacol (EC_{50} : 0,5 µM) para pré-contração das preparações e em seguida foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o EHA.

4.4.2 Efeito do EHA sobre a resposta de contração induzida por carbacol

Nesta série de experimentos, foi avaliada a contração das vias aéreas isoladas estimuladas com agonista colinérgico carbacol (10 nM à 100 µM). As preparações foram previamente contraídas com solução de KCl (75 mM), a fim de obter a contração máxima (100 %) das traqueias. Após nova estabilização, as curvas concentração-efeito para o carbacol foram obtidas na ausência (controle) e na presença do EHA nas concentrações de 280 µg/mL (IC_{50}) ou 700 µg/mL (IC_{100}). O mesmo protocolo foi realizado na presença de verapamil (0,3 µM), utilizado como controle positivo.

4.4.3 Efeitos do EHA em respostas contráteis mediadas pelo influxo de Ca^{2+}

Para analisar a participação do EHA na contração promovida exclusivamente pelo Ca^{2+} externo (influxo de Ca^{2+}), o Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático foi esgotado após sucessivas adições de carbacol ($0,5 \mu\text{M}$) em solução Krebs sem Ca^{2+} , até o desaparecimento de qualquer resposta contrátil. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-resposta para CaCl_2 ($0,1$ à $3,0 \text{ mM}$) em preparações previamente estimuladas (15 min) com carbacol ($0,5 \mu\text{M}$) ou KCl (75 mM). Essas curvas de contração foram obtidas na ausência (controle) e na presença (20 min) do EHA nas concentrações de $280 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) ou $700 \mu\text{g/mL}$ (IC_{100}). Além disso, curvas concentração-resposta para CaCl_2 previamente (20 min) tratados com verapamil ($0,3 \mu\text{M}$, bloqueador do canal de Ca^{2+}) foram utilizadas como controle positivo.

4.4.4 Efeito do EHA sobre a funcionalidade do retículo sarcoplasmático

Nessa avaliação, o carbacol (agonista colinérgico) foi utilizado para avaliar a influência do EHA sobre a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Após uma contração inicial induzida com carbacol ($0,5 \mu\text{M}$), os anéis de traqueia foram lavados com solução Krebs sem Ca^{2+} (zero Ca^{2+}) por 15 minutos até o relaxamento total e mantidos em tensão basal. Depois deste período de esgotamento do Ca^{2+} intracelular, os anéis foram mantidos em solução de Krebs com Ca^{2+} fisiológico ($1,6 \text{ mM}$) por 15 min (período de recarregamento). Em seguida, a solução de Krebs foi trocada por nova solução sem Ca^{2+} (zero Ca^{2+}) e estimulados novamente a contrair com carbacol ($0,5 \mu\text{M}$) ainda em meio isento de Ca^{2+} (adaptado de TOSTES *et al.*, 1995). Esse protocolo nos mostra a contração induzida por Ca^{2+} proveniente do retículo sarcoplasmático.

4.4.5 Avaliação do sinergismo entre o EHA e nitroprussiato de sódio ou isoprenalina

Após o equilíbrio, os anéis traqueais foram pré-contraídos com carbacol ($0,5 \mu\text{M}$) e após a estabilização do platô de contração, curvas cumulativas de concentração-resposta para doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS, 10 nM à $10 \mu\text{M}$) ou agonista β -

adrenérgico não seletivo Isoprenalina (Iso: 0,1 nM à 10 μ M) foram realizadas na presença (20 min) ou ausência do EHA (IC₅₀: 280 μ g /mL).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média \pm desvio padrão da média (SEM), de pelo menos 5 experimentos (n=5-8) obtidos de diferentes animais. Os gráficos foram realizados pelo programa Graph Pad Prism na versão 5.01 de 2008 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi o test t de student e a análise de variância ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls Foi adotado nível de significância de 5% (p<0,05) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas. As determinações da IC₅₀, IC₁₀₀ foram realizadas utilizando o método de regressão não linear das curvas concentração-resposta obtidas pelo EHA.

5 RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação são exibidos na forma de artigo científico recentemente submetido ao *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.

RELAXING RESPONSES OF ISOLATED RAT AIRWAYS TO *Hydrocotyle umbellata* L. EXTRACT

Juliana Rodrigues Cardoso¹, Matheus Gabriel de Oliveira², José Realino de Paula²,
Matheus Lavorenti Rocha^{1*}

¹ Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Rua 240, esquina com 5^a Avenida, s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-170, Goiânia/GO - Brasil.

² Natural Products Research Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Rua 240, esquina com 5^a Avenida, s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-170, Goiânia/GO - Brasil.

* Correspondent Author (Matheus Lavorenti Rocha)

UFG - Faculty of Pharmacy - Rua 240 esquina com 5^a Avenida s/n, Setor Universitário
CEP: 74605-170 - Goiânia - GO - Brazil Tel: +55 62 3209-6440.

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

ORCID:

JRC: <https://orcid.org/0000-0002-4764-4634>

MGO: <https://orcid.org/0000-0003-0692-9729>

JRP: <https://orcid.org/0000-0002-4424-7692>

MLR: <https://orcid.org/0000-0002-7883-5003>

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is a part from the master's dissertation of author Juliana Rodrigues Cardoso, research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Matheus L. Rocha is also a research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ABSTRACT

Although *H. umbellata* has important biological effects, its actions on the respiratory system have not been verified. The aims of this work are to determine the effects of hydroalcoholic extract of *H. umbellata* (HEHU) on airway isolated from rats. So, tracheal rings were mounted separately in an organ bath to record the isometric tension. The relaxing effect of HEHU in tracheas, the influence of NO/GCs and COX/prostanoid pathways, K⁺ channels, extracellular Ca²⁺ influx and the synergism between HEHU and NO-donor or isoprenaline was evaluated. The results show that HEHU induces airway smooth muscle relaxation in a dose-dependent manner (0-700 µg/mL). The pretreatment with L-NAME, ODQ, tetraethylammonium and sodium diclofenac did not change the relaxation induced by HEHU. The contraction stimulated by carbachol was impaired by previous treatment with HEHU, which also inhibited the contraction caused by the influx of Ca²⁺ induced by carbachol and high KCl. No synergism was observed between HEHU and NO-donor or isoprenaline. In conclusion, HEHU induces airways dilatation and the blocking of Ca²⁺ influx seems to be the key mechanism of HEHU-induced relaxation.

Keywords: *Hydrocotyle umbellata*; relaxation; trachea; airway; calcium channels.

INTRODUCTION

Respiratory diseases are among the most common diseases worldwide essentially because the lungs are very vulnerable to infections and injuries that can be caused by the external environment, occupational exposure to environmental particles, such as dust and chemicals, allergens and the tobacco use (LABAKI; HAN, 2020). In addition, respiratory diseases represent a major public health problem, as they cause high degrees of disability, comorbidities and economic repercussions due to the high number of hospital admissions and mortality (XIE *et al.*, 2020).

