



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORELAXANTE DAS FOLHAS DE
Caryocar brasiliense CAMB. EM AORTA TORÁCICA DE RATOS**

LAIS MORAES DE OLIVEIRA

**GOIÂNIA-GO
2012**

LAIS MORAES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORELAXANTE DAS FOLHAS DE
Caryocar brasiliense CAMB. EM AORTA TORÁCICA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini

GOIÂNIA-GO

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

Oliveira, Lais Moraes de.

O482a Avaliação do efeito vasorelaxante das folhas de
Caryocar brasiliense Camb. em aorta torácica de ratos
[manuscrito] / Lais Moraes de Oliveira. - 2012.
58 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas e siglas.

1. *Caryocar brasiliense*. 2. Aorta torácica – *Caryocar
brasiliense* – Vasorrelaxante. I. Título.

CDU: 582.687.16:615.22

LAIS MORAES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORELAXANTE DAS FOLHAS DE *Caryocar
brasiliense* CAMB. EM AORTA TORÁCICA DE RATOS**

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Paulo César Ghedini
(Orientador)**

**Profa. Dra. Marilise Escobar Bürger
Universidade Federal de Santa Maria**

**Profa. Dra. Núbia de Souza Lobato
Universidade Federal de Goiás**

Aprovada em: ____/____/____

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

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

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Lais Moraes de Oliveira		
E-mail:	lamodeli@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Avaliação do efeito vasorelaxante das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. em aorta torácica de ratos		
Palavras-chave:	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb., aorta torácica, vasorelaxante, óxido nítrico, dependente do endotélio.		
Título em outra língua:	Evaluation of vasorelaxant effect of leaves <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. in the thoracic aorta of rats.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb., thoracic aorta, vasorelaxant, nitric oxide, endothelium-dependent.		
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	17/07/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia		
Orientador (a):	Paulo César Ghedini		
E-mail:	pcghedini@gmail.com		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

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

Data: ___ / ___ / ___

Assinatura do (a) autor (a)

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

Dedicatória

Pelos valores que me ensinaram, todas as conquistas da minha vida sempre serão dedicadas aos meus pais, José e Luzinete.

A minha irmã, Thais, pelo companheirismo e amor a mim dedicados.

A minha sobrinha Larínia, simplesmente por existir e tornar a minha vida mais colorida.

Ao meu amor, Julio, por todo carinho, compreensão e acima de tudo por tomar como seus todos os meus propósitos.

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade da vida e pelas bênçãos concedidas.

Ao Professor Paulo César Ghedini, meu estimado orientador, obrigado pela dedicação, apoio e incentivo durante toda a realização desse trabalho. Sem a sua contribuição e ajuda este trabalho não teria se realizado e meu sonho não teria se concretizado.

Ao meu co-orientador, Professor Fernando Paranaíba Filgueira, por tudo que me ensinou, por construir comigo este trabalho com paciência e sabedoria. Sua co-orientação foi valiosíssima.

A minha querida Professora Vanessa Oliveira Leitão pela oportunidade e confiança.

A meus pais, a quem tudo devo, pelo amor e apoio incondicionais, por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e objetivos e por acreditarem que sou capaz.

A minha irmã, pelo carinho, apoio, incentivo e também por me conceder a honra de ter uma afilhada, minha pequena estrelinha Larínia.

Ao meu namorado, por todo amor, carinho, paciência e dedicação, por estar ao meu lado em todos os momentos, fáceis e difíceis e, principalmente por ser o apoio necessário para que eu chegasse até aqui.

Ao minhas amigas Dalila, Carina e Gabriela, muito obrigada pela amizade de vocês.

A Aline, pela importante contribuição na realização dos experimentos e pela convivência agradável e amiga.

A minha turma de mestrado, especialmente Elaine e Leandro, pelo carinho, força e presença constante.

A todos os amigos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular: Aline, Leandro, Kaison, Mariana, Jane, Athamy, Moisés, Lya, Karla, Thiago, Andréa,

Denise, Professor Erick e Luciana, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por proporcionarem momentos tão agradáveis.

A todas as meninas do Laboratório de Fisiologia Autônômica e Cardíaca, obrigada pelos momentos de alegria e risadas, foi um prazer enorme conhecer vocês.

A todos do Laboratório de Fisiologia de Órgãos Isolados, especialmente ao Professor Carlos Henrique Castro que gentilmente nos cedeu o laboratório para a realização dos experimentos. E a Professora Elizabete, Deny, Gisele, Álvaro, Juliana, Larissa, Pedro, muito obrigada por tornarem os dias de experimentos menos cansativos.

A todos os meus professores, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

A coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia, em especial a Gleizilene, que desde o primeiro instante sempre me tratou com muito carinho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela ajuda financeira que me foi concedida.

A Universidade Federal de Goiás por oferecer um programa de pós-graduação com excelente qualidade.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho, a todos a minha mais sincera gratidão.

Muito Obrigada!

*É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

SUMÁRIO

Dedicatória	IV
Agradecimentos	V
Lista de Figuras	X
Lista de Abreviaturas e Siglas	XI
Resumo	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Bioma Cerrado	3
1.2 <i>Caryocar brasiliense</i> Camb	4
1.3 Regulação do Tônus Vascular	8
1.3.1 Óxido Nítrico	9
1.3.2 Prostaciclina	11
1.3.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Geral	16
3.2 Específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Material Botânico	18
4.2 Obtenção do Extrato Bruto Hidroalcoólico	18
4.3 Obtenção das Frações Orgânicas	18
4.4 Animais	20
4.5 Drogas e Reagentes	20
4.6 Reatividade Vascular	20
4.7 Protocolos Experimentais	21
4.7.1 Avaliação do efeito do EBH e frações orgânicas de <i>C. brasiliense</i> frente às contrações induzidas por Phe em anéis de aorta isolada de rato.	21
4.7.2 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasorelaxante da FB	22
4.7.3 Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante do FB	22
4.7.4 Avaliação da participação de prostanóides vasodilatadores e canais	

de potássio no efeito vasorelaxante da FB	22
4.7.5 Avaliação do papel dos receptores muscarínicos e histaminérgicos no efeito vasorelaxante da FB	23
4.8 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Avaliação do efeito do EBH e frações orgânicas de <i>C. brasiliense</i> frente às contrações induzidas por Phe em anéis de aorta isolada de rato	25
5.2 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasorelaxante da FB	26
5.3 Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da FB	27
5.4 Verificação da participação de prostanóides vasodilatadores e canais de potássio no efeito vasorelaxante da FB	28
5.5 Avaliação do papel dos receptores muscarínicos e histaminérgicos no efeito vasorelaxante da FB	29
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb. (Pequizeiro).....	5
Figura 2	Fatores relaxantes produzidos pelo endotélio vascular.....	13
Figura 3	Fluxograma do fracionamento e obtenção das frações orgânicas a partir do EBH das folhas de <i>C. brasiliense</i>	19
Figura 4	Curvas concentração efeito para extrato bruto hidroalcoólico e frações orgânicas de <i>C. brasiliense</i>	25
Figura 5	Curvas concentração efeito para FB de <i>C. brasiliense</i> em anéis aórticos de ratos com endotélio e sem endotélio.....	26
Figura 6	Curvas concentração efeito da FB de <i>C. brasiliense</i> em anéis aórticos na ausência ou presença de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) ou ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel).....	27
Figura 7	Vasorelaxamento promovido pela FB na ausência ou na presença de indometacina (inibidor da ciclooxigenase) ou tetraetilamônio (TEA, bloqueador não seletivo de canal de potássio).....	28
Figura 8	Vasorelaxamento induzido pela FB antes e após a incubação com atropina (antagonista de receptor muscarínico) ou pirilamina (antagonista de receptor histaminérgico H ₁).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
BH₄	Tetrahidrobiopterina
<i>C. brasiliense</i>	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CCE	Curva concentração efeito
CE₅₀	Concentração que promove 50% do efeito máximo de uma substância
COX	Ciclooxigenase
COX – 1	Ciclooxigenase – 1
COX – 2	Ciclooxigenase – 2
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsufóxido
e.p.m.	erro padrão da média
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico
EDHF	do inglês <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> (fator hiperpolarizante derivado do endotélio)
EDRF	do inglês <i>endothelium-derived relaxing factor</i> (fator relaxante derivado do endotélio)
E_{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Flavina dinucleotídeo
FAE	Fração acetato de etila
FB	Fração butanólica
FC	Fração clorofórmica
FH	Fração hexânica

FMN	Flavina mononucleotídeo
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de 3',5' guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP₃	Inositol 1, 4, 5, trifosfato
K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{Ca}	Canais de potássio dependentes de cálcio
L-NAME	N ω – nitro-L-arginina metil éster
mmHg	Milímetro de mercúrio
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODQ	1-H-[1, 2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PG	Prostaglandina
Phe	Fenilefrina
PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
RP	Resistência periférica
TEA	Tetraetilamônio
TXA₂	Tromboxano A ₂

RESUMO

Caryocar brasiliense Camb. (“pequi”) é uma planta nativa do Cerrado Brasileiro que apresenta diversos componentes bioativos. Dados da literatura demonstraram que a suplementação dietética à base de pequi diminuiu a pressão arterial de atletas voluntários. Neste trabalho, avaliou-se o efeito vasorelaxante do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *C. brasiliense* e de suas frações orgânicas (hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE), butanólica (FB)) em preparações de aorta torácica de ratos. O EBH relaxou, de modo concentração-dependente, anéis de aorta torácica pré-contraídos com fenilefrina, sendo que a FB promoveu efeito semelhante ao observado com o EBH. O relaxamento aórtico induzido pela FB foi abolido pela remoção do endotélio vascular, pela incubação prévia do inibidor da sintase de óxido nítrico (L-NAME) e pelo inibidor da guanilato ciclase (ODQ). Entretanto, a incubação das preparações aórticas com atropina (antagonista muscarínico) e pirlamina (antagonista histaminérgico H₁) não inibiu o vasorelaxamento induzido pela FB. Este efeito também não foi inibido pela indometacina (inibidor da ciclooxigenase) ou pelo tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canais de potássio). O efeito vasorelaxante da FB, em anéis aórticos com endotélio e pré-contraídos com KCl, foi reduzido após a incubação com L-NAME. Conjuntamente, os resultados demonstram que o efeito vasorelaxante *in vitro* de *C. brasiliense* em aorta torácica de ratos envolve a estimulação da via do óxido nítrico/GMP cíclico.

Palavras-Chave: *Caryocar brasiliense* Camb., aorta torácica, vasorelaxante, óxido nítrico, dependente do endotélio.

ABSTRACT

Caryocar brasiliense Camb. (“pequi”) is a native plant from the Cerrado region of Brazil that contains several bioactive components. Data from literature has demonstrated that dietary supplementation with pequi decreased the arterial pressure of volunteer athletes. In this work, we evaluated the vasorelaxant effect of the crude hydroalcoholic extract (CHE) of *C. brasiliense* leaves, and its organic fractions (hexane (HF), chloroform (CF), ethyl acetate (AEF), butanol (BF)), in the rat thoracic aorta. We found that CHE completely relaxed, in a concentration-dependent manner, rat aortic rings precontracted with phenylephrine, while butanolic fraction (BF) produced an effect similar to that of the CHE. Induced aortic relaxation BF by was abolished by endothelium removal, by incubation with the nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME), and the soluble guanylate cyclase inhibitor (ODQ). However, incubation with either atropine (a muscarinic receptor antagonist) or pyrilamine (a histamine H1-receptor antagonist) had no effect on the BF-induced vasorelaxation. Moreover, this effect was not inhibited by indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) and tetraethylammonium (a non-selective K⁺ channel blocker). The vasorelaxation induced by BF in endothelium-intact aortic rings precontracted with KCl was reduced after incubation with L-NAME. Taken together, the results reveal that *C. brasiliense* possesses in vitro vasorelaxant effect in rat thoracic aorta and this effect involves stimulation of the nitric oxide/cyclic GMP pathway.

Key Words: *Caryocar brasiliense* Camb., thoracic aorta, vasorelaxant, nitric oxide, endothelium-dependent.

Introdução

A utilização de plantas medicinais na saúde humana é uma prática milenar (ALVIM *et al.*, 2006). Dados da literatura científica registram que diversas civilizações, entre elas babilônicos e sumerianos, já usavam em seus remédios as folhas, as flores, as cascas e as raízes de lótus, alho e oliveira (DEVIIENNE *et al.*, 2004).

A denominação “planta medicinal” é utilizada para todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Além do mais, as plantas medicinais representam fontes de obtenção de moléculas farmacologicamente ativas ou que sirvam de protótipos para a criação de fármacos, sendo assim, importante objeto de estudo para a descoberta de novos fármacos.

Lima e colaboradores (2007a) consideram que existem de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, porém, apesar dessa ampla utilização, muitos desses vegetais não tiveram seus princípios ativos identificados a fim de validá-las como fitofármacos (BERG, 1993). Deste modo, existe ainda um imenso número de espécies de plantas superiores que não

foram estudadas do ponto de vista químico ou farmacológico que podem ser promissoras na busca por novas alternativas de tratamento das doenças.

Sabe-se que o estudo de plantas medicinais foi e continua sendo a base para o desenvolvimento de vários fármacos incluídos na terapêutica atual devido à riqueza de suas biomoléculas (HARVEY, 2007). Levando-se em consideração que o Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo, o mesmo torna-se um importante e potente provedor de recursos naturais, possuindo cerca de 30% das espécies de plantas conhecidas no mundo, distribuídas em seus diferentes ecossistemas (MYERS *et al.*, 2000). Sendo assim, a flora brasileira representa uma fonte potencial de agentes fitoterápicos e de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos (GURIB-FAKIM, 2006).

1.1 Bioma Cerrado

Ocupando a região Central do Brasil, o Cerrado abrange uma área de cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados, ocupando cerca de 21% do território nacional e é a segunda maior biodiversidade da América do Sul (Instituto Cerrado e Sociedade, 2011). Em sua área central, o Cerrado limita-se a quase todos os biomas, existindo encaves de Cerrado na Amazônia, na Caatinga e na Mata Atlântica (RODRIGUES, 2005), possuindo coberturas do bioma situadas nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Piauí, São Paulo, Tocantins, além do Distrito Federal. Ocorre também em áreas ao norte, nos Estados do Amapá, Amazonas e ao sul em pequenas áreas do Paraná (RIBEIRO e WALTER, 1998; SANO *et al.*, 2008).

Esse bioma consiste em uma variedade heterogênea de espécies vegetais (SILVA *et al.*, 2006), que distribui-se desde a vegetação savânica com árvores de pequeno porte e campos a uma floresta mesofítica. Tem sua vegetação rasteira formada principalmente por gramíneas existindo, ao mesmo tempo, árvores esparsas com pequeno porte, troncos tortuosos, cascas grossas e folhas largas. Sendo a vegetação predominada por sua adaptação à seca, apresenta raízes com profundidades superiores a 10 metros, crescimento radicular nas primeiras etapas de desenvolvimento e germinação das sementes na época de chuva (PINTO e OLIVEIRA-FILHO, 1999)

O clima da região do Cerrado caracteriza-se como tropical estacional e apresenta duas estações bastante definidas, invernos secos e verões chuvosos (SANTANA e NAVES, 2003), apresentando nos solos características químicas comuns, como elevada acidez, alta deficiência de nutrientes, toxidez de alumínio e baixa capacidade de troca de cátions (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Marouelli (2003) destaca que o acúmulo de água nos lençóis freáticos do Cerrado do Centro-Oeste abastece nascentes que dão origem a seis das oito maiores bacias hidrográficas brasileiras, uma abundância hídrica que contribui para o aumento da variabilidade de espécies.

Segundo Mendonça e colaboradores (1998), o Cerrado apresenta cerca de 6.671 espécies nativas de plantas vasculares, tornando a flora do Cerrado a mais diversa entre as savanas tropicais do mundo. Mesmo sendo a mais diversificada savana do mundo, vários fatores tem causado a fragmentação do Cerrado, sobretudo em decorrência da expansão urbana, construção de barragens, queimadas, entre outros (MAROUELLI, 2003). Sua acelerada fragmentação tem reduzido drasticamente a área do bioma, além de colocar em risco a sobrevivência de várias espécies como, catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. ex de Souza), mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul), espécies que possuem alto valor terapêutico e que são amplamente utilizadas pela população para fins medicinais (PEREIRA *et al.*, 2007).

A busca por novas fontes de fármacos como alternativa aos tratamentos já utilizados e que representem opção mais econômica, menos efeitos colaterais ou para elucidar novos mecanismos de ação, tem levado à identificação de diversas espécies nativas do Cerrado com potencial de obtenção de substâncias de interesse farmacológico, tais como: *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (PAULA *et al.*, 2010), *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (GUIMARÃES *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2011), *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil (BARBOSA *et al.*, 2012) e da espécie objeto deste estudo, *Caryocar brasiliense* Camb. (de PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008), entre outras.

1.2 *Caryocar brasiliense* Camb.

Caryocar brasiliense Camb. é popularmente conhecida como pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequeri e suari

(GIORDANI, 2010). O termo “pyqui” tem origem na língua Tupi, significando casca (py) e espinho (qui). Esta árvore, que é símbolo do Cerrado brasileiro, pertence à família Caryocaraceae e ao gênero *Caryocar* L. Segundo Oliveira (1988), *Caryocar brasiliense* Camb. tem ocorrência nos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Tocantins e São Paulo.