Asthma, one of the main chronic diseases and the most important respiratory disease, is characterized by chronic airway inflammation leading to lower airway hyper-reactivity, dyspnea, cough, chest tightness, wheezing, and affect approximately 334 million people in the world. The epidemic does not choose race, ethnicity or age group; however, ethnicity and socioeconomic status influence the prevalence, morbidity and mortality of asthma in several countries around the world (ENILARI; SINHA, 2019).

In this context, the use of medicinal plants as a possible alternative for the treatment of respiratory diseases has been constantly studied, representing a large natural resource with potential for new drugs with fewer side effects and greater patient adherence. Bennett (1997) reported the use of *H. umbellata* L. by indigenous people for the treatment of asthma and pneumonia. Moreover, Austin (2004) described the beneficial effects in the use of this medicinal plant by North American native tribes in the treatment of respiratory diseases.

H. umbellata L. (Araliaceae family), is considered wild herb or weed, and can be found scattered throughout tropical and temperate regions of the world and in Brazil (APG IV, 2016; FISCHER *et al.*, 1994). Late studies have shown important biological activity of the species, such as anti-inflammatory and antinociceptive effects of the plant. In addition, hibalactone, a lignan present mainly in the underground parts of this species, is a molecule that has shown promise in the development of new drugs due to its anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

This work evaluated the effects of the hydroalcoholic extract of *H. umbellata* (HEHU) in isolated rat trachea. In addition to its anti-inflammatory and antioxidant activities already described in the literature (which is fundamental in the case of asthma), HEHU

was able to produce smooth muscle relaxation in the respiratory tract, which corroborates with some descriptions of the popular use of this species.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of hydroalcoholic extract of *H. umbellata* (HEHU)

The studied species was cultivated in the rural area of Hidrolândia/GO, Brazil, at 16° 40' 33" S of Latitude, 49° 14' 39" W of Longitude and Altitude of 768 m, between the period from October 2018 to December 2019. The species was identified by Prof. Dr. José Realino de Paula (Faculty of Pharmacy/UFG) and a specimen of the botanical material was deposited in the Herbarium of the Federal University of Goiás under registration UFG-22394.

The underground parts were dried in an oven with forced air circulation at 40°C and powdered in a knife mill, obtaining the vegetable drug in powder form, which was subsequently conditioned at -20°C protected from light and humidity. To prepare the extract, the dry material was exhaustively extracted by dynamic maceration in an ethanol solution (96°GL) with a drug: solvent ratio of 1:5. After extraction and filtration, rotary evaporation were carried out at 40°C. From the crude extract, HEHU solutions were made containing 100 mg of the crude extract to 1 mL of distilled water, stored at -20°C until the experiments were carried out.

For phytochemical characterization of the HEHU, hibalactone was used as the chemical marker for this species. The hibalactone quantification was performed using HPLC conditions established and validated by Oliveira *et al.* (2019).

Experimental animals and preparation of isolated trachea

Male Wistar rats (200-230g) from the Central Animal Facility of the Federal University of Goiás were used in this study. All experimental protocols used were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), at the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, under protocol number 116/2019.

The animals were sacrificed by exsanguination under inhalation anesthesia, then dissected by opening the cervical-thoracic region. The connective and fatty tissue surrounding the organ was removed, the trachea was isolated, sectioned into rings (3-4 mm) and mounted between two stainless steel stirrups and connected to a power transducer to record isometric tension in an isolated organ bath chamber (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) containing modified Krebs solution with the following composition (in mM): NaCl 130.0; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 1.6; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 14.9; glucose 5.5; at pH 7.4 under gasification with a carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂), at 37 ± 1°C and maintained at a basal tension of 1 g (optimal resting tension, previously standardized in our laboratory), for a period of 60 min for stabilization before starting the experiments.

Experimental protocols

After stabilization, the tracheal rings were exposed to concentrated KCl solution (75 mM) to obtain their maximum contraction (100% contraction), then washed with Krebs solution for at least three times from 15 to 20 min for new stabilization and initiation of experimental protocols.

In order to investigate the mechanism(s) responsible for the relaxation induced by HEHU, the tracheal rings were then pre-contracted with a cholinergic agonist carbachol (EC₅₀: 0.5 µM, previously determined in our laboratory), with or without prior treatment (20 min) with one of the following pharmacological tools: a) soluble guanylate cyclase inhibitor, ODQ (1 µM); b) non-selective NO synthase inhibitor, L-NAME (100 µM); c) non-selective COX inhibitor, sodium diclofenac (10 µM); d) non-selective potassium channel blocker, tetraethylammonium (TEA, 1 mM), and consequently concentration-effect curves for HEHU (0-700 µg/mL) were obtained.

To better analyze the relative contribution of HEHU in inducing relaxation, concentration-response curves to carbachol (10 nM to 100 µM) were performed before and after incubation (20 min) with HEHU at 50% inhibitory concentration (IC₅₀: 280 µg/ml), 100% (IC₁₀₀: 700 µg/ml) or verapamil (0.3 µM) as a positive control.

The action of HEHU in inhibiting the contraction induced by Ca²⁺ influx was also analyzed. For this, the internal Ca²⁺ stock from sarcoplasmic reticulum of tracheal smooth

muscle cells was depleted after successive additions of carbachol (0.5 μ M) in Krebs solution without CaCl_2 , until any contractile response disappeared. Then, concentration-response curves for CaCl_2 (0-3 mM) were performed in preparations previously stimulated with carbachol (0.5 μ M) or KCl (75 mM). This protocol was performed with or without previous treatment (20 min) with HEHU at 50% inhibitory concentration (IC_{50} : 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100% (IC_{100} : 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or verapamil (0.3 μ M) as a positive control.

Cholinergic stimulation with carbachol was also used to assess the influence of HEHU on Ca^{2+} uptake by internal stores (sarcoplasmic reticulum). After the contraction induced by carbachol (0.5 μ M), the tracheal rings were rinsed with Krebs solution without CaCl_2 (Ca^{2+} -free) for 15 minutes and kept at basal tension. After this period of exhaustion of the reticulum, the rings were kept in physiologic Krebs solution with CaCl_2 (1.6 mM) for 15 min (recharge period) and then the solution was again exchanged for a Ca^{2+} -free Krebs solution, and carbachol (0.5 μ M) was added to release the internal Ca^{2+} stock stored with or without previous treatment (20 min) with HEHU (IC_{50} : 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Adapted from TOSTES *et al.*, 1995).

Finally, the possible synergistic effect of HEHU with sodium nitroprusside (SNP) or isoprenaline (ISO) was evaluated. For this, after stabilization of the plateau of contraction of the preparations stimulated with carbachol (0.5 μ M), cumulative concentration-response curves were performed for nitric oxide donor, SNP (10 nM to 100 μ M) or β -adrenergic agonist, ISO (0.1 nM to 100 μ M) before and after (20 min) HEHU treatment.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Corporation, USA). Comparisons between groups were performed using ANOVA (post-test: Newman-Keuls) or Student's t test. The 5% significance level ($p < 0.05$) was taken as significant. The IC_{50} and IC_{100} values were performed using the non-linear regression method of the concentration-response curves obtained by the HEHU.

RESULTS

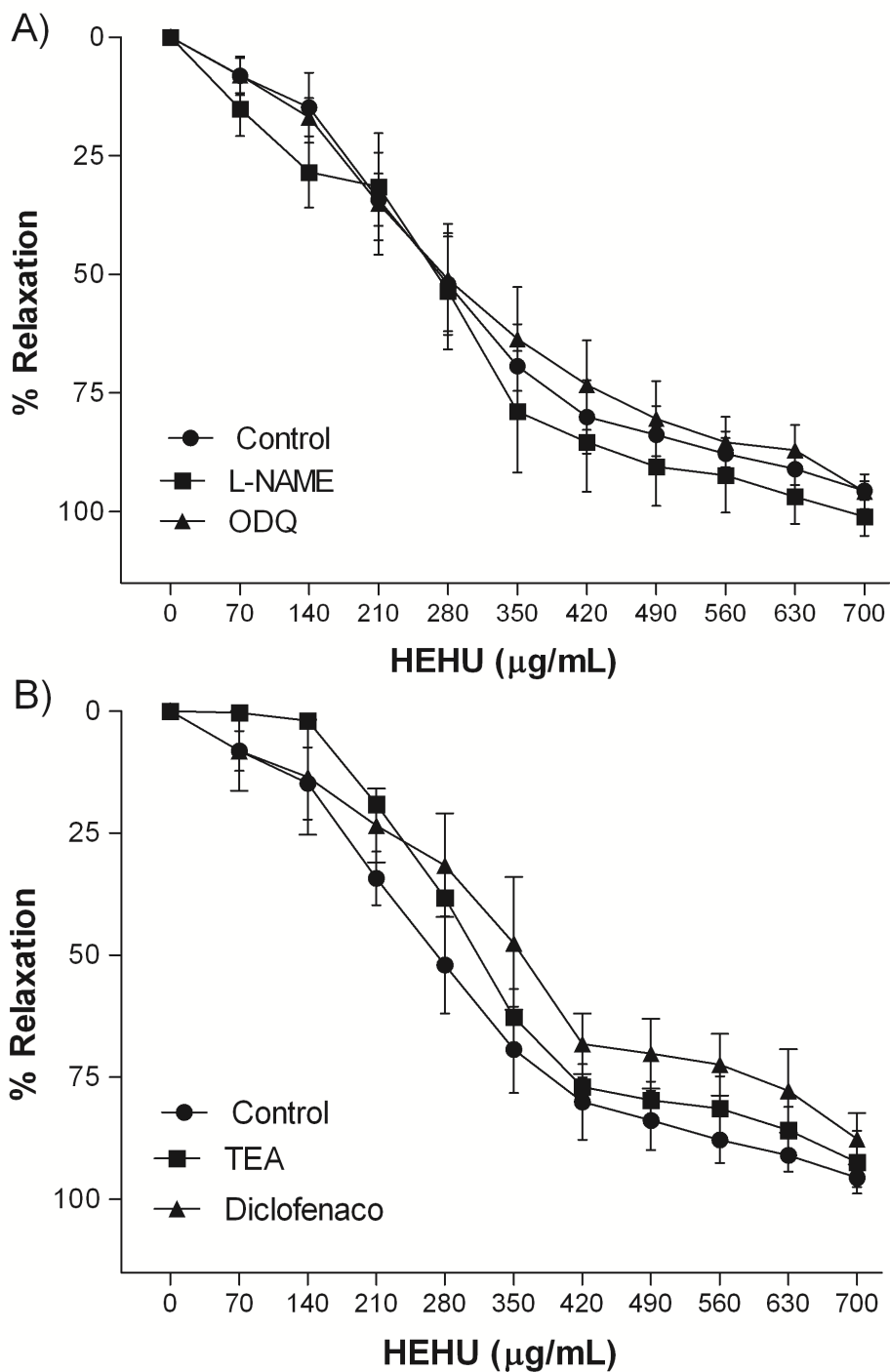
Chemical Characterization of Extract

In order to analyze the extract used in this study, HPLC was performed. The HEHU showed the presence of hibalactone (Rt: 7.95 min) which confirm the presence of this marker in the sample evaluated. This compound was identified by comparison with external standard. The level of hibalactone (chemical marker) found in HEHU was 0.04% (w/w).

HEHU-induced relaxation

The HEHU induced a concentration-dependent relaxing effect on the tracheal rings pre-contracted with carbachol, reaching a maximum effect (E_{max}) of $96.5 \pm 4.3\%$ ($n=7$) at the concentration of $700 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 1). The NOS inhibitor (L-NAME) and the soluble guanylate cyclase inhibitor (ODQ) did not change the maximum relaxation response induced by HEHU, which presented an E_{max} of $101.1 \pm 4.2\%$ ($n=6$) and $96.9 \pm 5.7\%$ ($n=6$), respectively (Figure 1A). Similarly, treatment of tracheae with a K^+ channel blocker (TEA) or COX inhibitor (diclofenac sodium) did not change the HEHU-induced relaxation, with an E_{max} of $94.2 \pm 4.8\%$ ($n=6$) and $93.1 \pm 6.4\%$ ($n=6$), respectively (Figure 2A).