A espécie é caracterizada como uma árvore frondosa, que apresenta copa variando de 6 a 8 metros de diâmetro e altura que pode ultrapassar 10 metros (NAVES, 1999). Possui tronco tortuoso com casca áspera e rugosa, com espessura de 30 a 40 cm de diâmetro (RIZZINI, 1971). Seus galhos são grossos, compridos e inclinados resultando em uma copa esbelta. As folhas são opostas, trifolioladas com uma cor verde brilhante e textura coriácea (MAGALHÃES *et al.*, 1988; ALMEIDA *et al.*, 1998) (Figura 1).



Figura 1: *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi) (FRAGA, 2012)

O fruto do pequi é uma drupa globosa, formada por um epicarpo verde que recobre de um a quatro pirênios, conhecidos como caroços, e o mesocarpo que se subdivide em externo (coriáceo carnosos) e interno (parte comestível, amarelo e carnosos), envolvendo o endocarpo lenhoso, espinhoso e amêndoa branca ou semente (ALMEIDA *et al.*, 1998).

A madeira, considerada de boa qualidade, é de cor amarelo-parda e apresenta grande resistência aos agentes de deterioração. É utilizada na construção civil na fabricação de móveis rústicos, caibros e dormentes. Por ter alto poder calorífico e de teor de carbono fixo, a árvore é usada também na produção de carvão para siderúrgicas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Devido ao alto grau de taninos, as cascas e as folhas do pequi são utilizadas pela indústria de tintas (DOMBROSKI, 1997).

O fruto, a casca e o mesocarpo verde, além das folhas, são utilizados como ração animal para a alimentação de bovinos e caprinos nos estados de Minas Gerais e Goiás (KERR *et al.*, 2007). As flores, por terem grande beleza, são empregadas na ornamentação (ARAÚJO *et al.*, 1995) porém, também são importantes na alimentação de animais silvestres, como paca, veado-campeiro e mateiro (ALMEIDA *et al.*, 1998). Extraído da polpa e da amêndoa do fruto, o óleo apresenta aplicabilidade na indústria cosmética para a produção de sabonetes e cremes, além de apresentar utilidade na produção de combustíveis e lubrificantes (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O mesocarpo do fruto, por sua vez, é utilizado no preparo de sucos, sorvetes, licores, geléias e outros pratos tradicionais (LORENZI, 2000).

A polpa do fruto, por ser rica em vitaminas A e E, é utilizada na medicina popular para o tratamento de gripes e resfriados. A gordura da semente é empregada na culinária regional e na medicina folclórica para o tratamento de afecções das vias respiratórias, como coqueluche, asma e bronquite (BRANDÃO *et al.*, 2002; RIBEIRO 1996). O decocto das folhas e flores é utilizado como energético, fortificante, afrodisíaco e contra doenças do fígado. As cascas da árvore e dos frutos são utilizadas como febrífugas e diuréticas (de PAULA e SALES, 2000). O óleo da polpa pode ser usado no controle de tumores e também para o tratamento de problemas oftalmológicos (ALMEIDA e SILVA, 1994).

A caracterização química evidenciou que, tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi, são ricas em lipídios (predominando os ácidos graxos oléico e palmítico) (LIMA *et al.*, 2007b) e apresentam teor elevado de fibra alimentar (sobretudo a pectina), compostos antioxidantes (ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides, licopeno, taninos e flavonóides) e sais minerais (ferro, cálcio, cobre, zinco, entre outros) (PEREIRA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007a).

Magalhães e colaboradores (1988) detectaram a presença de heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, flavonóides, esteróides e osídios

redutores em folhas de *C. brasiliense*. Oliveira e colaboradores (1968) identificaram a presença dos compostos friedelina, friedelanol, β -sitosterol, estigmasterol, ácido elágico, β -amirina e ácido oleanólico no extrato etanólico das folhas.

A presença dos compostos ácido gálico, ácido quínico e quercetina, agentes descritos com potencial antioxidante, foram identificados no extrato etanólico dos frutos do pequi (ROESLER *et al.*, 2008). Já no óleo do fruto, foram encontrados os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oléico e linoléico (FERREIRA e MOTIDOME, 1962). Ainda em relação ao fruto, foram identificados os principais carotenóides presentes no mesocarpo interno: β -caroteno, α -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina (RAMOS *et al.*, 2001).

Quanto ao potencial farmacológico do pequi, vários estudos demonstraram seu potencial farmacológico. De acordo com Bezerra e colaboradores (2002), o extrato etanólico da casca e das folhas de *C. brasiliense* apresentou atividade tóxica contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente causador da esquistossomose humana.

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de *C. brasiliense* sobre *Cryptococcus neoformans*, demonstrou que o extrato bruto etanólico das folhas foi capaz de inibir completamente o crescimento do fungo (PASSOS *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que o extrato bruto etanólico da casca de *C. brasiliense* reduziu significativamente o número de parasitas circulantes de *Tripanossoma cruzi* no sangue de humanos (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002).

Roesler e colaboradores (2007) demonstraram que os extratos etanólico e aquoso da casca do pequi possuem excelente capacidade para sequestrar radicais livres, ou seja, atividade antioxidante. Khouri e colaboradores (2007) demonstraram que o extrato aquoso da polpa do fruto de *C. brasiliense* foi capaz de inibir danos promovidos pela bleomicina no ácido desoxirribonucleico de camundongos, sugerindo um possível efeito anticlastogênico. Testes realizados com compostos isolados das folhas de *C. brasiliense* em camundongos portadores do sarcoma 180, evidenciaram o efeito inibidor do ácido oleanólico sobre o desenvolvimento do tumor (OLIVEIRA *et al.*, 1970).

A suplementação dietética de atletas voluntários com cápsulas contendo óleo de pequi evidenciou que o mesmo foi biologicamente eficiente em reduzir a inflamação provocada pelo exercício agudo. Também foi observada queda significativa nos valores da pressão arterial, de colesterol total e LDL pós-prandial,

sugerindo que o pequi apresenta efeitos cardiovasculares protetores, principalmente em atletas incluídos na faixa etária de maior risco (MIRANDA-VILELA, 2009). A informação sobre o efeito do pequi em reduzir a pressão arterial constituiu a base para a realização deste estudo.

1.3 Regulação do Tônus Vascular

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de mortalidade no Brasil e no mundo e, somente no ano de 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório no Brasil (MALTA *et al.*, 2009), indicando sua importância enquanto problema de saúde da população. Dentre as patologias cardiovasculares que mais acometem a população estão as doenças arteriais coronarianas, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (MOURA *et al.*, 2006).

Considerada o tipo mais comum de DCV (TOM *et al.*, 2010), a HAS é uma patologia associada a vários fatores, cuja caracterização se dá pela constante presença de níveis elevados de pressão arterial (PA), sendo uma condição clínica associada frequentemente a alterações funcionais e estruturais de órgãos-alvo como, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão nas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH, 2010), pressão normal é a pressão arterial sistólica (PAS) inferior a 130 mm Hg e a pressão arterial diastólica (PAD) menor que 85 mm Hg. O paciente é considerado hipertenso em estágio 1 quando a PAS varia entre 140 -159 mmHg e a PAD entre 90-99 mmHg, e hipertenso em estágio 2 se a PAS varia entre 160 -179 mmHg e a PAD entre 100 -109 mmHg. Caso a PAS alcance valores maiores ou iguais a 180 mmHg e a PAD valores maiores ou iguais a 110 mmHg a hipertensão é considerada em estágio 3.

A PA é o produto do débito cardíaco e da resistência periférica ao fluxo de sangue ($PA = DC \times RP$). Sendo a PA correspondente à força que o sangue bombeado pelo coração exerce contra a parede distensível dos vasos, é determinada pelo volume de sangue que sai do coração (DC) e a resistência que ele encontra para circular na periferia (RP). Alterações no débito cardíaco (frequência de batimentos, volume sanguíneo ou força de contração) modificam a pressão arterial.

Da mesma forma, variações do tônus vascular são acompanhadas de modificação da pressão arterial, induzindo a alterações patológicas (GUYTON e HALL, 2006).

O endotélio vascular reveste a superfície luminal de todos os vasos do sistema vascular, localizando-se na interface entre o sangue/tecido, desempenhando diversas funções relacionadas à homeostase vascular (MICHIELS, 2003; BREVETTI *et al.*, 2008). O endotélio não é apenas uma barreira física, ele apresenta múltiplos papéis importantes em eventos fisiológicos, como: controle do tráfego de pequenas e grandes moléculas, auxílio na formação e remoção de coágulos, promove o crescimento do músculo liso vascular, adesão de leucócitos, além de ser uma fonte de potentes mediadores químicos capazes de controlar a contração do músculo liso subjacente (CARVALHO *et al.*, 2001; LANDMESSER *et al.*, 2004; RUBIO e MORALES-SEGURA, 2004). Todos esses efeitos fisiológicos podem ser mediados por estímulos mecânicos (estresse de cisalhamento) e estímulos hormonais, que promovem a liberação de substâncias vasodilatadoras, vasoconstritoras, anti-agregantes plaquetárias e antiinflamatórias (ENDERMANN e SCHIFFRIN, 2004).

As células endoteliais geram diversos compostos vasodilatadores e vasoconstritores que participam da regulação do tônus vascular. Dentre os vasoconstritores liberados pelo endotélio pode-se destacar a endotelina-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988), o tromboxano A₂ (ELLIS *et al.*, 1976), o ânion superóxido (VANHOUTTE, 1988), e a angiotensina II (VELTMAR *et al.*, 1991). Dentre os potentes mediadores químicos que relaxam a musculatura lisa vascular, os principais produzidos pelo endotélio são o óxido nítrico (do inglês *nitric oxide* – NO), prostanóides vasodilatadores e o fator de hiperpolarização derivado do endotélio (do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor* – EDHF) (GRIFFITH *et al.*, 1987; PALMER e MONCADA, 1987; MONCADA *et al.*, 1991). Devido à importância dos mediadores vasodilatadores para este estudo, os principais serão melhor detalhados a seguir.

1.3.1 Óxido Nítrico (NO)

A participação do endotélio no processo de vasodilatação foi apresentada por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a retirada mecânica ou química do endotélio em artérias isoladas de coelho abolia a vasodilatação induzida

pela acetilcolina (ACh) e que este efeito vasorelaxante ocorria devido à liberação pelo endotélio de uma substância que recebeu o nome de fator relaxante derivado de endotélio (do inglês *endothelium-derived relaxing factor* – EDRF). Estudos posteriores realizados por Ignarro (1986), com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF, propuseram que este seria o NO, uma vez que o relaxamento vascular era induzido pelo mesmo mecanismo biológico, além de apresentar características químicas semelhantes.

O NO é um dos mediadores vasculares mais importantes produzidos pelo endotélio, sendo a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a isoforma enzimática predominante no endotélio e a responsável pela produção da maior parte do NO neste tecido. Além da eNOS existem outras isoformas, como a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (PALMER e MONCADA, 1987), que são codificadas por genes distintos e possuem em torno de 53% de homologia com a eNOS (NATHAN e XIE, 1994).

A eNOS cataliza a formação de NO a partir da conversão do aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a perda de cinco elétrons com a participação de dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida (NADPH), L-arginina e oxigênio molecular como substratos, flavina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), tetrahydrobiopterina (BH₄) e do complexo Ca²⁺ /calmodulina como cofatores (SCHULZ e TRIGGLE, 1994; MALINSKI, 2005).

O NO é um gás de meia vida curta (2 a 5 segundos) e a estimulação das células endoteliais induzindo a sua síntese pode ocorrer em resposta a estimulação de diferentes receptores para uma variedade de mediadores neuro-humorais, como por exemplo, a ACh, a bradicinina, o difosfato de adenosina (ADP), a substância P, serotonina ou também por estímulos físicos, quando há um estresse de cisalhamento mecânico, exercido pelo fluxo sanguíneo sobre a camada endotelial (MONCADA *et al.*, 1991; FLEMING *et al.*, 1998; DIMMELER *et al.*, 1999; FLEMING e BUSSE, 2003).

Nos vasos sanguíneos, o mecanismo de síntese do NO se inicia com o acoplamento de um agonista a um receptor específico localizado na membrana das células endoteliais, essa ligação provoca a ativação da fosfolipase C (PLC), por intermédio de uma proteína G. Uma vez ativada, a PLC promove a hidrólise dos fosfolipídeos fosfatidil-inositol bifosfato (PIP₂) presentes na membrana celular, dando origem ao inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP₃) e ao diacilglicerol (DAG) (GRIFFITH *et al.*,

1987). O IP_3 age nos estoques intracelulares de Ca^{2+} induzindo a liberação deste íon, o qual, ligado à calmodulina, estimula a eNOS (MONCADA *et al.*, 1989). Após a formação, o NO rapidamente se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas vasculares causando a estimulação da guanilil ciclase solúvel (GCs), sua ativação gera o aumento da concentração citosólica de monofosfato cíclico de 3',5' guanosina (GMPc), e este por sua vez, ativa a proteína quinase G (PKG) que reduz a concentração de Ca^{2+} intracelular (IGNARRO *et al.*, 1987; RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT e MURAD, 1983).

Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz a vasodilatação incluem inibição da geração do inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), desfosforilação da quinase da cadeia leve de miosina, ativação dos canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}), que ao promover o efluxo deste íon favorece a hiperpolarização da célula e o relaxamento muscular. Outro mecanismo ocorre através da redução de fluxo de Ca^{2+} através da inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes e pela ativação da proteína quinase I, que fosforila as proteínas presentes no retículo endo/sarcoplasmático promovendo o sequestro do Ca^{2+} intracelular para o interior do retículo, mediado pela ATPase reticular (WALFORD e LOSCALZO, 2003; IGNARRO *et al.*, 1987).

A redução na produção ou na biodisponibilidade de NO pode ser um dos mecanismos que contribui para o aumento da resistência vascular periférica e o desenvolvimento da HAS em diferentes modelos experimentais e também em humanos (MCINTYRE *et al.*, 1999).

1.3.2 Prostaciclina (PGI_2)

A prostaglandina I_2 (PGI_2) ou também chamada de prostaciclina é o produto mais abundante do ácido araquidônico produzido pelo tecido, sendo considerada um potente vasodilatador e inibidor endógeno de agregação plaquetária (MONCADA e VANE, 1979; VANE *et al.*, 1990).

A PGI_2 é um lipídio que possui 20 carbonos derivados do ácido araquidônico, produzida pela ação da enzima ciclooxigenase (COX). Existem duas isoformas da ciclooxigenase, denominadas ciclooxigenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese de prostaglandinas (PG) e de tromboxano A_2 (TXA_2) (SMITH *et al.*, 1996).

A síntese da PGI₂ é iniciada pela ação da enzima fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidios de membrana, promovendo a liberação do ácido araquidônico que os compõe. As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em PGH₂ e esta por ação de sintases específicas é convertida em PGE₂, PGI₂, PGF₂α, PGD₂ ou TXA₂ (MARDINI e FITZGERALD, 2001; MONCADA *et al.*, 1976; ZELIS, 1983).

Uma vez produzida e liberada, a PGI₂ ativa receptores do tipo IP, um receptor acoplado a proteína G, estimulando a adenilato ciclase, promovendo o aumento do AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), segundo mensageiro que ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA reduz os níveis de Ca²⁺ citoplasmático, diminuindo a sensibilidade do aparelho contrátil da musculatura lisa vascular ao Ca²⁺, impedindo a interação actina-miosina e promovendo consequente relaxamento do músculo liso vascular (HOPKINS e GORMAN, 1981; SALVEMINI *et al.*, 1994; BENNETT, 1995). A PKA exerce um efeito similar a PKG, podendo ativar canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) ocasionando hiperpolarização e estimulação da saída de Ca²⁺ do citosol inibindo a maquinaria contrátil (CARVALHO *et al.*, 2001).

1.3.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)

Outro fator relaxante derivado do endotélio, além do NO e PGI₂, é o EDHF que recebe este nome por sua ação estar relacionada com a hiperpolarização celular (BOLTON *et al.*, 1984; FELETOU e VANHOUTTE, 1988). Sua liberação pode ser estimulada por diferentes agentes, em geral, ocorre principalmente pelo aumento do Ca²⁺ intracelular que, depois de ser liberado, promove vasodilatação por meio da abertura de canais de potássio ativados por Ca²⁺ (FELETOU e VANHOUTTE, 2006), resultando na hiperpolarização da membrana celular, seguido pelo fechamento de canais para Ca²⁺ voltagem dependente e consequentemente a vasodilatação (NELSON e QUAYLE, 1995).

Entre os possíveis candidatos que podem atuar como EDHF estão o NO (de WIT *et al.*, 2000), radicais livres como H₂O₂ (SHIMOKAWA e MATOBA, 2004), epóxidos derivados do ácido araquidônico (ácido epoxieicosatrienóico), canabinóides endógenos e íons de potássio (GILLHAM *et al.*, 2003). Sugere-se também que o EDHF seja um fator difusível (FELETOU e VANHOUTTE, 1988) e que a hiperpolarização endotelial é transmitida para o músculo liso vascular através do

acoplamento elétrico direto das junções mioendoteliais (*gap junctions*) (CHAYTOR,1998).