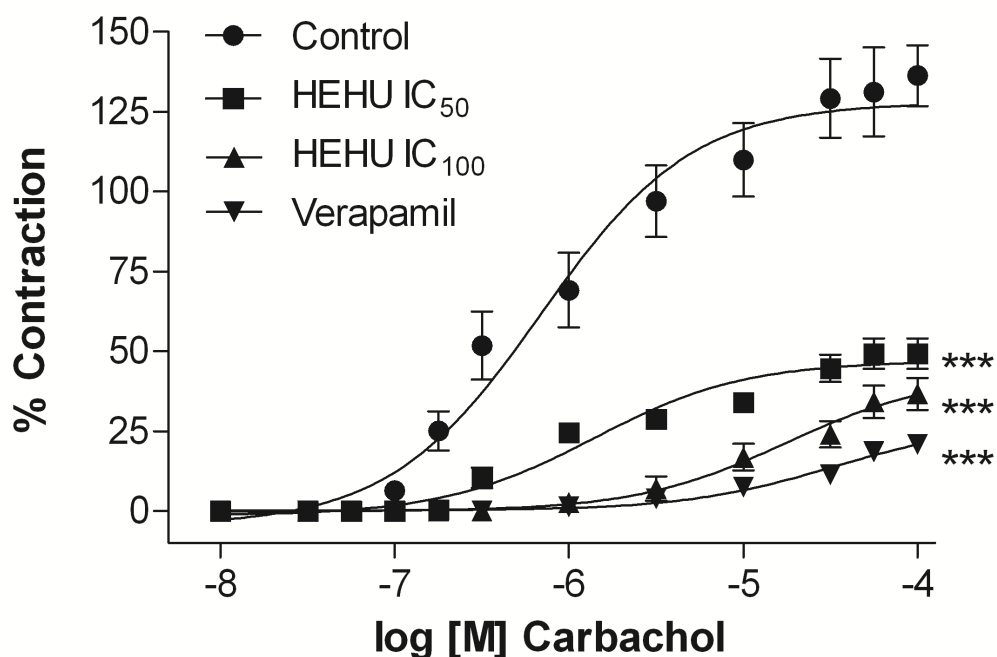
Figure 1 – Cumulative concentration-response curves for HEHU in tracheal rings pre-contracted with carbachol (0.5 μ M) in the absence or presence (20 min) of A) L-NAME (100 μ M), ODQ (1 μ M) or B) TEA (1 mM) or sodium diclofenac (10 μ M). The points represent the mean \pm S.E.M of the relaxing effect expressed as % relaxation



Effect of HEHU on contractile response induced by cholinergic stimulus

The E_{max} value for carbachol (cholinergic agonist) ($136.3 \pm 9.5\%$, $n=6$) was significantly ($p<0.001$) reduced to $49.3\% \pm 4.7\%$ ($n=7$), $36.3\% \pm 5.1\%$ ($n=6$) and $20.9\% \pm 2.5\%$ ($n=6$) after incubation with IC_{50} and IC_{100} of HEHU or verapamil, respectively. Furthermore, the addition of IC_{50} and IC_{100} of HEHU or verapamil significantly increased ($p<0.05$) the potency (pD_2 values: $-\log EC_{50}$) of carbachol from 6.24 ± 0.09 (control) to 5.35 ± 0.04 ; 5.14 ± 0.09 ; and 5.68 ± 0.07 mol/L, respectively (Fig. 2).

Figure 2 – Effect of HEHU on carbachol-induced contraction in isolated tracheal preparations. Cumulative concentration-response curves were performed in control conditions or after incubation (20 min) with HEHU (IC_{50} : $280 \mu\text{g/ml}$ or IC_{100} : $700 \mu\text{g/ml}$) or verapamil ($0.3 \mu\text{M}$). The points represent the mean \pm SEM of the contractile effect expressed as % contraction in relation to the maximum contraction induced by KCl (75 mM). Significant difference: *** $p<0.001$ vs. control

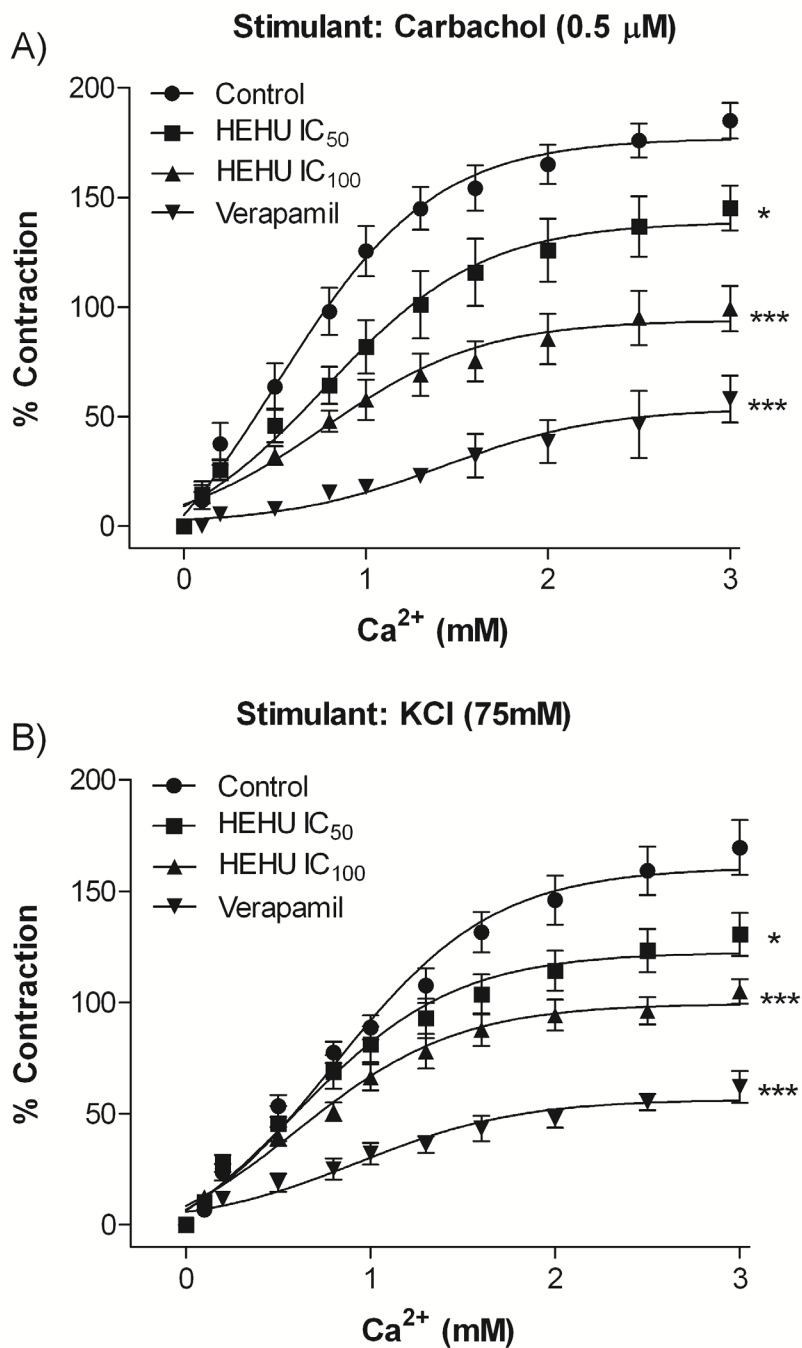


Effect of HEHU on contraction induced by Ca²⁺ influx in preparations stimulated with carbachol or KCl

In the contraction induced by carbachol-stimulated Ca²⁺ influx, pre-incubation with HEHU (IC₅₀ or IC₁₀₀) significantly reduced ($p < 0.001$) E_{max} values from $184.9 \pm 8.1\%$ ($n=6$) to $150.7 \pm 11.5\%$ ($n=6$) and $113.8 \pm 8.7\%$ ($n=6$), respectively. Verapamil treatment also significantly reduced ($p < 0.001$) the contraction to 74.1 ± 7.3 ($n=6$) (Fig. 3A).

As shown in Fig. 3B, contraction induced by Ca²⁺ influx stimulated by 75 mM KCl, pre-incubation with HEHU (IC₅₀ or IC₁₀₀) significantly reduced ($p < 0.001$) E_{max} values of $169.5 \pm 10.3\%$ ($n=6$) to $130.5 \pm 9.6\%$ ($n=8$) and $114.9 \pm 8.1\%$ ($n=6$), respectively. Verapamil treatment also significantly reduced ($p < 0.001$) the contraction to $72.7 \pm 7.1\%$ ($n=6$).

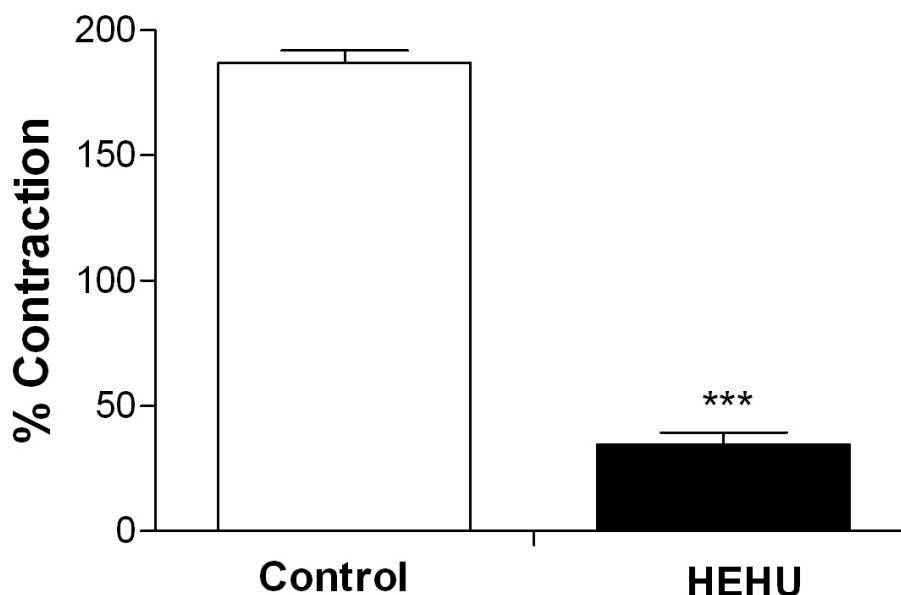
Figure 3 – Effect of HEHU and verapamil on the contractile response in isolated tracheal preparations. Cumulative concentration-response curves for CaCl_2 were stimulated by carbachol ($0.5 \mu\text{M}$) (A) or KCl (75 mM) (B) in control conditions or after incubation (20 min) with HEHU (IC_{50} : $280 \mu\text{g/ml}$ or IC_{100} : $700 \mu\text{g/ml}$) or verapamil ($0.3 \mu\text{M}$). The points represent the mean \pm SEM of the contractile effect expressed as % contraction in relation to the maximum contraction induced by KCl (75 mM). Significant difference: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. control



Effect of HEHU on internal Ca²⁺-induced contraction

The contraction induced by Ca²⁺ released from sarcoplasmic reticulum induced by carbachol (in Ca²⁺-free Krebs solution) was significantly reduced ($54.6 \pm 5.4\%$, $n=6$, $p<0.001$) as compared to the control group ($187.1 \pm 7.1\%$, $n=6$) (Fig. 4). This effect shows that HEHU is changing the capacity of the sarcoplasmic reticulum to supply Ca²⁺ for contraction.

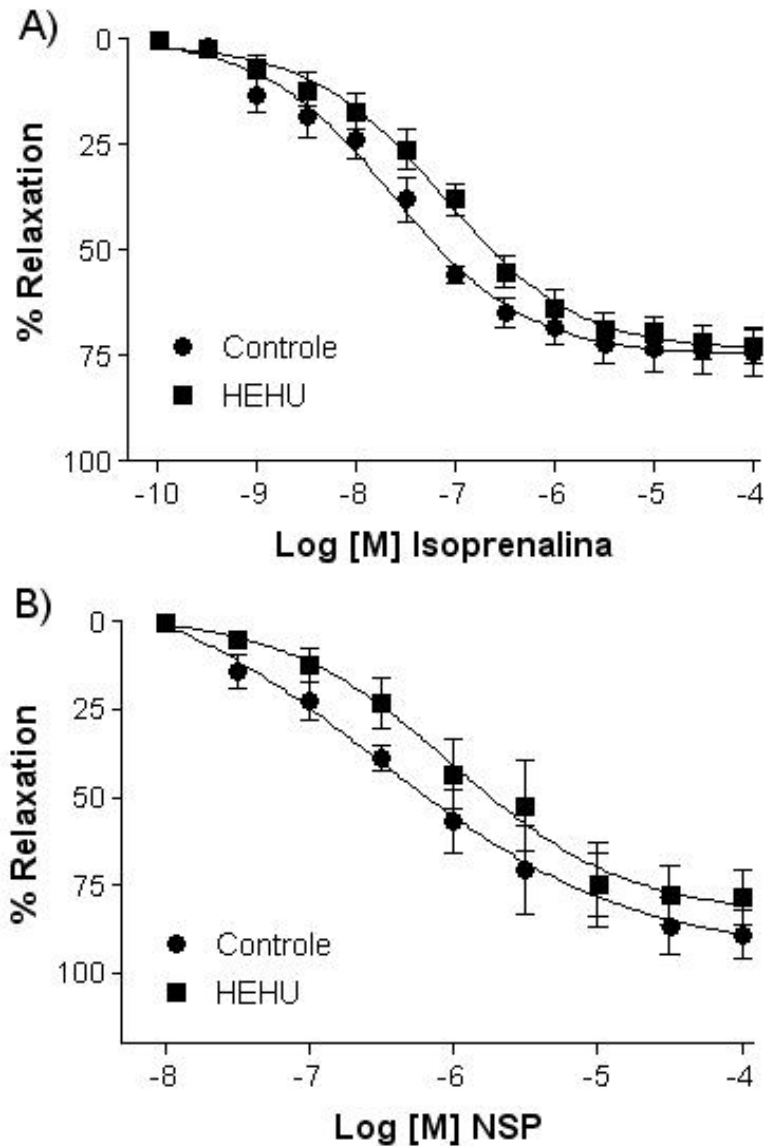
Figure 4 – Contractile effect produced by the release of internal Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum stimulated by carbachol (0.5 μ M) in medium without Ca²⁺ in the absence or presence (20 min) of HEHU (IC₅₀: 280 μ g/mL) in isolated tracheae. The bars represent the mean \pm SEM of the maximum contractile effect expressed as % contraction in relation to the maximum contraction induced by KCl (75 mM). Significant difference *** $p<0.001$ vs. control