Um resumo dos fatores vasorelaxantes produzidos pelo endotélio vascular e das vias envolvidas neste efeito é apresentado na Figura 2.

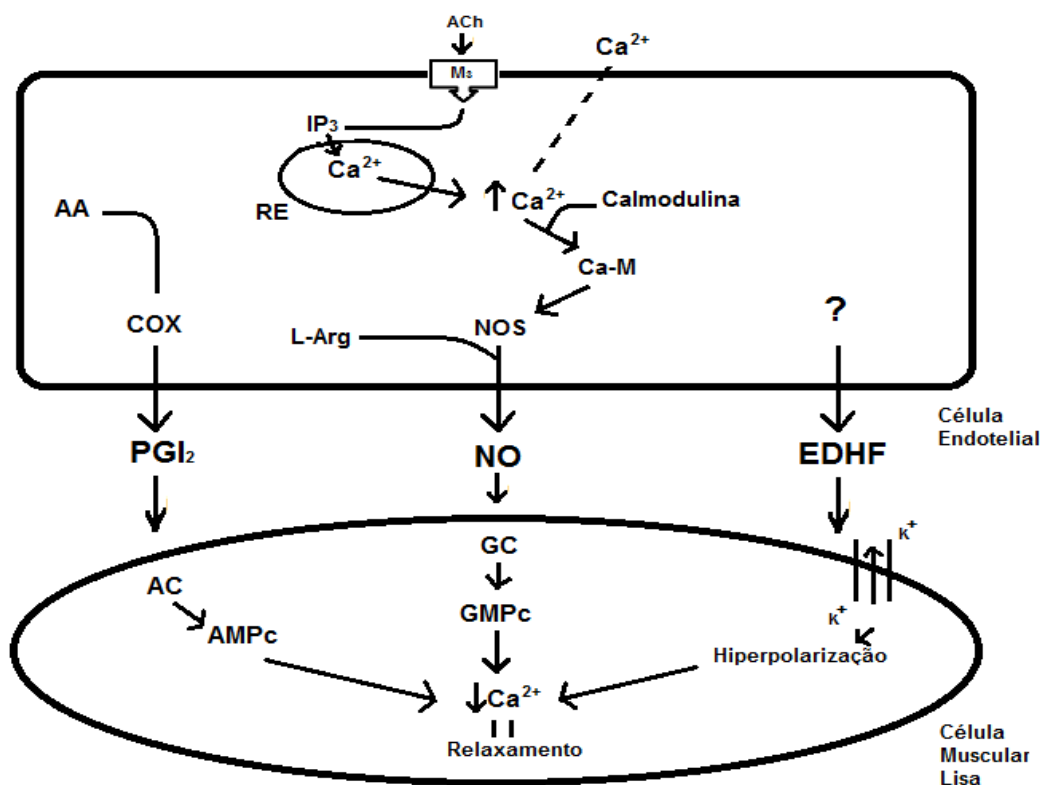


Figura 2: Fatores relaxantes produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh) que atua em receptores do tipo M₃, após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (Adaptado de STANKEVICIUS et al, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa com plantas medicinais tem colaborado para o desenvolvimento científico e enriquecido consideravelmente o arsenal terapêutico para o tratamento de várias doenças, sendo de vital importância que sejam realizados estudos no intuito de evidenciar os efeitos e estabelecer as características farmacológicas das espécies utilizadas na medicina popular, subsidiando o emprego seguro dessas plantas como alternativa aos tratamentos já utilizados e que possam representar opção mais econômica, com menos efeitos colaterais ou para elucidar novos mecanismos de ação.

Diante desta premissa e tendo em vista que a espécie objeto deste estudo, *C. brasiliense*, promoveu queda significativa nos valores da pressão arterial em humanos e que não constam da literatura outros dados, além deste, sobre o potencial farmacológico desta planta para o tratamento de doenças cardiovasculares, estudos neste sentido podem contribuir para a maior compreensão dos mecanismos farmacológicos envolvidos nesta ação, conferindo subsídios para uma possível utilização do pequi, ainda desconhecida, em condições patológicas relacionadas a distúrbios cardiovasculares.

Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito vasorelaxante “*in vitro*” do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. brasiliense* Camb. (EBH) e das frações orgânicas obtidas a partir do fracionamento do EBH.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do EBH sobre a reatividade vascular em preparação de aorta torácica de ratos.
- Determinar o efeito da(s) fração(ões) orgânica(s) ativa(s) obtidas a partir do EBH (hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica) sobre a reatividade vascular em preparação de aorta torácica de ratos.
- Selecionar a fração orgânica com melhor perfil de atividade vasorelaxante e, a partir desta, determinar o mecanismo de ação envolvido neste efeito.

Materiais e Métodos

4.1 Material Botânico

Folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. foram coletadas pelo Prof. Dr. Elson Alves Costa em setembro de 2010, na cidade de Gurupi, estado do Tocantins. O material botânico coletado foi identificado pelo Professor Dr. Aristônio Magalhães Teles do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG) e uma exsicata foi preparada e depositada no herbário da UFG sob o número 1353. As folhas foram secas à temperatura ambiente, posteriormente moídas e armazenadas a -20 °C.

4.2 Obtenção do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH)

O EBH foi obtido segundo a metodologia descrita por Maidana-Leguizamón (1992). A 50 g das folhas secas e moídas do pequi foram adicionados 1000 mL de solvente hidroalcoólico 70% (700 mL de etanol + 300 mL de água destilada), com agitação ocasional, durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi filtrado a vácuo e este processo foi repetido por três vezes para o total esgotamento da droga. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório a vácuo em temperatura inferior a 50°C e submetido à liofilização até atingir a completa pulverização. O material obtido foi armazenado a 4°C até o momento de utilização.

4.3 Obtenção das Frações Orgânicas

O extrato bruto hidroalcoólico liofilizado foi ressuspenso em água e sofreu partição em solventes com graus crescentes de polaridade, conforme o esquema mostrado na Figura 3, resultando nas seguintes frações: hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FB), sendo então concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida e em temperatura inferior a 50°C. Em seguida as frações foram levadas à secura em estufa a 40°C e armazenados em frascos âmbar sob refrigeração a 4°C até o momento do uso. O total obtido de resíduo seco para cada fração está apresentado na Figura 3. Para os experimentos, tanto o EBH quanto as frações foram dissolvidos em DMSO 5%, sendo que a concentração final do DMSO na cuba não excedeu 0,01%, sendo esta desprovida de qualquer efeito sobre os anéis de aorta torácica.



Figura 3: Fluxograma do fracionamento e obtenção das frações orgânicas a partir do EBH das folhas de *C. brasiliense*.

4.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 200 a 300 g, provenientes do Biotério Central da UFG.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas - ICB/UFG em condições controladas de temperatura (22-23°C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), recebendo água e ração *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com as normas institucionais do Comitê de Ética em Pesquisa/UFG através de projeto aprovado por este mesmo comitê (CEP/UFG 22/2011).

4.5 Drogas e Reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloreto de sódio (Synth), cloreto de potássio (Synth), cloreto de cálcio dihidratado (Vetec), sulfato de magnésio (Synth), fosfato de potássio monobásico (Impex), bicarbonato de sódio (Vetec), glicose (Synth), EDTA sal dissódico (Synth), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), fenilefrina (Phe) (Sigma), acetilcolina (ACh) (Sigma), N ω – nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma), indometacina (Sigma), tetraetilamônio (TEA) (Sigma), 1-H-[1, 2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma), atropina (Merck), pirlamina (Sigma), nitroprussiato de sódio (SNP) (Sigma). Indometacina foi dissolvida em etanol, ODQ foi dissolvido em DMSO e as outras soluções, incluindo a solução de Krebs-Henseleit modificada, foram preparadas em água destilada.

4.6 Reatividade Vascular

Os ratos foram eutanasiados e a aorta torácica foi cuidadosamente removida e colocada em um recipiente (placa de petri) contendo solução de Krebs-Henseleit modificada à 4° C (pH 7,4; composição em mM: NaCl - 130; NaHCO₃ - 14,9; KCl - 4,7; KH₂PO₄ - 1,18; MgSO₄ 7H₂O - 1,17; CaCl₂ 2H₂O - 1,6; glicose - 5,5). Foi retirado todo excesso de tecido conectivo e, a seguir, a aorta foi seccionada em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento. Os anéis vasculares foram

suspendidos por meio de hastes de aço inoxidável, em cubas de vidros (9 mL) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada sob temperatura constante de 37° C e aerada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força que, acoplado a um sistema computadorizado, permite o registro das contrações (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

As preparações permaneceram sob tensão de 1,5 g durante 60 minutos, período reservado para a estabilização, com trocas de líquido nutritivo e ajuste de tensão a cada 15 minutos. Após estabilização, foram adicionadas fenilefrina (Phe - 0,1µM para a verificação da responsividade vascular ao estímulo contrátil) e, na sequência, ACh (10µM para a confirmação da presença ou ausência de endotélio funcional nas preparações estudadas). Para a execução dos protocolos experimentais em aortas desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica coberta de algodão no lúmen do vaso. Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela ACh correspondeu a 90% e para anéis sem o endotélio, aqueles cujo relaxamento máximo produzido correspondeu a 10%.

Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada e mantidas em repouso por mais 60 minutos.

4.7 Protocolos Experimentais

4.7.1 Avaliação do efeito do EBH e frações orgânicas de *C. brasiliense* frente às contrações induzidas por Phe em anéis de aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, uma segunda resposta a Phe (0,1µM) foi obtida e, durante a fase tônica da contração resultante, foram construídas curvas concentração efeito (CCE) para o EBH ou para as frações orgânicas (FH, FC, FAE e FB) nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µg/ml. Cerca de 60 minutos após o término deste procedimento, induziu-se uma nova contração com Phe, seguida da adição por ACh (10µM), com o objetivo de avaliar se o EBH e as frações orgânicas

eram capazes de comprometer a integridade das preparações. O veículo (DMSO) também foi testado e a concentração final nas cubas não excedeu 0,01%.

Para dar seguimento ao estudo do mecanismo de ação envolvido com o efeito vasodilatador observado com as frações de *C. brasiliense*, selecionou-se a FB, uma vez que a mesma apresentou efeito mais significativo e semelhante ao promovido pelo EBH.

4.7.2 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasorelaxante da FB

Com o objetivo de avaliar o papel do endotélio no efeito da FB, investigamos a capacidade da FB em causar relaxamento vascular em anéis com endotélio e sem endotélio vascular. Ambos foram previamente contraídos com Phe (0,1 μ M) e em seguida CCE para a FB foi realizada. Ao final deste procedimento, em anéis sem o endotélio foi adicionado NPS (1 μ M), um doador de óxido nítrico, para produzirmos o relaxamento independente do endotélio, a fim de avaliar a viabilidade da preparação.

4.7.3 Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da FB

Após avaliação da presença ou ausência do endotélio, anéis de aorta com endotélio foram previamente incubados com L-NAME (100 μ M - inibidor não seletivo da NOS) durante 30 minutos. A seguir, os anéis aórticos foram pré-contraídos com Phe (0,1 μ M) ou KCl (120mM). Quando a resposta contrátil atingiu um patamar, CCE para a FB (0,1-30 μ g/ml) foram construídas. Além disso, para verificarmos a participação da GCs, anéis aórticos com endotélio funcional foram previamente incubados durante 30 minutos com ODQ (10 μ M), um inibidor da GCs. Após o período de incubação, as preparações foram contraídas com Phe (0,1 μ M) e então foi construída CCE com adição da FB (0,1-30 μ g/ml).

4.7.4 Verificação da participação de prostanóides vasodilatadores e canais de potássio no efeito vasorelaxante da FB

Após a confirmação da presença de endotélio vascular funcional, tecidos aórticos com endotélio funcional foram previamente incubados durante 30 minutos

com indometacina (10 μM - um inibidor não seletivo da COX) ou tetraetilamônio (TEA, 1 mM - um inibidor não seletivo dos canais de potássio). Após o período de incubação, induziu-se uma contração com Phe (0,1 μM) e na fase tônica desta contração adicionou-se FB (0,1 - 30 $\mu\text{g/ml}$) cumulativamente.

4.7.5 Avaliação do papel dos receptores muscarínicos e histaminérgicos no efeito vasorelaxante da FB

Para avaliar se o efeito vasorelaxante da FB envolvia a participação de receptores muscarínico e histaminérgicos, após avaliação da presença ou ausência do endotélio, e subsequente contração promovida pela Phe (0,1 μM), CCE para a FB (0,1 - 30 $\mu\text{g/ml}$) foram construídas 30 minutos após a incubação com atropina (10 μM – antagonista de receptor muscarínico) ou pirlamina (10 μM – antagonista de receptor histaminérgico H_1).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m., com exceção dos valores de CE_{50} foram determinados através de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos. Os resultados de relaxamento induzido pela FB foram expressos como o percentual de redução da contração máxima obtida com a Phe.

Para a comparação entre mais de dois grupos, os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Quando a comparação foi realizada entre dois grupos, os resultados foram submetidos ao teste “t” de Student (bicaudal não pareado).

As diferenças entre os dados foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

5.1 Avaliação do efeito do EBH e frações orgânicas de *C. brasiliense* frente às contrações induzidas por Phe em anéis de aorta isolada de rato

A adição cumulativa do EBH (0,1 - 30µg/mL) promoveu relaxamento vascular de modo concentração-dependente, apresentando $E_{max} = 97,4 \pm 2,2\%$ e CE_{50} de 3,9 (2,8 - 5,4) µg/ml. A FB (0,1 - 30µg/mL) apresentou efeito semelhante ao EBH ($E_{max} = 94,4 \pm 2,5\%$ e $CE_{50} = 5,6$ (3,5 - 8,9) µg/ml). FH, FC e FAE induziram $E_{max} = 59.1 \pm 7.1\%$, $34.7 \pm 8.6\%$ e $74.7 \pm 3.8\%$, respectivamente. O veículo (DMSO) não apresentou efeito relaxante significativo (Figura 4).

A exposição das preparações aórticas ao EBH e frações não provocou efeitos deletérios, uma vez que 60 minutos após a retirada dos extratos houve responsividade dos tecidos frente à exposição de Phe (0,1µM) e Ach (10µM) (Dados não mostrados).

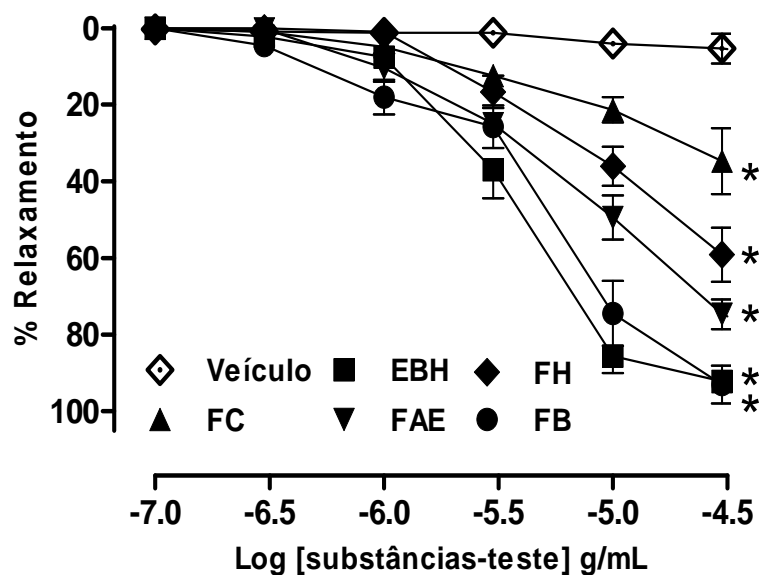


Figura 4: Curvas concentração efeito (CCE) (0,1 a 30 µg/mL) para extrato bruto hidroalcoólico (EBH), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC), fração acetato de etila (FAE), e fração butanólica (FB) das folhas de *C. brasiliense* em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (0,1 µM). Os símbolos e linhas verticais representam a média \pm e.p.m. de 6-8 experimentos.

* $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

5.2 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasorelaxante da FB

A remoção mecânica da camada de células endoteliais aboliu o efeito vasodilatador da FB ($E_{\max} = 1,1 \pm 0,5\%$) (Figura 5) em preparações aórticas pré-contraídas com Phe.

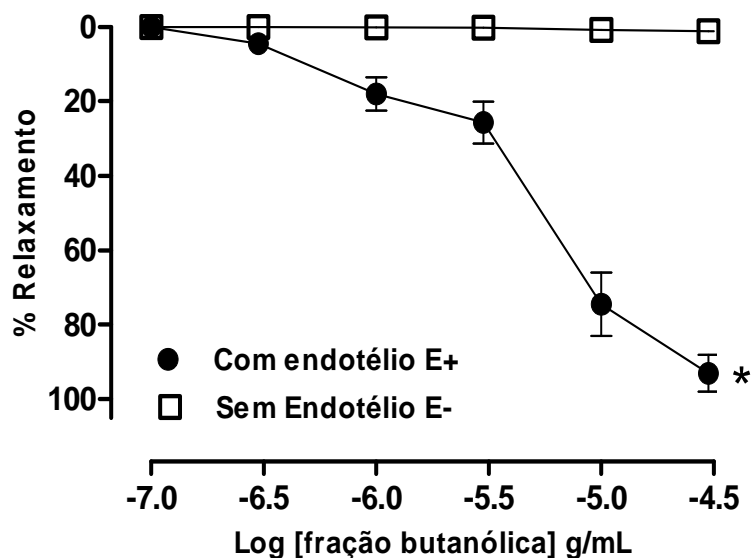


Figura 5: Curvas concentração efeito (CCE) (0,1 a 30 $\mu\text{g/mL}$) para fração butanólica (FB) de *C. brasiliense* em anéis aórticos de ratos com endotélio (E+) e sem endotélio (E-), pré-contraídos com Phe (0,1 μM). Os símbolos e linhas verticais representam a média \pm e.p.m. de 6-8 experimentos.

* $P < 0,05$ quando comparado com anéis de aorta sem endotélio.

5.3. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorelaxante da FB

A pré-incubação com L-NAME (100 μ M) ou com ODQ (10 μ M), inibiu o relaxamento induzido pela FB ($E_{max} = 2,8 \pm 1,2\%$ e $8,2 \pm 1,0$, respectivamente) (Figura 6A).

Nas preparações pré-contraídas com KCl (120mM), a FB também promoveu efeito relaxante ($E_{max} = 51,9 \pm 5,1\%$) que foi reduzido pela pré-incubação com L-NAME (100 μ M; $E_{max} = 11,5 \pm 2,1\%$) (Figura 6B).

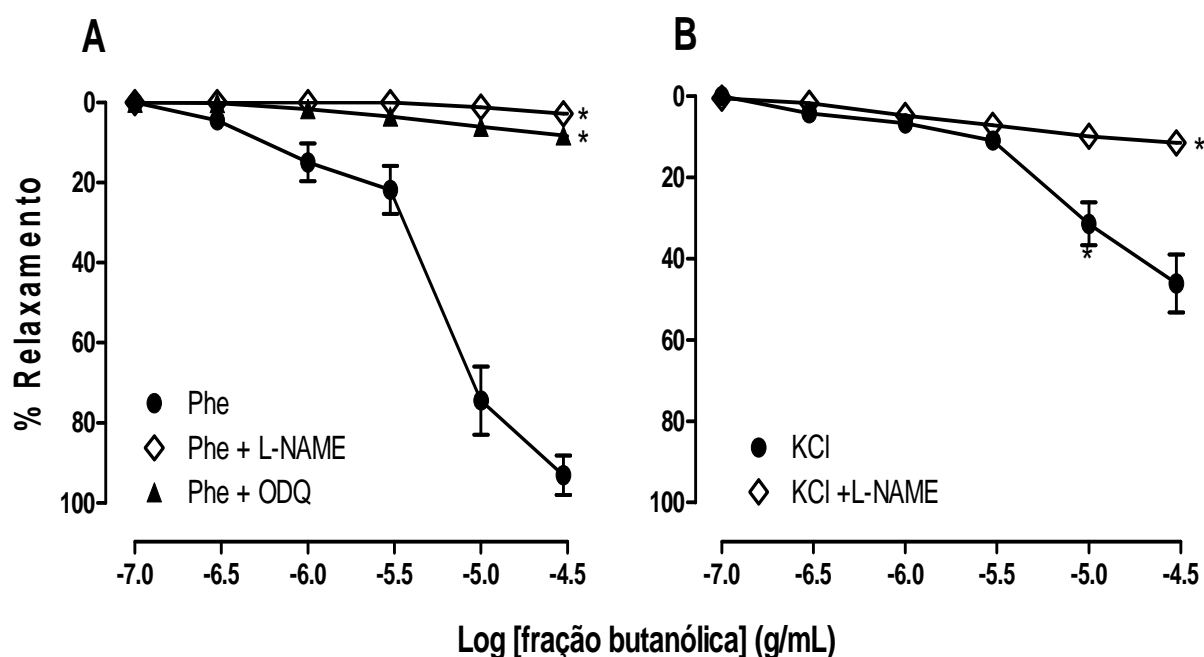


Figura 6: Curvas concentração efeito (CCE) (0,1 a 30 μ g/mL) da fração butanólica (FB) de *C. brasiliense* em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto pré-contraídos com fenilefrina (Phe - 0,1 μ M) na ausência ou na presença de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME - inibidor da óxido nítrico sintase - 100 μ M) ou 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ - inibidor da guanilato ciclase - 10 μ M) (A) ou com KCl (120mM) na ausência ou na presença de L- NAME (100 μ M) (B). Os símbolos e linhas verticais representam a média \pm e.p.m. de 6 a 8 experimentos.

* P <0,05 quando comparado ao grupo FB.

5.4 Verificação da participação de prostanóides vasodilatadores e canais de potássio no efeito vasorelaxante da FB

Em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (0,1 μ M), a pré-incubação com indometacina (10 μ M; inibidor da COX) ou TEA (1 mM - inibidor não seletivo dos canais de potássio), não alterou o vasorelaxamento induzido pela FB (E_{max} = 83,0 \pm 4,0% e 97,0 \pm 1,4% , respectivamente; Figura 7 A e B).

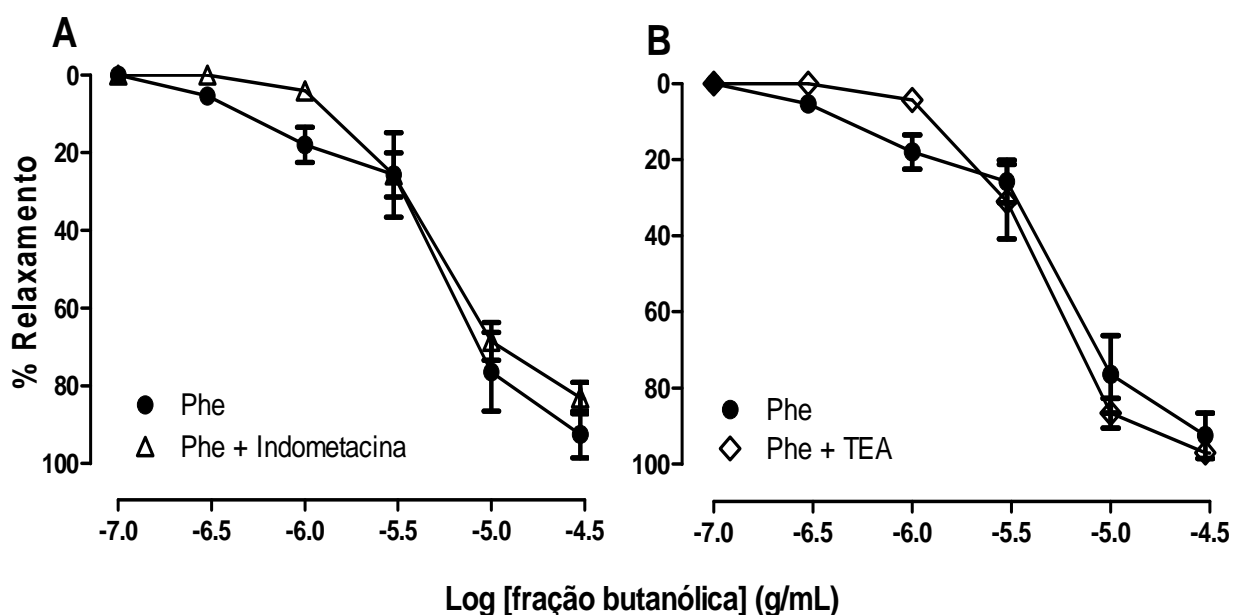


Figura 7: Vasorelaxamento promovido pela fração butanólica (FB) (0,1 – 30 μ M) na ausência ou na presença de indometacina (inibidor da ciclooxygenase - 10 μ M) (**A**) ou tetraetilamônio (TEA, bloqueador não seletivo de canal de potássio - 1 mM) (**B**) em preparações aórticas com endotélio intacto previamente contraído com Phe (0,1 μ M). Os resultados são expressos como médias \pm e.p.m. de 6-7 experimentos.

5.5 Avaliação do papel dos receptores muscarínicos e histaminérgicos no efeito vasorelaxante da FB

A pré-incubação com atropina (10 μ M – antagonista de receptor muscarínico) ou pirilamina (10 μ M – antagonista de receptor histaminérgico H₁), em preparações de anéis de aorta com o endotélio funcional contraídos com Phe (0,1 μ M), não inibiram o relaxamento induzido pela FB (E_{max} = 93,2 \pm 3,3% e 90,9 \pm 5,5%, respectivamente; Figura 8 A e B).

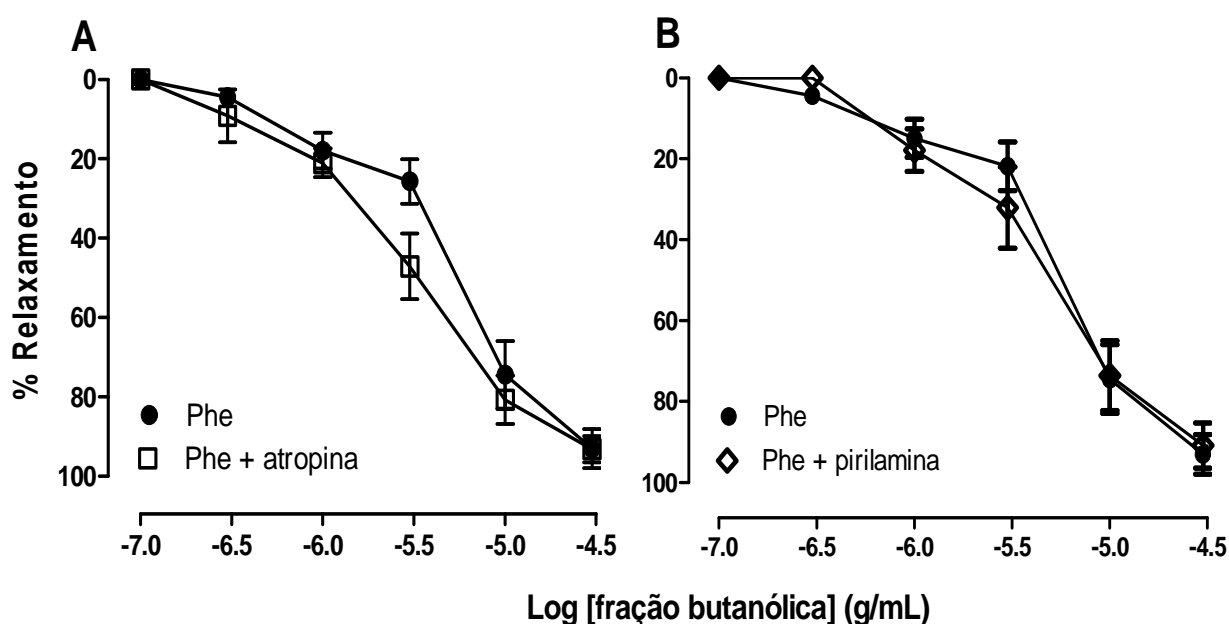


Figura 8: Vasorelaxamento induzido pela fração butanólica (FB) antes e após a incubação com atropina (antagonista de receptor muscarínico - 10 μ M) (**A**) ou pirilamina (antagonista de receptor histaminérgico H₁ - 10 μ M) (**B**) em tecidos aórticos pré-contraídos com Phe (0,1 μ M). Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. de 5-7 experimentos.

Discussão

Neste estudo buscou-se avaliar os efeitos vasculares do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (EBH) e das frações orgânicas obtidas através do fracionamento do EBH. Esta planta tem ocorrência em todo Cerrado brasileiro, seus frutos e folhas são muito utilizados pela população da região Centro-Oeste do Brasil, tanto para alimentação quanto para fins terapêuticos (ARAÚJO, 1995).

Nos últimos anos, diversos produtos naturais tem sido alvos de pesquisas básicas e clínicas para o desenvolvimento de novos fármacos. Levando em consideração o conhecimento sobre o uso popular de plantas medicinais, a grande maioria utiliza estes conhecimentos como referencial para as novas pesquisas (WRIGHT *et al.*, 2007; TOVCHIGA e SHTRYGO, 2009). Em relação à *C. brasiliense*, apesar de não haver na literatura indicações da utilização popular para tratar doenças cardiovasculares, estudo inicial realizado por Miranda-Vilela (2009) atribuiu ao pequi efeito hipotensor, justificando a investigação proposta neste estudo.

Os resultados demonstraram que em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio intacto, o EBH promoveu efeito vasodilatador de modo concentração-dependente fornecendo, assim, subsídios para o prosseguimento do estudo. Na etapa seguinte, realizou-se o fracionamento do EBH, obtendo-se as diferentes frações orgânicas com a utilização de solventes em crescente grau de polaridade (Figura 4).

Nas condições experimentais utilizadas, todas as frações orgânicas (FH, FC, FAE, FB) apresentaram atividade vasorelaxante, com diferentes graus de intensidade, sugerindo a participação de compostos ativos tanto polares como apolares neste efeito. Como a identificação destes compostos não foi delineada para este estudo, o passo seguinte foi, então, investigar as vias de controle do tônus vascular envolvidas com o efeito vasodilatador de *C. brasiliense*. Pelo fato da fração butanólica (FB) ter apresentado efeito vasorelaxante mais pronunciado (E_{max}) e semelhante ao obtido com o EBH, esta foi selecionada para dar seguimento ao estudo dos mecanismos de ação.

O papel do endotélio na regulação do tônus vascular tem sido muito estudado e está bem estabelecido. Furchgott & Zawadzki (1980) demonstraram pela primeira vez que o relaxamento de vasos sanguíneos estimulado pela ACh era promovido por um fator de relaxamento dependente do endotélio, hoje conhecido como NO. Na tentativa de verificar a modulação endotelial nessa resposta,

primeiramente avaliamos se o relaxamento estimulado pela FB era dependente ou não do endotélio. Observou-se, assim, que o efeito vasodilatador da FB é dependente do endotélio, uma vez que a remoção mecânica do endotélio vascular aboliu o efeito relaxante promovido pela FB (Figura 5).

Sabe-se que o endotélio vascular participa do controle do tônus vascular através da liberação de substâncias vasoativas. Entre os mediadores endoteliais que promovem vasorelaxamento estão o NO, a PGI₂ e o EDHF (MONCADA e VANE, 1979; FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; FELETOU e VANHOUTTE, 1988).

Nas preparações aórticas com endotélio intacto e pré-contraídas com Phe, a presença de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) ou de ODQ (inibidor da guanilato ciclase), aboliu o efeito vasorelaxante da FB, sugerindo a participação da via NO/GMPc na atividade vascular de *C. brasiliense* (Figura 6A).

Nas preparações aórticas com endotélio intacto e pré-contraídas com o agente despolarizante KCl (120 mM), a FB promoveu relaxamento de menor intensidade (51,9%) quando comparado com as preparações pré-contraídas com Phe (94,4%), sendo que ambas preparações tiveram o efeito relaxante reduzido na presença de L-NAME (Figura 6B). De acordo com Furchgott e Zawadzki (1980), Rapoport *et al.* (1985) e Chang *et al.* (1994), este achado é coerente com propriedades de relaxamento vascular dependente de NO.

A explicação para esta afirmação vem da compreensão dos mecanismos envolvidos com os dois agentes vasoconstritores e com o vasodilatador NO. Sabe-se que o aumento da concentração de potássio extracelular causa contração no músculo liso através da despolarização da membrana com ativação de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem e liberação de Ca²⁺, levando ao aumento do cálcio intracelular, ativação da cadeia leve de miosina e contração muscular (VOGALIS *et al.*, 1991; YOSHIHIMA *et al.*, 1992). A vasoconstrição estimulada pela Phe, por sua vez, é resultante da estimulação de receptores α 1- adrenérgicos, que leva à formação de IP₃ e liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático para o citoplasma. No caso do NO, ao ativar a GCs, a formação de GMPc é aumentada, ativando a PKG e resultando numa cascata de efeitos no músculo liso que culminam na desfosforilação das cadeias leves de miosina e sequestro de Ca²⁺ intracelular, com consequente relaxamento (IGNARRO *et al.*, 1987; RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT e MURAD, 1983). Levando em consideração estes apontamentos, é esperado que o agente despolarizante promova aumento da concentração de Ca²⁺

intracelular em maiores proporções do que o vasoconstritor Phe, justificando que, numa situação de antagonismo entre o vasorelaxamento promovido pelo NO e a vasoconstrição por KCl ou Phe, o relaxamento seja de menor intensidade em preparações pré-contraídas com KCl, corroborando com os resultados obtidos neste estudo de que o efeito vasorelaxante da FB é dependente de NO.

Para avaliar a participação de prostanóides vasodilatadores no relaxamento dependente de endotélio induzido pela FB, utilizaram-se preparações aórticas pré-incubadas com indometacina, um inibidor não seletivo da COX. Nas condições experimentais deste estudo, a indometacina não modificou o efeito vasodilatador promovido pela FB (Figura 7A), sugerindo a ausência de participação desta via no efeito induzido pela FB.