Effect of HEHU on isoprenaline or NPS-induced relaxation

Tracheal relaxation induced by isoprenaline was not changed by the association with HEHU, both presenting similar E_{max} values ($74.9 \pm 4.3\%$, $n=6$ and $73.7 \pm 3.1\%$, $n=6$), respectively (Fig. 5A). Likewise, the relaxation of isolated airways stimulated with SNP was not altered by HEHU, with E_{max} values statistically similar ($94.7 \pm 8.5\%$, $n=6$ and $87.1 \pm 7.9\%$, $n=6$), respectively (Fig. 5B). These effects show that there are no synergistic or additive effect of HEHU on relaxation induced by β -adrenergic stimulation (isoprenaline) or by nitric oxide donor (SNP).

Figure 5 – Relaxing concentration-response curve for isoprenaline (A) or sodium nitroprusside (NPS) (B) in isolated tracheas in the presence (20 min) or absence of HEHU (IC_{50} : 280 μ g/mL). The points represent the mean \pm S.E.M of the relaxing effect expressed as % relaxation after pre-contraction with carbachol (0.5 μ M)



DISCUSSION

The major finding of this study is that HEHU induces a relaxing effect on isolated airways independently of the production of nitric oxide or prostanoids, acting directly on the airway smooth muscle cells and inducing a maximum relaxation effect after contractile cholinergic stimulus.

Respiratory diseases, especially asthma, are among the main causes of physical disability, causing loss of productivity at work or in studies, spending of public health resources and decreasing the life quality of patients. It is the most common chronic disease among young adults and children, mainly due to its early onset, which 1/4 of people usually develop asthma before the age of 40 (ENILARI; SINHA, 2019; LABAKI; HAN, 2020). In addition, not all countries have the resources to offer medications for the chronic treatment of asthma, which is basically made with anti-inflammatory drugs, β -adrenergic agonists and cholinergic inhibitors (KHURANA; JARJOUR, 2019).

The use of medicinal plants and natural products as alternative therapy represents a viable option for the treatment of several diseases (SOFOWORA *et al.*, 2013). The use of plants and drugs of plant origin to treat asthma has been used for more than 5,000 years by traditional Chinese medicine, which used the infusion of ma-huang or ephedra (*Ephedra sinica*) to control asthma attacks (SCHANEBERG *et al.*, 2003). In this regard, some reports describe the use of *H. umbellata* by some North American civilizations for the control of asthma and other respiratory tract affections, although no study so far has proven such an indication (AUSTIN, 2004; BENNETT, 1997).

Inflammatory diseases of the respiratory tract, like asthma, are related to airway hypersensitivity, causing increased contraction of airway smooth muscle cells (CASTRO *et al.*, 2016). The cholinergic (or parasympathetic) autonomic nervous system is primarily responsible for this contraction, stimulating cholinergic (muscarinic) receptors on airway myocytes (CASTRO *et al.*, 2016; CHUNG *et al.*, 2014). The data presented here demonstrate that cholinergic stimulus-induced airway constriction is inhibited by HEHU, which corroborates previous reports of the popular use of this species. The contraction of airway preparations in response to cholinergic stimuli was significantly reduced when treated with HEHU. Similarly, verapamil (Ca^{2+} channel blocker used here as control), also inhibited the contraction caused by the same stimulus. This is due to the cholinergic stimuli increases Ca^{2+} influx into airway myocytes, causing bronchoconstriction (BAZAN-PERKINS, 2012).

Endogenously produced nitric oxide (NO) is crucial in the regulation of multiple physiological and pathological processes, including the control of airway tone. Furthermore, NO has been shown to be the main agent in airway relaxation in humans and animals (CASTRO *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 1995). Released primarily by airway epithelial cells, the NO causes relaxation through its action on smooth muscle, activating

soluble guanylate cyclase, leading to bronchodilation (CASTRO *et al.*, 2011; ELLIS, 1997). Our results show that the NO/guanylate cyclase pathway does not participate in the relaxation stimulated by HEHU, since inhibition with L-NAME or ODQ did not alter the relaxing effect of HEHU.

Different types of K⁺ channels have been identified in the airway myocyte cell membrane. Opening these channels increases the K⁺ conductance out of the cell causing hyperpolarization of the plasma membrane, which reduces cell excitability, thus promoting smooth muscle relaxation (MALERBA *et al.*, 2010; STANDEN; QUAYLE, 1998). To investigate the possibility of HEHU action on the K⁺ channels, the experiments were carried out in the presence of TEA, a non-selective blocker of these channels. The results show that HEHU-induced relaxation does not involve K⁺ channel activation.

Arachidonic acid-derived COX products can also modulate airway smooth muscle tone by producing different prostanoids, for instance, prostaglandins (bronchoconstrictors) and prostacyclins (bronchodilators) (BALZARY; COCKS, 2006). It was shown in this work that HEHU does not influence the COX pathway and prostanoid production, since sodium diclofenac (non-selective COX inhibitor) did not alter the relaxation results induced by HEHU.

In airway myocytes, the influx of Ca²⁺ through the membrane is fundamental for the increase of cytoplasmic Ca²⁺ in the contraction phase, and it can be induced by cholinergic stimulation or by membrane depolarization, since the both stimuli induce the opening of voltage-gated Ca²⁺ channels, thus allowing this ion to enter the intracellular space (CHUNG *et al.*, 2014; TAZZEO *et al.*, 2008). Furthermore, this mechanism of Ca²⁺ influx through the membrane appears to be potentiated in the case of asthma, increasing the level of contraction of airway myocytes (CASTRO *et al.*, 2016). In our experiments, treatment of the tracheae with HEHU reduced the contraction induced by the Ca²⁺ influx, regardless of stimulation by a cholinergic agonist or membrane depolarization. This demonstrates that HEHU affects Ca²⁺ influx, just as verapamil does, used as a positive control in the experiments.