O EDHF, embora ainda seja uma substância desconhecida, sabe-se que atua promovendo a hiperpolarização celular através da abertura de canais de potássio, o que leva à vasodilatação por reduzir o Ca^{2+} citosólico (CHEN *et al.*; 1988; FELETOU e VANHOUTTE, 1988). A adição da FB aos anéis de aorta previamente expostos ao TEA, um bloqueador não seletivo de canais de potássio, não reverteu o relaxamento promovido pela FB (Figura 7B), indicando assim, que canais de potássio não estão envolvidos neste efeito.

Um evento importante para a produção de EDRF é o aumento das concentrações de Ca^{2+} na célula endotelial, que pode ocorrer por ativação de receptores, como por exemplo, muscarínicos e histaminérgicos (OLIVEIRA *et. al.*, 2008). Esses receptores são proteínas integrais de membrana acoplados a proteína-G que quando estimulados por um agonista, induzem o aumento de Ca^{2+} na célula endotelial e consequente liberação dos EDRFs (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980).

Para verificar a participação dos receptores muscarínicos e histaminérgicos no relaxamento induzido pela FB, foram realizados experimentos em anéis de aorta torácica de ratos pré-incubados com atropina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos ou pirilamina, um antagonista de receptores H_1 da histamina. Nestas preparações, a presença dos antagonistas seletivos para esses receptores não modificou o relaxamento promovido pela FB, descartando o envolvimento destas vias no efeito vasorelaxante da FB (Figura 8 A e B).

Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, a fração butanólica causou maior relaxamento do tecido muscular liso quando comparado a outras frações orgânicas. O butanol é um solvente de alta polaridade e extrai

flavonóides, taninos e saponinas, entre outras substâncias (GHEDINI e ALMEIDA, 2007). A caracterização química de componentes polares do pequi mostrou a presença de componentes bioativos, como a quercetina (ROESLER *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* realizados com a quercetina demonstraram que esta possui atividade relaxante no músculo liso vascular (DUARTE *et al.*, 1993; ROGHANI *et al.*, 2005), sendo este efeito associado ao aumento da produção de NO (MACHHA *et al.*, 2007). Estudo *in vivo* demonstrou que o tratamento crônico com a quercetina reduziu a pressão arterial de ratos hipertensos (GARCIA-SAURA *et al.*, 2005).

Oliveira e colaboradores (1968) identificaram nas folhas de *C. brasiliense* friedelina e o ácido oleanólico, substâncias descritas na literatura como vasodilatadoras (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; JIAO *et al.*, 2007). Observou-se que a administração de friedelina diminui a resposta vascular da aorta torácica de ratos ao agente vasoconstritor Phe (JIAO *et al.*, 2007), entretanto, os mecanismos envolvidos neste efeito não foram identificados. Já para o ácido oleanólico, o mecanismo envolvido na reversão do efeito vasoconstritor da Phe parece envolver principalmente o aumento da liberação de NO via ativação da eNOS (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2004).

Levando em consideração os efeitos vasculares já descritos para algumas substâncias identificadas no pequi, pode-se sugerir que os resultados obtidos neste estudo podem estar relacionados a estes compostos. No entanto, esta sugestão somente poderá ser confirmada após a identificação química dos componentes presentes na FB e a realização dos testes experimentais com estas substâncias, alvo de estudos futuros do grupo.

Assim sendo, os resultados aqui apresentados indicam que o efeito vasorelaxante *in vitro* observado com a FB de *C. brasiliense* envolve a via NO/GMPc. A forma pela qual esta via está sendo ativada não pode ser identificada com os testes até aqui realizados. No entanto, os dados obtidos podem contribuir para o melhor entendimento do efeito hipotensor observado com o pequi em atletas voluntários e, assim sendo, para um possível uso medicinal de *C. brasiliense*, ainda desconhecido, em condições patológicas como a hipertensão arterial e a aterosclerose.

Conclusões

- O extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. (EBH) apresenta efeito vascular relaxante em aorta de ratos.
- O fracionamento biomonitorado do EBH mostrou que todas as frações orgânicas (FH, FC, FAE, FB) apresentaram efeito vasorelaxante, sendo este efeito mais evidente nas frações de maior polaridade (FAE e FB).
- Dentre todas as frações orgânicas, a butanólica apresentou maior atividade vasorelaxante nas concentrações utilizadas.
- O relaxamento observado com a FB é dependente de endotélio e envolve a via do NO/GMPc.
- Os resultados do presente estudo configuram o primeiro relato sobre a atividade vasorelaxante da espécie e contribuem para o melhor entendimento sobre o efeito hipotensor de *C. brasiliense* observado em atletas voluntários.

Referências

- Almeida, S. P.; Silva, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: Embrapa- Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. p. 38, 1994.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Ribeiro, J. F. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina. Editora Embrapa- Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1ª Edição, Planaltina. D.F, p.464, 1998.
- Alvim, N. A. T.; Ferreira, M. de A.; Cabral, I. E.; Almeida Filho, A. J. de. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v.14, n.3, mai./jun. 2006.
- Araújo, F. D. A Review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an Economically Valuable Species of the Central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, 49: 40-48, 1995.
- Barbosa, D. B. M.; Nascimento, M. V. M.; Lino, R. C.; Magalhães, M. R.; Florentino, I. F.; Honório, T. C. D.; Galdino, P. M.; Bara, M. T. F.; Paula, J. R. de ; Costa, E. A. Mechanism involved in the anti-inflammatory effect of *Spiranthera odoratissima* (Manacá). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, p. 137-143, 2012.
- Bennett, W. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation. *Kluwer Academic*. 3ed, p. 975-998, 1995.
- Berg, M. E. V. D. Plantas Medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi., 1993.
- Bezerra J. C. B.; Silva I. A.; Ferreira H. D.; Ferri P. H.; Santos S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, 73: 428-430, 2002.
- Bolton, T. B.; Lang, R. J.; Takewaki, T. Mechanism of action of noradrenaline and charbacol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *Journal of Physiology*, 351: 549-572, 1984.
- Brandão, M.; Laca-Buendía, J. P.; Macedo, J. F. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Empresa Brasileira de Pecuária de Minas Gerais, p. 528, 2002.
- Brevetti, G.; Schiano, V.; Chiariello, M. Endothelial dysfunction: A key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis*. 197 (1): 1-11. Mar, 2008.
- Carvalho, M. H. C.; Nigro, D.; Lemos, V. L.; Tostes, R. de C. A.; Fortes, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, p.76-88, 2001.

- Chang, K. S.; Feng, M. G.; Davis, R. F. Midazolam Produces Vasodilation by Mixed Endothelium-Dependent and -Independent Mechanisms. *Anesthesia & Analgesia*, 78: 710-7, 1994.
- Chaytor, A. T.; Evans, W. H.; Griffith, T. M. Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *The Journal of Physiology*, 508: 561-73, 1998.
- Chen, G.; Suzuki, H.; Weston, A.H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDHF from rat blood vessels. *British Journal of Pharmacology*, 95: 1165-74, 1988.
- de Paula, J. R.; Sales, B. H. N. Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi). In: 23^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000. Resumo... Poços de Caldas, Minas Gerais.
- de Paula-Júnior, W.; Rocha, F. H.; Donatti L.; Fadel-Picheth C. M. T.; Weffort-Santos A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 625-630, 2006.
- de Wit, C.; Bolz, S. S.; Pohl, U. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Zeitschrift für Kardiologie*, 89: 113-116; 2000.
- Devienne, K. F.; Raddi, M. S. G.; Pozett, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Botucatu, v.6, n. 3, p.11-14, agost. 2004.
- Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v.399, n.6736, Jun 10, p.601-5. 1999.
- Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; Jimenez, J.; Tamargo, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 239, 1-7. 1993.
- Dombroski, J. L. D. Estudos sobre a propagação do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1997. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- Ellis, E. F.; Oelz, O.; Roberts, L. J.; Payne, N. A.; Sweetman, B. J.; Nies, A. S.; Oates, J. A. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that is thromboxane A₂. *Science*, 193: 1135-1137, 1976.
- Endermann, D. H.; Schiffrin, E. L. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15 (8): 1983-92, 2004.

- Feletou, M.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 93(3): 515-524, 1988.
- Feletou, M.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 26, n. 6, p. 1215-25, Jun 2006.
- Ferreira, P. C.; Motidome, M. Estudo químico do óleo de piquí. Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo: v. 19, n. 1, p. 25-30, 1962.
- Fleming, I.; Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal Physiology - Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*, v.284, n.1, Jan, 2003.
- Fleming, I.; Bauersachs, J.; Fisslthaler, B.; Busse, R. Ca²⁺ independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circulation Research*, v.82, p.686-95. 1998
- Fraga, Isabela. Pequi pra quê? Disponível em: [http/< >](http://>) Acesso em: 17 de abril, 2012.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.
- Garcia-Saura, M. F.; Galisteo, M.; Villar, I. C.; Bermejo, A.; Zarzuelo, A.; Vargas, F. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 270: 147-155, 2005.
- Ghedini, P. C.; Almeida, C. E. Butanolic extract of *Aster squamatus* aerial parts is the active fraction responsible to the antiulcer and gastric acid antisecretory effects. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26: 889-892, 2007.
- Gillham, J. C.; Kenny, L. C.; Baker, P. N. An overview of endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) in normal and compromised pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 109: 2–7, 2003.
- Giordani, Samuel Cunha Oliveira. Estimação de parâmetros genéticos para caracteres de crescimento em pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em estágio precoce. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Minas Gerais.
- Griffith, T. M.; Edwards, D. H.; Lewis, M. J.; Newby, A. C.; Henderson, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, v. 308, n. 12, p. 645-647, 1984.
- Guimarães, H. A.; Nascimento, M. V. M.; Tavares, A.; Galdino, P. M.; PAULA, J. R.; Costa, E. A. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.,

- Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 328-333, 2010.
- Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Elsevier, 2006. p.470-551.
- Harvey, A. L. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, p. 480-484, 2007.
- Herzog-Soares, J. D.; Alves, R. K.; Isac, E.; Bezerra, J. C. B.; Gomes, M. H.; Santos, S. C.; Ferri, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 02-04, 2002.
- Hopkins, N. K.; Gorman, R. R. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *The Journal of Clinical Investigation*, 67(2): 540-546, 1981.
- Ignarro, L. J.; Byrns, R. E.; Buga, G. M.; Wood, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61 (6): 866-79. 1987.
- Ignarro, L. J.; Harbison, R. G.; Wood, K. S.; Kadowitz, P. J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 237: 893–900, 1986.
- Instituto cerrado e sociedade. 2011. Fonte: <http://institutocerradoesociedade.blogspot.com.br/2011_11_01_archive.html> Acesso em: 21/03/12
- Kerr, W. E.; Silva, F. R.; Tchucarramae, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, p. 169-171, 2007.
- Khoury, J.; Resck, I. S.; Poças-Fonseca, M.; Sousa, T. M. M.; Pereira, L. O.; Oliveira, A. B. B.; Grisolia, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.
- Jiao, J.; Zhang, Y.; Lou, D.; Wu, X.; Zhang, Y. Antihyperlipidemic and Antihypertensive Effect of a Triterpenoid-Rich Extract from Bamboo Shavings and Vasodilator Effect of Friedelin on Phenylephrine-induced Vasoconstriction in Thoracic Aortas of Rats. *Phytotherapy Research*, 21(12):1135-41, 2007.

- Landmesser, U.; Hornig, B.; Drexler, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, v. 109, n. 21, p. 27-33, 2004.
- Lima, C. B. de; Bellettini, N. M. T.; Silva, A. S. da; Cheirubim, A. P.; Janani, J. K.; Vieira, M. A. V.; Amador, T. S. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 600-602, jul., 2007. (a)
- Lima, A. de; Silva, A. M. de O.; Trindade, R. A.; Torres, R. P.; Mancini-Filho, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, Jaboticabal – São Paulo, p. 695-698, dez., 2007. (b)
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 368p. 2000.
- Machha, A.; Achike, F. I.; Mustafa, A. M.; Mustafa, M. R. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*, 16: 442-447, 2007.
- Magalhães, H. G.; Monteiro Neto, H.; Lagrota, M. H.; Wigg, M. D.; Guimarães, L. A. S.; Loja, M. A. S. O.; Araújo, R. R. Estudo estrutural do pequizeiro *Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae, sob o aspecto farmacológico e botânico. *Revista Brasileira de Farmácia*. Rio de Janeiro, v. 69, n. 1-3, p. 31-41, 1988.
- Maidana-Leguizamón, F. Estudo dos efeitos de extratos de *Ateleia glazioviana* Baill. e *Tetraprerys multiglandulosa* Adr. Juss. Sobre a gestação, o desenvolvimento pré-púbere e a massa corporal de ratos. Porto Alegre: UFRGS, 1992. 88p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFRGS, 1992.
- Malinski, T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *American Journal of Cardiology*, 96 (Suppl 1): 13-24, 2005.
- Malta, D. C.; Moura, L.; Souza, F. M.; Rocha, F. M. Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. In: Saúde Brasil 2008, Ministério da Saúde, Brasília. 2009. p. 337-62.
- Mardini, I. A.; FitzGerald, G. A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. *Molecular Interventions*, 1: 30-38, 2001.
- Marouelli, R. P. O desenvolvimento sustentável da agricultura no cerrado brasileiro. 2003. 64f. Monografia (Especialização *Lato Sensu*, em Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada) ISEA-FGV/ Ecobusiness School, Brasília.
- McIntyre, M.; Bohr, D. F.; Dominiczak, A. F. Endothelial function in Hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension*, 34: 539-545, 1999.
- Mendonça, R.; Felfili, J. M.; Walter, B. M.; Silva, M. C.; Rezende, A. V.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. N. Flora vascular do Cerrado. Cerrado: ambiente e flora, p.

- 289–556. EMBRAPA- Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Planaltina, DF, Brasil, 1998.
- Michiels, Carine. Endothelial Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology*, 196: 430–443, 2003.
- Miranda-Vilela, A. L.; Resckl, I. S.; Grisolia, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 956-963, 2008.
- Miranda-Vilela, A. L. Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 2009. 188f. Tese (Doutorado) Biologia animal, Universidade de Brasília, Brasília.
- Moncada, S.; Gryglewski, R.; Bunting, S.; Vane, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263: 663-665, 1976.
- Moncada, S.; Palmer R. M. J.; Higgs, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemistry Pharmacology*, v.38, n.11, Jun 1, p.1709-15. 1989.
- Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacology*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- Moncada, S.; Vane J. R. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Federations. proceedings.*, 38 (1): 66-71, Jan. 1979.
- Moura, M. D. de. Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E. 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. C.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 203, p. 853-858, 2000.
- Nathan, C.; Xie, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 13725-13728, 1994.
- Nascimento, M. V. M.; Galdino, P. M.; Florentino, I. F.; Sampaio, B. L.; Vanderlinde, F. A.; Paula, J. R.; Costa, E. A. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. *Natural Medicines*, v. 65, p. 448-454, 2011.
- Naves, R. V. Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos. Tese Doutorado. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Goiânia, Goiás, 1999. 206 p.

- Nelson, M. T.; Quayle, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology*, 268, 799–822, 1995.
- Oliveira, A. P. Efeitos cardiovasculares do diterpeno labdano-302 – Estudo em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME). *Tese de Doutorado*. Universidade Federal da Paraíba, 2008.
- Oliveira, M. M.; Sampaio, R. P.; Giorgi, W.; Gilbert B.; Mors, W. B. *Caryocar brasiliense* - isolamento e identificação de algumas substâncias: atividade biológica sobre o sarcoma 180. *Arquivo do Instituto de Biologia*, 37 Supl I: 25-27, 1970.
- Oliveira, M. M.; Gilbert B.; Mors, W. B. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40: 451-452, 1968.
- Oliveira, I. P. de, Costa, K. A. de P., Santos, K. J. G. dos, Moreira, F. P. Considerações sobre a acidez dos solos de cerrado. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, v.1, n.1, p. 01-12, ago. 2005.
- Oliveira, M. E. B. de, Guerra, N. B., Barros, L. de M., Alves, R. E. Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: *Embrapa Agroindústria Tropical*, 2008. 32 p.
- Oliveira, S. de. Pequi. *Globo Rural*, São Paulo, v. 4, n.38, p. 80-83, Nov./dez. 1988.
- Palmer, R. M. J.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, n. 11, p. 524-526, 1987.
- Paula, M. A.; Couto R.O. do ; Bara, M.T.F. ; REZENDE, M. H. ; PAULA, J. R. de ; COSTA, E. A. Caracterização farmacognóstica da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 29, p. 526-533, 2010.
- Passos, X. S., Santos, S. da C., Ferri, P. H., Fernandes, O. de F. L., Paula, T. de F., Garcia, A. C. F., Silva, M. do R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov./dez., 2002.
- Pereira, Z. V.; Gomes, C. F.; Lobtchenko, G.; Gomes, M. E. S.; Simões, P. D. de A.; Saruwatari, R. P. S.; Rigo, V. F.; Cordeiro, W. do P. Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 249-251, jul. 2007.
- Pinto, J. R. R.; Oliveira Filho, A. T. Perfil florístico e estrutura de uma floresta de vale no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 22, n. 1, p. 53-67, 1999.
- Ramos, M. I. L.; Umaki, M. C. S.; Hiane, P. A.; Ramos Filho, M. M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitâmicos “A” da polpa do

- pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Boletim do CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 23-32, 2001.
- Roghani, T.; Baluchnejadmojarad, M. R.; Vaez-Mahdavi, F. Mechanisms underlying quercetin-induced vasorelaxation in aorta of subchronic diabetic rats: an in vitro study. *Vascular Pharmacology*, 42, 31–35, 2005.
- Rapoport, R. M.; Draznin, M. B.; Murad, F. Endothelium-dependent vasodilator-and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Transactions of the Association of American Physicians*, 96: 19-30, 1983.
- Rapoport, R. M.; Murad, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *Journal of Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research*, 9 (4-5): 281-296, 1983.
- Rapoport, R. M.; Schwartz, K.; Murad, F. Effects of na⁺,k⁺-pump inhibitors and membrane depolarizing agents on Acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation and cyclic gmp Accumulation in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*, 110, 203-209, 1985.
- Ribeiro, A. E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In: Universidade Federal de Lavras. Departamento de Administração e Economia. Manejo sustentado do cerrado para uso múltiplo: subprojeto agroecologia e desenvolvimento. Lavras, 1996. p. 11-18.
- Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado, p. 89-166. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina. EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1998.
- Rizzini, C. T. Árvores e arbustos do cerrado. *Rodriguesia*, v. 26, n.38, p. 63-77, 1971.
- Rodrigues, L. J. O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): ciclo vital e agregação de valor pelo processamento mínimo. 2005. 152f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- Rodríguez-Rodríguez, R.; Herrera, M. D.; Perona, J. S.; Ruiz-Gutiérrez, V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids container in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition*, 92, 635–642, 2004.
- Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 110 p. 711–717, 2008.
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Sousa, C. A. S.; Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan.-mar., 2007.

- Rubio, A. R.; Morales-Segura, M. A. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. *Archives of Medical Research*, v. 35, p.1-11, 2004.
- Salvemini, D.; Seibert, K.; Masferrer, J. L.; Misko, T. P.; Currie, M. G.; Needleman, P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 1940–1947. 1994.
- Sano, E. E.; Rosa, R.; Brito, J. L. S.; Ferreira, L. G. Mapeamento semi-detalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.1, p.153-156, jan., 2008.
- Santana, J. das G.; Naves, R. V. Caracterização de ambientes de cerrado com alta densidade de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.) na região sudeste do estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2003.
- Schulz, R.; Triggle, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15 (7): 255-259, 1994.
- Shimokawa, H.; Matoba, T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacology Research*, 2004; 49: 543-49.
- Silva, J. F.; Farin, M. R.; Felfili, J. M.; Klink, C. A. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil *Journal of Biogeography* . *Journal of Biogeography*, 33, 536–548, 2006.
- Smith, W. L.; Garavito, R. M.; Dewitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (52): 33157-33160, 1996.
- Stankevicius, E.; Kevelaitis, E.; Vainorius, E.; Simonsen, Ulf. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina*. v. 39, n. 4, 2003.
- Tom, E. N. L.; Girard, C.; Dimo, T.; Mbafor, J. T.; Berthelot, A.; Demougeot, C. Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 335–340, 2010.
- Tovchiga, O. V.; Shtrygo, L. S. Effect of medicinal plants on the excretory renal function (a review). *Ekspiermental'naia i Klinicheskaia Farmakologija*, v. 72, n. 3, p. 50-9, May-Jun 2009
- Vane, J. R.; Anggård, E. E.; Botting, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine*, v. 323, n. 1, p. 27-36, Jul 1990.
- Vanhoutte, P. M.; Katusic, Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? *Trends in Pharmacological Sciences*, v.9, n.7, Jul, p.229-30. 1988.

- Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, Jun., 2005.
- Veltmar, A.; Gohlke P.; Unger, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. *American Journal of Hypertension*, v.4, n.3, Mar, p. 263-269, 1991.
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.17, n. 1, 2010.
- Vogalis, F.; Publicover, N. G.; Hume, J. R.; Sanders, K. M. Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology*, 260 (1) C1012- C1018, 1991.
- Walford, G.; Loscalzo, J. Nitric oxide in vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2112-8, 2003.
- Wright, C. I.; Van-Buren, L.; Kroner, C. I.; Koning, M. M. G. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, n. 1, p. 1-31, Oct, 2007.
- Yanagisawa, M. H.; Kurihara, K., S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M. ; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, v.332, n.6163, Mar 31, P.411-5. 1988.
- Yoshihima, N.; Ichiara, K.; Yoshida, R.; Abiko, Y. Positive inotropic and chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. *British Journal of Pharmacology*, 105: 696-702, 1992.
- Zelis, Robert. Mechanisms of vasodilation. *The American Journal of Medicine*. June 27, 1983.

Research Article

Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effect of Butanolic Fraction from *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves in Rat Thoracic Aorta

Lais Moraes de Oliveira,¹ Aline Gabriela Rodrigues,¹ Elaine Fernanda da Silva,² Letícia Bonancio Cerqueira,³ Carlos Henrique Castro,⁴ Gustavo Rodrigues Pedrino,² Maria Helena Catelli de Carvalho,⁵ Roberto Pontarolo,³ Elson Alves Costa,⁶ Francinete Ramos Campos,³ Fernando Paranaíba Filgueira,^{1,5} and Paulo César Ghedini¹

¹ Department of Physiological Sciences, Laboratory of Molecular and Biochemistry Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Sala 215, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

² Department of Physiological Sciences, Laboratory of Autonomic and Cardiac Physiology, Federal University of Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

³ Department of Pharmacy, Study Center in Biopharmacy, Federal University of Paraná, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

⁴ Department of Physiological Sciences, Laboratory of Physiology of Isolated Organs, Federal University of Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

⁵ Department of Pharmacology, Laboratory of Hypertension, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

⁶ Department of Physiological Sciences, Laboratory of Pharmacology of Natural Products, Federal University of Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

Correspondence should be addressed to Paulo César Ghedini, pcghedini@gmail.com

Received 13 April 2012; Revised 20 June 2012; Accepted 10 July 2012

Academic Editor: Jairo Kenupp Bastos

Copyright © 2012 Lais Moraes de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Caryocar brasiliense Camb. “pequi” is a native plant from the Cerrado region of Brazil that contains bioactive components reported to be antioxidant agents. Previous work has demonstrated that dietary supplementation with pequi decreased the arterial pressure of volunteer athletes. We found that the crude hydroalcoholic extract (CHE) of *C. brasiliense* leaves relaxed, in a concentration-dependent manner, rat aortic rings precontracted with phenylephrine, and that the butanolic fraction (BF) produced an effect similar to that of the CHE. Aortic relaxation induced by BF was abolished by endothelium removal, by incubation of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, or the soluble guanylatecyclase inhibitor ODQ. However, incubation with atropine and pyrilamine had no effect on the BF-induced vasorelaxation. Moreover, this effect was not inhibited by indomethacin and tetraethylammonium. The concentration-response curve to calcium in denuded-endothelium rings was not modified after incubation with BF, and the vasorelaxation by BF in endothelium-intact rings precontracted with KCl was abolished after incubation with L-NAME. In addition, administration of BF in anesthetized rats resulted in a reversible hypotension. The results reveal that *C. brasiliense* possesses both in vivo and in vitro activities and that the vascular effect of BF involves stimulation of the nitric oxide/cyclic GMP pathway.

1. Introduction

Caryocar brasiliense Camb., known as “pequi,” is a tree that belongs to the Caryocaraceae family and is widely distributed in the Cerrado region of Brazil [1, 2]. Pequi fruit are rich in A and E vitamins [3] and are popularly used to flavor cuisine.

Oil extracted from the fruits is used in the cosmetic industry for the production of soaps and skin creams and is a useful tool in the production of fuel and lubricants [4, 5]. In folk medicine, pequi fruit is used against colds and flu. The seed fat is used for the treatment of respiratory tract diseases, such as asthma and bronchitis, whereas a decoction of the leaves

and flowers is used to boost energy, as an aphrodisiac, and for the treatment of liver disease. The bark and fruit are used as febrifuges and diuretics [3].

Studies exploring the biological effects of *C. brasiliense* have shown that the hydroethanolic extract of pequi leaves presents leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant effects [6]. In addition, the aqueous extract of pequi fruit pulp has revealed anticlastogenic potential, antigenotoxic activity, and antioxidant properties [7, 8].

The chemical characterization of polar components of pequi ethanolic extracts revealed the presence of bioactive components widely reported as antioxidant agents, including gallic acid, quinic acid, quercetin, and quercetin 3-*O*-arabinose [9]. Several studies suggest that increased intake of antioxidant compounds may help to protect against chronic pathologies, such as cardiovascular diseases [10–14], and a recent study has shown that dietary supplementation with pequi decreased the arterial pressure of volunteer athletes when compared to a control group [15].

The aim of the present study was to evaluate the vasorelaxant effect of the crude hydroalcoholic extract (CHE) from *C. brasiliense* leaves in rat thoracic aorta, to determine the active organic fractions of CHE, and to investigate the mechanisms of action. In addition, we analyzed the *in vivo* effect of the extract of the active organic fraction.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals, Reagents, and Standards. Phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), tetraethylammonium (TEA), indomethacin, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ), atropine, pyrilamine, standards of gallic acid (97.5–102.5%), and quercetin (\geq 98%) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Methanol, acetonitrile (HPLC grade), and formic acid (88%) were purchased from J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, The Netherlands), and ammonium formate was purchased from Acros Organics (New Jersey, USA). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Plant Material. Leaves of *C. brasiliense* Camb. were collected on September 2010 in Gurupi, Tocantins, Brazil. The plant was authenticated by Professor Aristônio Magalhães Teles, and a voucher specimen was deposited at the herbarium of the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Goiás under number 1353. The leaves were maintained at room temperature (35°C) for drying and stabilization. The plant material was pulverized in a Willye mill.

2.3. Crude Hydroalcoholic Extract Preparation. To prepare the crude hydroalcoholic extract (CHE) of *C. brasiliense* leaves, 50 g of powdered leaves were immersed in 1000 mL of an ethanol-water solution (70:30, v/v), for 48–72 h, with occasional stirring. The extract was then vacuum-filtered, concentrated in a rotary evaporator at reduced pressure and

at a temperature lower than 50°C, lyophilized and stored in the dark at 4°C.

2.4. Crude Hydroalcoholic Extract Fractionation. The CHE (10 g) was dissolved in water (500 mL) and extracted with n-hexane (3 \times 300 mL) at room temperature. After the removal of the hexane fraction, the remaining aqueous extract was eluted with chloroform (3 \times 300 mL). After the removal of the chloroform fraction, the remaining aqueous extract was eluted with ethyl acetate (3 \times 300 mL). After removal of the ethyl acetate fraction, the remaining aqueous layer was extracted with n-butanol (3 \times 300 mL). Then, after the removal of the n-butanol fraction, each of the fractions (except the final aqueous portion) was separately evaporated to dryness under reduced pressure to give a hexane fraction (HF) (0.29 g), a chloroform fraction (CF) (0.37 g), an ethyl acetate fraction (EAF) (1.76 g), and an n-butanol fraction (BF) (1.37 g). The final aqueous layer was disposed of.

2.5. Standards and BF Preparation for LC-MS Analysis. Stock solutions of gallic acid and quercetin standards were prepared separately in methanol at concentrations of 1 mg/mL. All stock solutions were stored under refrigeration at 4°C. Working solutions were obtained from stock solutions by appropriate dilution in methanol/water solution (70:30 v/v) containing 1% formic acid or 1 mM ammonium formate, depended of each experiment, to the final concentration of 0.5 μ g/mL, 50 μ g/mL and 2 mg/mL of gallic acid, and quercetin and BF solutions, respectively. All working standard solutions and samples were filtered through a polyvinylidene fluoride (PVDF) syringe filter (11 mm, 0.45 mm, Millipore Millex, Billerica, MA, USA) before injection into the LC-MS system.

2.6. LC-MS Instrumentation and Conditions. LC-ESIMS analyses were performed using an Agilent 1200 RR-HT System (Wilmington, NC, USA) that consisted of a G1311A binary pump, G1379A degasser, and G1316A column oven. These were connected with a CTC Sample Manager (Model 2777, Waters, Milford, CT, USA). The system was coupled to an Applied Biosystems MDS Sciex API 3200 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Toronto, Canada) equipped with a syringe pump Harvard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) and an Electrospray ionization (ESI) source. The ESI source was operated in the positive and negative ion mode for monitoring quercetin and in the negative ion mode. For monitoring gallic acid in the butanolic fraction. For the positive ion mode, the mobile phase consisted of methanol/water solution (10:90 v/v) (A) and acetonitrile (B), both containing 1% formic acid. The flow rate was maintained at 300 μ L/min, and the gradient profile was as follows: $t_{0-5.0 \text{ min}}$: A = 100% to 90%; $t_{5.0-35.0 \text{ min}}$: A = 90% to 30%; $t_{35.0-40.0 \text{ min}}$: A = 30%; $t_{40.0-41.0 \text{ min}}$: A = 30% to 100%; $t_{41.0-46.0 \text{ min}}$: A = 100%. For the negative ion mode, the mobile phase consisted of methanol/water solution (10:90 v/v) (A) and acetonitrile (B) both containing 1 mM ammonium formate. The flow rate and the gradient profile were the same used for the positive ion mode. For both methods, the analyte separations were

achieved on an XBridge C18 150 × 2.1 mm (5 mm particle size) column coupled with an XBridge C18 10 × 2.1 mm (5 mm particle size) guard column. The injection volume was 20 μ L, and the column temperature was maintained at 25°C. Data acquisition was performed with the MS Workstation by Analyst 1.4 software (ABI/Sciex). The MS and ion-source parameters for ESI-positive mode were the following: declustering potential (DP), 40; entrance potential (EP), 10; curtain gas (CUR), 10 psi; ion spray voltage (IS), 5500 V; nebulizer gas (GS1), 45 psi; turbo gas (GS2), 45 psi; temperature, 400°C. The MS and ion source parameters for ESI negative mode were as follows: declustering potential (DP), -40; entrance potential (EP), -10; CUR, 10 psi; IS, -4500 V; GS1, 45 psi; GS2, 45 psi; temperature, 400°C. The high-purity nitrogen and zero grade air that were used as the CUR, GS1 and GS2 gases were produced by a high-purity nitrogen generator from PEAK Scientific Instruments (Chicago, IL, USA).

2.7. Animals. Male Wistar rats (200–300 g) from the colony of the Federal University of Goiás were used in this study. The animals were housed under a controlled 12 h light/dark cycle and stable temperature (22–23°C) with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance with the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) and were approved by the local Ethics in Research Committee (Protocol CEP/UFG 22/2011).

2.8. Preparation of Rat Aortic Rings. Rats were anesthetized and subsequently decapitated with a guillotine. The thoracic aorta was removed, cleaned of adhering fat and connective tissue, and then segmented into rings of 4 mm in length. Aortic rings were mounted under 1.5 g resting tension on stainless steel hooks in 9.0 mL warmed (37°C) and oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) organ baths containing a modified Krebs-Henseleit solution (pH 7.4; composition in mM: NaCl—130, NaHCO₃—14.9, KCl—4.7, KH₂PO₄—1.18, MgSO₄·7H₂O—1.17, CaCl₂·2H₂O—1.6, glucose—5.5). The changes in basal tension were recorded by isometric transducers connected to a data acquisition system (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). The aortic rings were placed under a resting tension of 1.5 g and equilibrated for 60 min. During this period, tension was periodically adjusted to the desired level and the Krebs-Henseleit solution was changed every 15 min.

2.9. Measurement of Vascular Effects of the CHE and Its Fractions and Investigation of Mechanisms of Action. Endothelium-intact aorta rings were precontracted with Phe (0.1 μ M). When the contractile responses to Phe had reached a plateau (usually after 15 min), cumulative concentrations (0.1 μ g/mL to 30 μ g/mL) of CHE or organic fractions (HF; CF; EAF or BF) were added to evaluate the vascular effects. Extract and fractions solutions were prepared in 5% DMSO. The vehicle (DMSO) was also tested and the final concentration in all chambers did not exceed 0.1% (v/v). The BF, which showed a vasorelaxant effect similar to CHE, was chosen for the studies of the mechanism of action and hypotensive effect.

The integrity of the endothelium was tested in each vessel by observing the relaxation response to ACh (10 μ M) following precontraction with Phe (0.1 μ M). In order to investigate whether BF-induced relaxation was dependent on the integrity of the vascular endothelium, concentration-response curves to BF (0.1 μ g/mL to 30 μ g/mL) were determined in endothelium-denuded rings precontracted with Phe. The absence of ACh-induced vasorelaxant effects was taken as evidence that the arterial rings were effectively stripped of endothelium. Finally, SNP (1 μ M), an NO-donor, was added to produce endothelium-independent relaxation.

In addition, endothelium-intact aorta rings were incubated with L-NAME (100 μ M), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, for 30 min. After the incubation period, aorta rings were then stimulated with Phe (0.1 μ M) or KCl (120 mM). When the contractile response had reached a plateau, cumulative concentration-effect curves for BF were constructed.