The sources of Ca²⁺ used for muscle cell contraction include extracellular source (influx of Ca²⁺), intracellular source (sarcoplasmic reticulum), or both. The concentration of intracellular Ca²⁺ is responsible for determining the tension level in the airway smooth muscle and some studies have shown the crucial participation of the sarcoplasmic reticulum in capturing and releasing Ca²⁺ during the relaxation and contraction process,

respectively (BAZAN-PERKINS, 2012; TAZZEO *et al.*, 2008). Our results show that treatment of the trachea with HEHU reduced the contraction induced by storage and release of Ca^{2+} by the sarcoplasmic reticulum, since the contractile response to carbachol in the absence of external Ca^{2+} was significantly reduced. This result is the likely consequence of the limitation of Ca^{2+} influx caused by HEHU, consequently restricting the possibility of storage of this ion by the sarcoplasmic reticulum (DU *et al.*, 2005). Late data demonstrate that Ca^{2+} channel blockers can suppress the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (DEL VALLE-RODRIGUEZ *et al.*, 2003), similarly as our results with HEHU have shown.

For many years, NO-donor drugs have been recognized as inducers of airway relaxation (CASTRO *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2016; ELLIS, 1997). However, β -adrenergic receptor agonists remain a first-line therapy in the treatment of asthma, leading to the relaxation of airway myocytes and allowing for greater airflow (KHURANA; JARJOUR, 2019). The results show that the relaxing effect of HEHU is not synergistic with classic bronchodilator drugs (NO-donors and β -adrenergic agonists), not potentiating the relaxing responses produced by these relaxing drugs.

CONCLUSIONS

In conclusion, the results demonstrate that HEHU induces relaxation of isolated airways in a concentration-dependent manner. In this effect, there is no participation in the NO/guanylate cyclase, COX or K^+ channels pathways. The major cellular pathway of action for HEHU to cause airway relaxation is the inhibition of the influx of Ca^{2+} across the plasma membrane, thus reducing the Ca^{2+} available to be used by the contractile apparatus of airway myocytes. This work will contribute to the body of knowledge on the traditional use of the species in diseases that affect the respiratory tract.

AUTHOR CONTRIBUTION

JRC: biological experiments and figure preparation; MGO: preparation of the HEHU and phytochemical analysis; JRP: phytochemical analysis and conception of the study; MLR: conception of the study, writing and editing of the manuscript and the figures. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ETHICAL STANDARDS (PROTECTION OF ANIMAL SUBJECTS)

Experiments reported in this study were performed after approval of protocol no. 116/2019 by Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), at the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil and were performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” from NIH publication 85–23.

REFERENCES

- APG IV (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1):1-20.
- Austin DF (2004) *Florida Ethnobotany*. 1st Ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 358-359.
- Balzary RW, Cocks TM (2006) Lipopolysaccharide Induces Epithelium- and Prostaglandin E2-Dependent Relaxation of Mouse Isolated Trachea through Activation of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *J Pharmacol Exp Ther* 317:806-812.
- Bazan-Perkins B (2012) cGMP reduces the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in airway smooth muscle cells: A putative mechanism in the regulation of Ca²⁺ by cGMP. *J Muscle Res Cell Motil* 32:375-382.
- Bennett BC (1997) An introduction to the Seminole people of South Florida and their plants. Part I: History and Ethnology. *The Palmetto* 17(2):20-21.
- Castro PFS, Andrade DL, Reis CF, Costa SHN, Batista AC, Silva RS, Roch ML (2016) Relaxing effect of a new ruthenium complex nitric oxide donor on airway smooth muscle of an experimental model of asthma in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43:221-229.
- Castro PFS, Pereira Ade C, Rogrigues GJ, Batista AC, da Silva RS, Bendhack LM, Rocha ML (2011) A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. *Eur J Pharm Sci* 17;43(5):370-377.
- Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al (2014) International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 43:343-373.
- del Valle-Rodriguez A, López-Barneo J, Urena R (2003) Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *The EMBO Journal* 22(17):4337-4345.
- Du W, Stiber JA, Rosenberg PB, Meissner G, Eu JP (2005) Ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction. *J Biol Chem* 280:26287-26294.
- Ellis JL (1997) Role of soluble guanylyl cyclase in the relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea and human bronchus. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1215-1218.
- Enilari O, Sinha S (2019) The Global Impact of Asthma in Adult Populations. *Annals of Global Health* 85(1):2.

- Fischer DCH, Kato ETM, Oliveira F (1994) Estudo farmacognóstico de *Hydrocotyle bonariensis* Lam., Adulterante de *Centella asiática* (L.) Urban. LECTA. Rev Farm Biol 12(2):71-102.
- Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 92(17):7809-7813.
- Khurana S, Jarjour NN (2019) Systematic approach to asthma of varying severity. Clin Chest Med 40(1):59-70.
- Labaki WW, Han MK (2020) Chronic respiratory diseases: a global view. Lancet Respir Med 8(6):531-533.
- Malerba M, Radaeli A, Mancuso S, Polosa R (2010) The potential therapeutic role of potassium channel modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Biol Regul Homeost Agents 24(2):123-130.
- Oliveira MG, Almeida PHG, Oliveira TLS, Silva LS, Carvalho FS, Alves SF, Borges LL, Santos PA, Silva VB, Paula JR (2019) HPLC-PDA method validated for the determination of hibalactone in *Hydrocotyle umbellata* subterranean parts and its ultrasound-assisted extraction optimization. Braz J Pharmacog 29:162-170.
- Oliveira TLS, Morais SR, Sá S, Oliveira MG, Florentino IF, Silva DM, Carvalho VV, Silva VB, Vaz BG, Sabino JR, Costa EA, Paula JR (2017) Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract, fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acaricoba) – Araliaceae. Biomed Pharmacother 95(1):837-846.
- Schaneberg BT, Crockett S, Bedir E, Khan IA (2003) The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. Phytochemistry 62(6):911-918.
- Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A (2013) The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. Afr J Tradit Complement Altern Med 10(5):210-229.
- Standen NB, Quayle JM (1998) K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. Acta Physiol Scand 164:549-557.
- Tazzeo T, Zhang Y, Keshavjee S, Janssen LJ (2008) Ryanodine receptors deplete internal Ca²⁺ store in human and bovine airway smooth muscle. Eur Respir J 32:275-284.
- Tostes RC, Traub O, Bendhack LM, Webb RC (1995) Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake is not decreased in aorta from deoxycorticosterone acetate hypertensive rats: functional assessment with cyclopiazonic acid. Can J Physiol Pharmacol 73:1536-1545.