To investigate the role of prostaglandins and K⁺ channels on BF-induced relaxation, concentration-response curves were constructed in the presence of indomethacin (10 μ M) (a cyclooxygenase (COX) inhibitor) and TEA (1 mM) (a nonselective K⁺ channel blocker). The involvement of guanylylcyclase on BF-induced relaxation was measured in the presence of ODQ (10 μ M), a soluble guanylylcyclase inhibitor.

The involvement of endothelial receptors in the vascular effects of BF was measured after incubation of atropine (10 μ M), a muscarinic receptor antagonist, or pyrilamine (10 μ M), a histamine H₁-receptor antagonist. In each case, vessels were incubated with inhibitors for 30 min prior to being precontracted with Phe. Responses of the tissues to BF were directly compared to those obtained in the same tissues in the absence of the inhibitors (control).

Endothelium-denuded rings were incubated in Ca²⁺-free high K⁺ (60 mM) depolarizing Krebs-Henseleit solution. A cumulative concentration-response curve to CaCl₂ (10 μ M to 0.1 mM) was established in the presence of either BF or DMSO for 30 min. The results were expressed as percentages of the maximal response for KCl (120 mM) and the curves were statistically compared. In these experiments, no precipitation of calcium was observed at the concentrations used.

To address any residual or nonreversible effect of BF on contractile or relaxation events, aortic rings (exposed to cumulative concentrations of BF) were washed and allowed for another 60 min interval, before a new exposure to Phe (0.1 μ M) and ACh (10 μ M).

2.10. Evaluation of the Effects of BF on Blood Pressure of Anaesthetized Rats. On the day of experiments, the rats were anesthetized with halothane (2–3% halothane in 100% O₂) and catheters were inserted into the right femoral vein and artery. After the catheter placement, the rats were removed from the halothane and the anesthesia was maintained with urethane (1.2 g kg⁻¹·b.wt., i.v.; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). The rats were mounted prone in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments) with the bite bar set at 3.4 mm below the interaural line. In experiments measuring the aortic blood flow (ABF), miniature ultrasonic

transit-time flow probes (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) were placed around the aorta. The body temperature was kept at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a thermostatically controlled heated table.

To register blood pressure, the arterial catheter was connected to a pressure transducer attached to a bridge amplifier. The pulsatile pressure was recorded continuously with an MP150 analog-to-digital converter (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). The mean arterial pressure (MAP) was determined through the pulsate signal with AcqKnowledge software (version 3.7.1.; Biopac Systems). To measure the aortic blood flow (ABF), a flow probe was connected to an ultrasonic transit-time flowmeter (Transonic Systems). Aortic vascular conductance (AVC) was obtained by the ratio between ABF and MAP. Either the extract (i.e., BF) (7.15, 14.3, 28.6, 57.2, 114.4, and $228.8 \mu\text{g kg}^{-1}\cdot\text{b.wt.}$, i.v.; in 0.1 mL) or the vehicle (DMSO 5%) was infused through the femoral vein cannula.

2.11. Statistical Analysis. The results are presented as the mean \pm SEM of 6–8 experiments. Statistical significance was determined using Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test when appropriate. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Vascular Effects of the CHE and Its Fractions. Endothelium-intact aortic rings precontracted with Phe ($0.1 \mu\text{M}$) relaxed in a concentration-dependent manner in response to the cumulative addition of CHE and organic fractions (HF; CF; EAF or BF). CHE and BF produced potent and similar relaxations ($E_{\text{max}} = 97.4 \pm 2.2\%$ and $94.4 \pm 2.5\%$, resp.) (Figure 1). The EC_{50} for CHE and BF was $3.9 \mu\text{g}$ (2.8–5.4) and $5.6 \mu\text{g}$ (3.5–8.9), respectively. The EAF, HF and CF elicited a maximum relaxation of $74.7 \pm 3.8\%$, $59.1 \pm 7.1\%$ and $34.7 \pm 8.6\%$, respectively. The vehicle had no significant relaxant effect ($<5\%$). Sixty minutes after the extracts were removed from the baths, the effects of either Phe or ACh were similar to those seen before the addition of the extracts (data not shown). Because BF was the organic fraction with the best profile of vasorelaxation, we established cumulative concentration-response curves to this fraction in order to investigate the mechanism of action. Unlike the effect observed in endothelium-intact aortic rings, the BF-induced relaxation was abolished in preparations without endothelial cells (Figure 2). We also found that the endothelium-denuded rings incubating with depolarizing and nominally without Ca^{2+} solution, CaCl_2 was able to induce contractions that were not inhibited by BF in doses of 0.3, 3, and $30 \mu\text{g/mL}$ (Figure 3).

In aortic tissue precontracted with Phe ($0.1 \mu\text{M}$), incubation with L-NAME (NOS inhibitor) or ODQ (a guanylyl-cyclase inhibitor) was able to completely inhibit the relaxation induced by BF (Figure 4(a)). In intact endothelium precontracted with KCl (120 mM), the BF produced less relaxation ($E_{\text{max}} 63.7 \pm 7.0\%$) compared to that observed

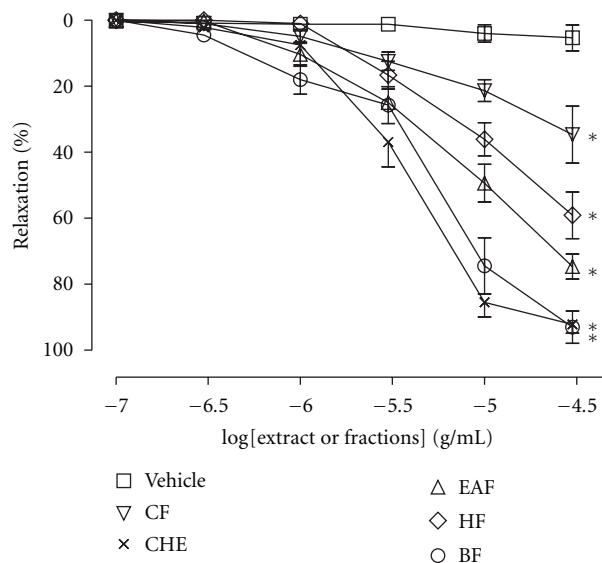


FIGURE 1: Cumulative concentration-response curves (0.1 to $30 \mu\text{g/mL}$) for crude hydroalcoholic extract (CHE), hexane fraction (HF), chloroform fraction (CF), ethyl acetate fraction (EAF), and butanolic fraction (BF) of *C. brasiliense* leaves in rats aortic rings with intact endothelium precontracted with phenylephrine (Phe) ($0.1 \mu\text{M}$). The results show the mean \pm SEM of 6–8 experiments. **P* < 0.05 when compared to vehicle (DMSO).

with the Phe ($E_{\text{max}} 94.4 \pm 2.5\%$). However, the pretreatment with L-NAME ($100 \mu\text{M}$) completely inhibited the relaxation produced by BF in aortic rings precontracted with KCl (Figure 4(b)). The effects of atropine and pyrilamine are shown in Figure 5. BF-induced aortic relaxation was not attenuated after incubation with atropine or pyrilamine, respectively. Moreover, the incubation of the arteries with indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) or TEA (a K^+ channel blocker) did not change the relaxant effect of BF in arteries precontracted with Phe (Figure 6).

3.2. Effects of Intravenous Extract Infusion on Cardiovascular Responses. In anesthetized rats, infusion of the vehicle did not promote changes in MAP (-2 ± 0.67 mm Hg of baseline values; Figure 7(a)), ABF ($3.4 \pm 0.6\%$ of baseline values; Figure 7(b)) or AVC ($4.6 \pm 0.65\%$ of baseline values; Figure 7(c)). Intravenous infusion of the BF (7.15, 14.3, 28.6, 57.2, 114.4, and $228.8 \mu\text{g kg}^{-1}\cdot\text{b.wt.}$) produced a significant dose-dependent hypotension (-5.6 ± 1.1 ; -6.9 ± 0.9 ; -8.8 ± 1.2 ; -9.0 ± 0.9 ; -13.0 ± 2.6 ; -21.5 ± 1.6 mm Hg of baseline values, respectively, Figure 7(a)), as well as increases in ABF (6.7 ± 0.8 ; 7.3 ± 0.7 ; 8.8 ± 0.5 ; 8.9 ± 0.8 ; 13.6 ± 2.5 ; $16.5 \pm 3.8\%$ of baseline values, respectively, Figure 7(b)) and in AVC (11.0 ± 1.7 ; 13.4 ± 0.1 ; 16.1 ± 2.2 ; 17.9 ± 1.4 ; 19.7 ± 2.5 ; $42.0 \pm 3.3\%$ of baseline values, resp., Figure 7(c)).

3.3. Analysis of Butanolic Fraction by LC-MS. LC-ESIMS analysis were carried out exploring the representative ions of standards of gallic acid and quercetin in order to confirm the presence or absence of these compounds in butanolic fraction (BF) from *Caryocar brasiliense* leaves. Analysis of BF

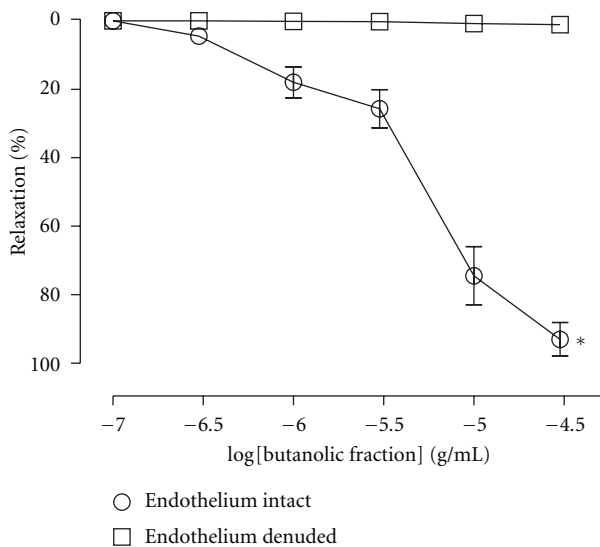


FIGURE 2: Cumulative concentration-response curves (0.1 to 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for butanolic fraction (BF) of *C. brasiliense* leaves in rats aortic rings with intact or denuded endothelium precontracted with phenylephrine (Phe) ($0.1 \mu\text{M}$). The results show the mean \pm SEM of 6–8 experiments. * $P < 0.05$ when compared to endothelium-denuded aortic rings.

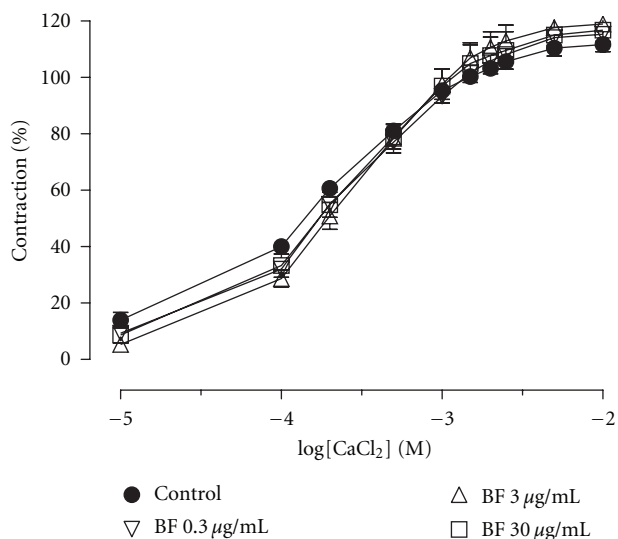
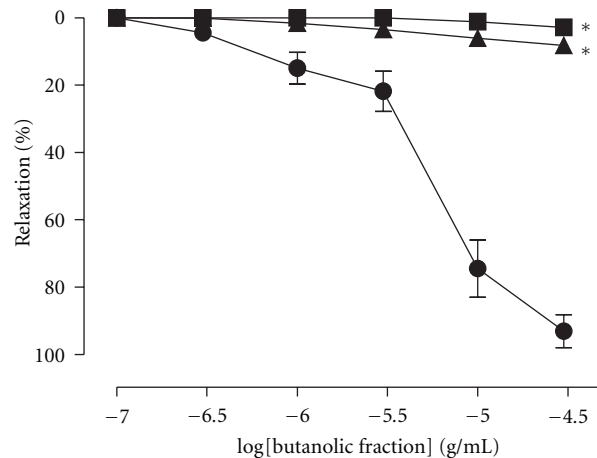


FIGURE 3: Effect of BF (0.3, 3, and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the contractile responses elicited by incremental addition of Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$ – 0.1mM) to aortic rings depolarized by isotonic KCl (60mM) in a Ca^{2+} -free solution. The concentrations of BF are indicated on the graph. Contractile responses are expressed as the percentage of maximum contraction evoked by KCl (120mM). The results show the mean \pm SEM of 5–7 experiments.

in the positive and negative mode were obtained to adjust the LC-ESIMS conditions. Posteriorly, standards solutions were injected by LC-ESIMS with the purpose of choosing the most appropriate ionization mode and concentration for the analysis of these compounds in fraction. In the mass spectra extracted from chromatogram in $t_R = 3.5 \text{min}$ and 23.4min obtained in negative mode experiment of BF was observed



● Phe
■ Phe + L-NAME
▲ Phe + ODQ

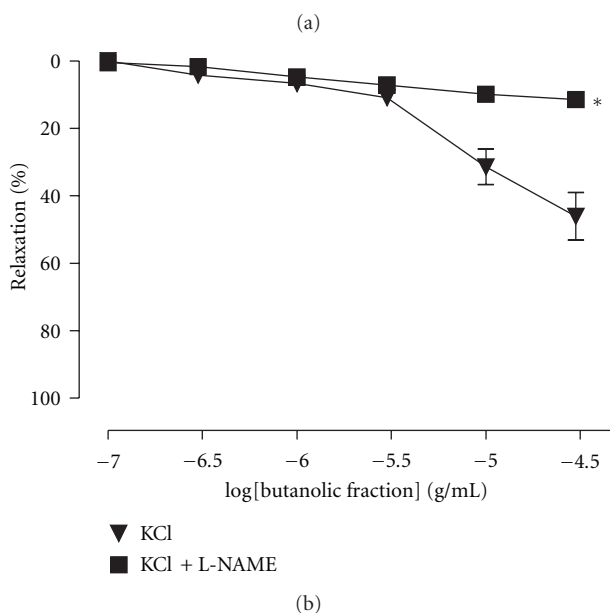


FIGURE 4: Cumulative concentration-response curves for butanolic fraction (BF) in aortic rings with intact endothelium precontracted with (a) phenylephrine (Phe) ($0.1 \mu\text{M}$) in the presence of *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (a nitric oxide synthase inhibitor, $100 \mu\text{M}$) or 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) (a guanylylcyclase inhibitor, $100 \mu\text{M}$) and (b) precontracted with KCl (120mM) in the presence or absence of L-NAME ($100 \mu\text{M}$). The results show the mean \pm SEM of 6–8 experiments. * $P < 0.05$ when to control (Phe or KCl).

the quasimolecular ions $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 169.0 and m/z 301.3, concordant with observed for gallic acid and quercetin standards, respectively. In addition, there were also observed characteristic fragments ions at m/z 125.2 and m/z 150.8, obtained by dissociation of quasimolecular ions $[\text{M} - \text{H}]^-$ of gallic acid and quercetin compounds, respectively, in ESI source (Figures 8 and 9). The quercetin compound was also confirmed in positive mode experiment, which was observed the presence of quasimolecular ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 303.0.

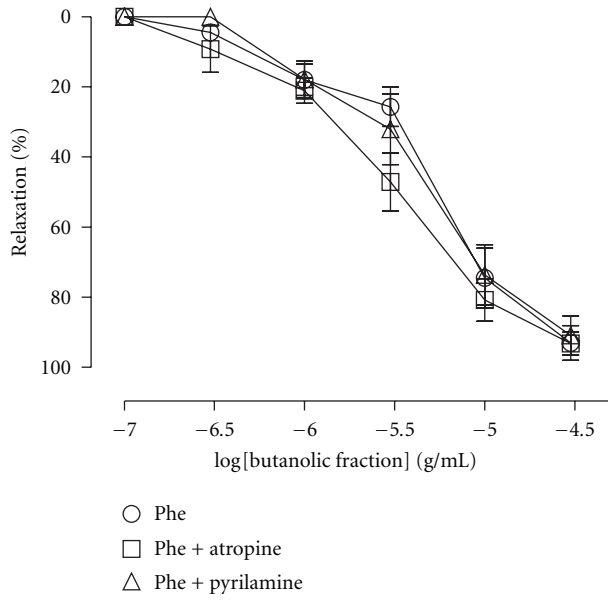


FIGURE 5: Relaxation evoked by BF before (control curve) and after exposure to pyrillamine (a H_1 receptor antagonist; $10 \mu M$) or atropine (a muscarinic antagonist receptor; $10 \mu M$) in rat aortic rings. The results are expressed as mean \pm SEM of 5–7 experiments.