Xie M, Liu X, Cao X, Guo M, Li X (2020) Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. *Respir Res* 21:49.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o extrato de *H. umbellata* induz relaxamento das vias aéreas isoladas de forma concentração-dependente. Neste efeito, não há participação nas vias NO/guanilato cilase, COX ou canais de K⁺. A via de ação celular majoritária para o extrato causar o relaxamento das vias aéreas é a inibição do influxo de Ca²⁺ através da membrana plasmática, reduzindo assim o Ca²⁺ intracelular disponível para ser utilizado pelo aparato contrátil dos miócitos das vias aéreas. Este trabalho contribuirá para o corpo de conhecimento sobre o uso da espécie em doenças que acometem o trato respiratório.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. A.; NORRIS, J. A.; MABRY, T. J. Flavonoids from *Hydrocotyle umbellata* L. (Umbelliferae). **Revista Latinoamericana de Química** 20:67-68, 1989.
- ALLEN, S. L. *et al.* The relaxant action of nicorandil in guineapig isolated trachealis. **British Journal of Pharmacology** 87(1):117-127, 1986.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química** 5(3):450-513, 2013.
- ARGENTA, S. C. *et al.* Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências** 7(12):51-60, 2011.
- BADKE, M. R. *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery** 15(1):132-139, 2011.
- BALZARY, R. W.; COCKS, T. M. Lipopolysaccharide Induces Epithelium- and Prostaglandin E(2) - dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of cyclooxygenase (COX) - 1 and COX-2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 317(2):806-812, 2006.
- BARNES, P. J. Is asthma a nervous disease? The Parker B. Francis Lectureship. **Chest Journal** 107(3):119S-125S, 1995.
- BENNETT, B. C. An introduction to the Seminole people of South Florida and Their Plants. Part I: History and Ethnology. **The Palmetto Journal** 17(2):20-21, 1997.
- BOLOTINA, V. M. *et al.* Nitric oxide directly activates calciumdependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368:850-853, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 23 set. 2021.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Revista Ciência & Saúde Coletiva** 17(10):2675-2685, 2012.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BURNEY, P. G. J. *et al.* Global and regional trends in COPD mortality, 1990- 2010. **European Respiratory Journal** 45:1239-1247, 2015.

- CALHOUN, W. J. *et al.* Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. **The American Review of Respiratory Disease Returns** 145(2):317-325, 1992.
- CASTRO, P. F. *et al.* A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 43(5):370-377, 2011.
- CHAVASIRI, W. *et al.* Allelochemicals from *Hydrocotyle umbellata* Linn. **Weed Science Society of America** 56(1):383-388, 2005.
- COELHO, L. P. *et al.* 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 327(1):206-214, 2008.
- CORRÊA, M. P.; PENA, L. de A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
- DELBIN, M. A.; ZANESCO, A. Sistemas Cardiovascular. *In*: ZANESCO, A.; PUGA, G. (Eds.). **Doenças Cardiometabólicas e Exercícios Físico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2013. p. 81-94.
- DENG, Y. *et al.* Geniposide inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology** 17(3):561-567, 2013.
- FISCHER, D. C. H.; KATO, E. T. M.; OLIVEIRA, F. Estudo farmacognóstico de *Hydrocotyle bonariensis* Lam., Adulterante de *Centella asiática* (L.) Urban. **Revista de Farmácia e Biologia** 12(2):71-102, 1994.
- FLORES-SOTO, E. *et al.* Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) refilling is determined by L-type Ca(2+) and store operated Ca(2+) channels in guinea pig airway smooth muscle. **European Journal of Pharmacology** 721(3):21-28, 2013.
- GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 24(2):395-406, 2010.
- GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA – GINA. Global Strategies for Asthma. **Management and Prevention**. 2010. Disponível em: <https://ginasthma.org/>. Acesso em: 26 set. 2021.
- GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiológica da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- GOYAL, M.; JASEJA, H.; VERMA, N. Increased parasympathetic tone as the underlying cause of asthma: A hypothesis. **Medical Hypotheses** 74(4):661-664, 2010.

- HWANG, S. H. *et al.* Rationally designed mul-target agents against inflammation and pain. **Current Medicinal Chemistry** 20(13):1783-1799, 2013.
- ICHINOSE, M. Differences of inflammatory mechanisms in asthma and COPD. **Allergology International** 58(3):307-313, 2009.
- JUNG, H. J. *et al.* Anticholinesterase and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibitory compounds from the heartwood of *Juniperus chinensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 63(11):955-960, 2015.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- LABAKI, W. W.; HAN, M. K. Chronic respiratory diseases: a global view. **The Lancet Respiratory Medicine** 8(6):531-533, 2020.
- LEE, S. *et al.* Anti-estrogenic activity of lignans from *Acanthopanax chiisanensis* root. **Archives of Pharmacy Research** 28(2):186-189, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- MANSOOR, T. A. *et al.* Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells. **Phytomedicine** 20(10):923-929, 2013.
- MATSUBARA, H. Studies on synergist for insecticides. (XXVII): on the synergistic effect of several lignans on pyrethrins and allethrin. **Bulletin of the Institute for Chemical Research** 50(3):197-205, 1972.
- OLIVEIRA, T. L. S. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract, fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acariçoba) – Araliaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 95(1):837-846, 2017a.
- OLIVEIRA, T. L. S. *et al.* Electrochemical behavior and antioxidant activity of hibalactone. **International Journal of Electrochemical Science** 12(1):7956-7964, 2017b.
- OLIVEIRA, M. T. de. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação da hibalactona isolada das partes subterrâneas de *Hydrocotyle umbellata* L. (Araliaceae) e otimização da sua extração por ultrassom**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.
- OLIVEIRA, M. G. *et al.* HPLC-PDA method validated for the determination of hibalactone in *Hydrocotyle umbellata* subterraneous parts and its ultrasound-assisted extraction optimization. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 29(2):162-170, 2019.
- PATEL, K. Os modelos animais de asma. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion** 1, 2014.

- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: Texto e Atlas – correlações com biologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- SANTANA, S. A. **Estudo Farmacognóstico da Acariçoba, *Hydrocotyle umbellata* L. Araliaceae**. 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.
- SÉFARA-SOUSA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 15(4):617-626, 2013.
- SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 21(1):28-38, 2001.
- SOLÉ, D. *et al.* Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista de Pediatria** 32(1):114-125, 2014.
- SORIANO, J. B. *et al.* Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. **The Lancet Respiratory Medicine** 8(6):585-596, 2020.
- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181(1):1-20, 2016.
- TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **A Cancer Journal for Clinicians** 65(2):87-108, 2015.
- TOSTES, R. C. A. *et al.* Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in aorta from deoxycorticosterone acetate hypertensive rats: functional assessment with cyclopiazonic acid. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 73(11):1536-1545, 1995.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education** 27(1-4):201-206, 2003.
- XIE, M. *et al.* Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. **Respiratory Research** 21(1):1-13, 2020.
- YOON, J. S. *et al.* Neuroprotective lignans from *Biota orientalis* leaves. **Natural Product Science** 14(3):167-170, 2008.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. **Química Nova** 33(6):1421-1428, 2010.