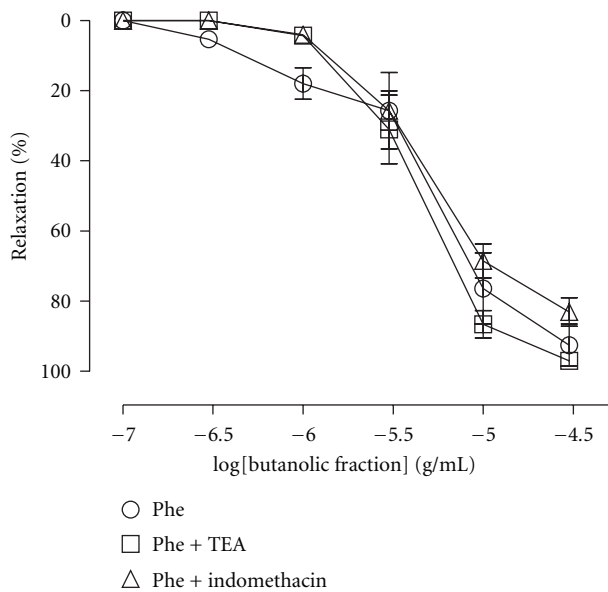


FIGURE 6: Relaxation evoked by BF in the absence (control curve) or presence of tetraethylammonium (TEA, a nonselective potassium channel blocker; 1 mM) and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor; $10 \mu M$) in rat aortic rings. The results are expressed as mean \pm SEM of 6–7 experiments.

4. Discussion

The observation that the butanolic fraction of leaves of *C. brasiliense* is able to fully relax rat aortic rings and dose-dependently reduce the blood pressure of anaesthetized rats is the main finding of this study. In the first stage of this study,

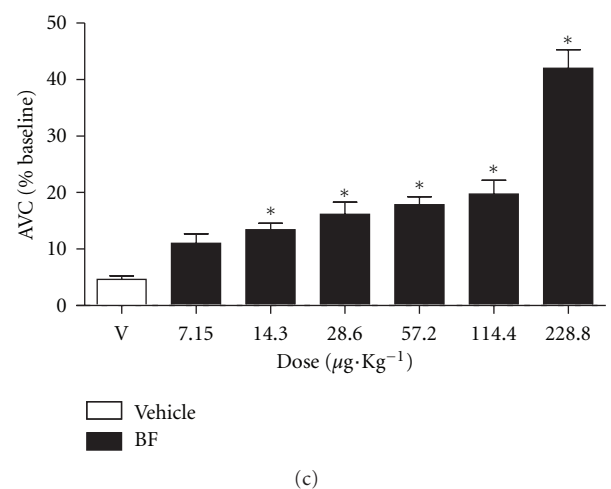
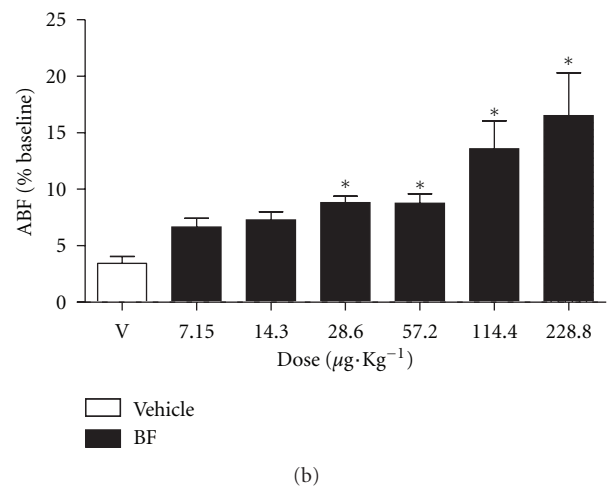
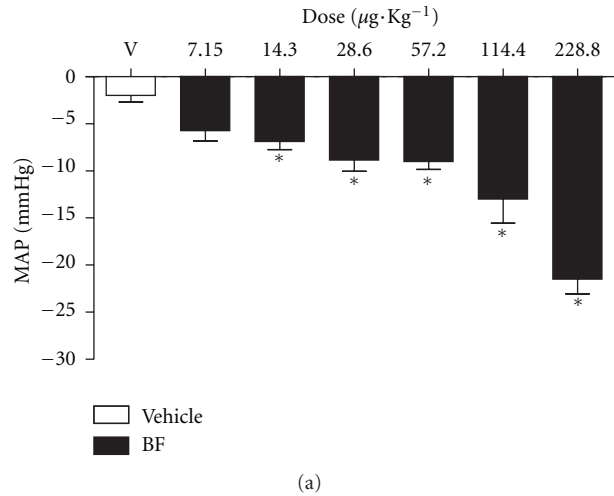


FIGURE 7: Effects of BF infusion (7.15 , 14.3 , 28.6 , 57.2 , 114.4 , and $228.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{b.wt.}$, i.v.; in 0.1 mL) on the cardiovascular parameters in anesthetized rats. (a) Mean arterial pressure (MAP). (b) Aortic blood flow (ABF). (c) Aortic vascular conduction (AVC). The results are expressed as mean \pm SEM of 6–9 experiments * $P < 0.05$ when compared to vehicle (DMSO).

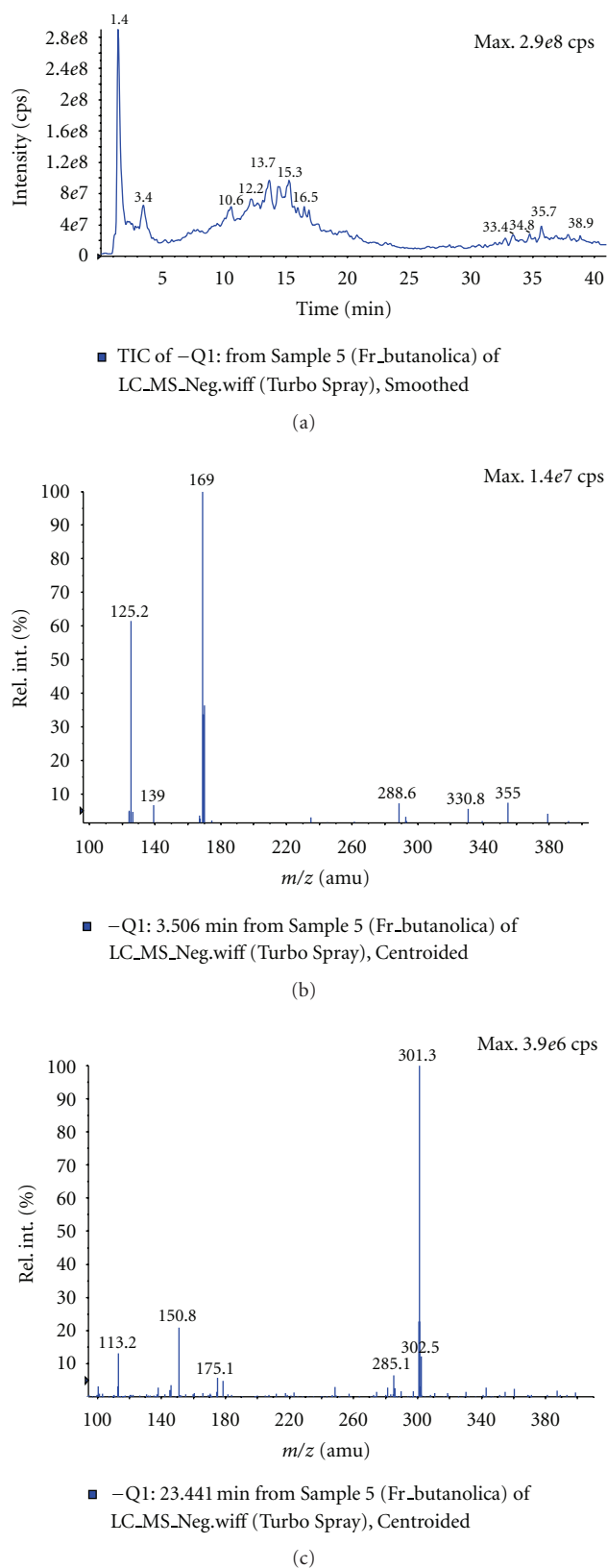


FIGURE 8: LC-ESIMS analysis of butanolic fraction (BF) from of *C. brasiliense* leaves. (a) Chromatogram of BF in methanol/water solution (70:30, v/v) with 1 mM ammonium formate. (b) Mass spectra extracted in $t_R = 3.5$ min of chromatogram of BF. (c) Mass spectra extracted in $t_R = 23.4$ min of chromatogram of BF.

we showed that the crude hydroalcoholic extract (CHE) of *C. brasiliense* leaves was able to fully relax rat aortic rings. In the second stage, we found that the BF obtained from CHE showed better vasorelaxation compared to that of other organic fractions (i.e., HF, CF, and EAF) and that it was similar to the effect induced by CHE. Subsequently, the investigation of the mechanism of action and the hypotensive effect was performed with the BF. After the experiments on aortic rings with or without endothelium, we observed that the vasorelaxation effect of BF was dependent on endothelium, since the endothelium-denuded aortic ring preparations were not able to relax after the addition of BF.

When we constructed a concentration-response curve to CaCl_2 in a high K^+ solution before and after incubation with BF, it was not capable of antagonizing the CaCl_2 -induced contractions, suggesting that the BF is not acting as a calcium channel blocker. This result confirms the absence of effect on smooth muscle cells.

The vascular endothelium plays an important role in cardiovascular functions, mainly by controlling arterial tone via synthesis and release of potent vasodilators such as nitric oxide, vasodilator prostaglandins (e.g., prostacyclin) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) [16]. Accordingly, to verify the involvement of endothelium-derived vasodilators, the effect of L-NAME on the BF-induced vasorelaxation was investigated. We demonstrated that NO is involved in the BE-induced vasorelaxation of aortic rings with intact endothelium because L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor) as well as ODQ (a soluble guanylatecyclase inhibitor) abolished this effect. The finding that BF produced greater relaxation of Phe-contracted aortic rings than KCl-contracted aortic rings (Figure 4) is also consistent with the properties of NO-dependent vasorelaxation [17–19]. It is unlikely that prostacyclin and potassium channels are involved in this effect because indomethacin and TEA (a prostaglandins inhibitor and a potassium channels blocker, resp.) were not able to reduce the vasodilatation effect induced by BF.

We also investigated the possible mechanism involved in the ability of BF to stimulate NO release. Under physiological conditions, NO is continuously released by endothelial cells as a consequence of the shear stress generated by blood flow. However, its release is also mediated by the activation of muscarinic [17] and histaminic H_1 [20] receptors, among others. Our results indicate that neither cholinergic nor histaminergic pathways are involved, since the vasorelaxation effect induced by BF was unchanged by incubation with atropine and pyrilamine, respectively.

Consistent with vascular reactivity results, the infusion of BF in anesthetized rats induced an increase of AVC, indicating aortic vasodilation. In addition, this aortic vasodilation may be related, at least partly, to the hypotensive effect induced by BF.

The exposure of BF did not result in any long-lasting impairment in the contractile or relaxation functions of the aortic rings, and was found to cause a reversible hypotension in rats. This suggests that, at least in the range of concentrations and doses used in this study, this extract does not have deleterious effects.

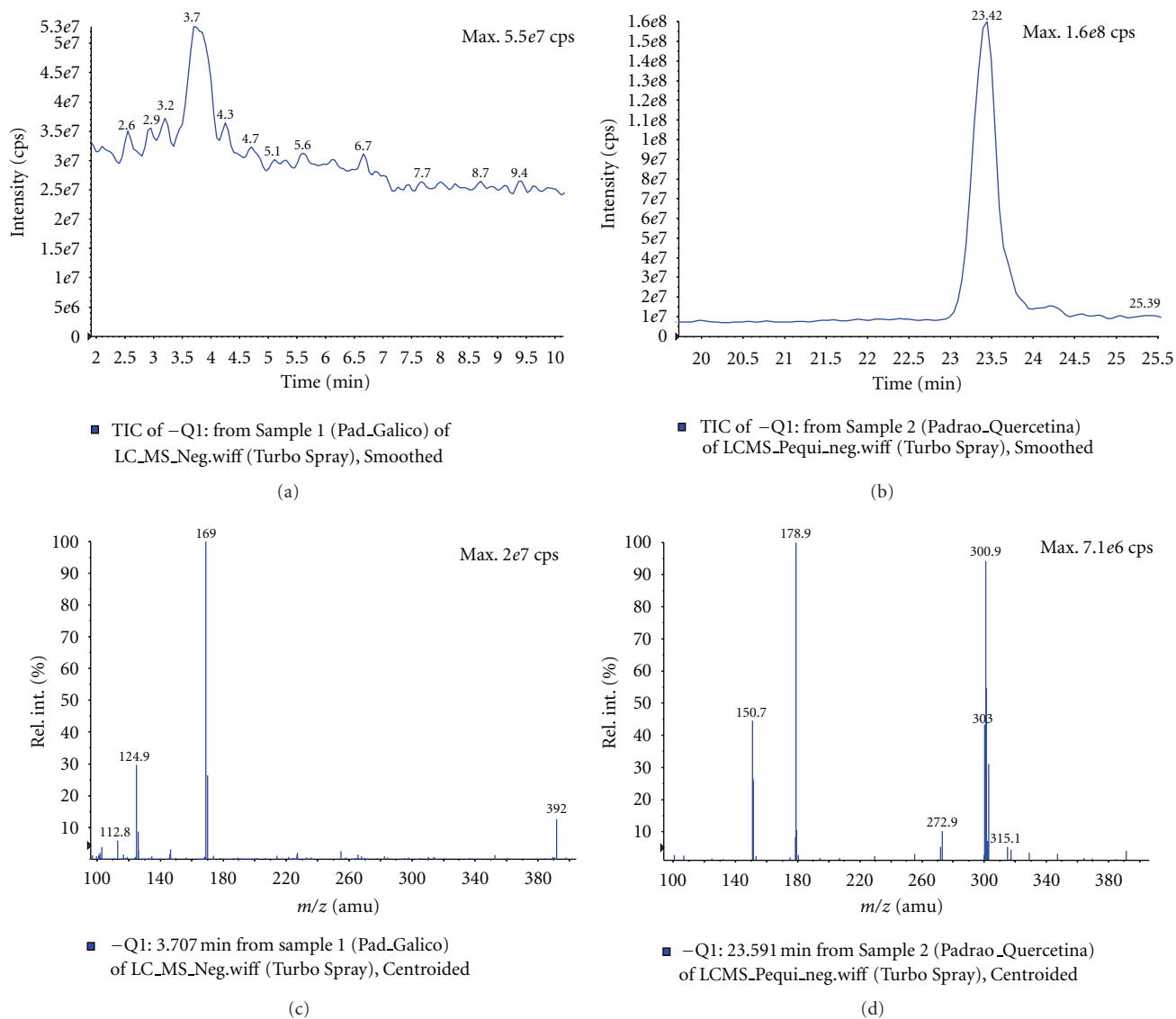


FIGURE 9: LC-ESIMS analysis of gallic acid and quercetin standards in methanol/water solution (70:30, v/v) with 1 mM ammonium formate. (a) Chromatogram of gallic acid standard. (b) Chromatogram of quercetin standard. (c) Mass spectra extracted in $t_R = 23.5$ min of chromatogram of gallic acid standard. (d) Mass spectra extracted in $t_R = 3.7$ min of chromatogram of quercetin standard.

In this study, the butanolic fraction of *C. brasiliense* leaves presented a better profile for aortic ring relaxation compared to that of the other organic fractions. Butanol is a solvent of higher polarity and it extracts flavonoids, tannins, and saponins, among others chemical substances [21]. In a previous study, the chemical characterization of the polar components of pequi fruits showed the presence of bioactive components such as gallic acid and quercetin [9]. Similarly, the LC-ESIMS analysis showed the presence of gallic acid and quercetin in BF. The methods applied are simple and direct for rapid identification of phenolic compounds in plant fraction of *C. brasiliense*. It eliminated tedious procedures of separation and purification, providing sufficient information to the confirmation of known compounds when standards mass spectra and fragmentation profile are compared to literature.

It has been described that quercetin is effective for enhancing the bioavailability of endothelium-derived nitric oxide [22, 23], while gallic acid is known to induce vascular relaxation in higher concentrations [24]. Accordingly, the confirmation of presence of gallic acid and quercetin in BF by LC-MS can help in the understanding of its vasorelaxant effect, since these compounds have been reported in the literature for such activity.

5. Conclusions

Our results reveal that *C. brasiliense* possesses both in vivo and in vitro activities and that the vascular effect of BF involves stimulation of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. In addition, these findings corroborate previous work performed with volunteer athletes, which demonstrated that the

administration of pequi caused hypotension. So, this work contribute to our understanding of the potential use of *C. brasiliense* in pathological conditions, such as hypertension and atherosclerosis.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Ekaterina Rivera and Jackson Nascimento de Lima for the management of animals. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). L. M. Oliveira received fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] R. G. Collevatti, D. Grattapaglia, and J. D. Hay, "Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation," *Molecular Ecology*, vol. 12, no. 1, pp. 105–115, 2003.
- [2] F. D. de Araujo, "A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)—an economically valuable species of the central Brazilian cerrados," *Economic Botany*, vol. 49, no. 1, pp. 40–48, 1995.
- [3] J. R. de Paula, B. H. N. Sales, S. C. Santos, C. M. A. de Oliveira, L. M. Lião et al., "Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi)," in *23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, Brazil, 2000.
- [4] A. R. Pianovski, A. F. G. Vilela, A. A. S. Silva, C. G. Lima, K. K. Silva et al., "Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, pp. 249–259, 2008.
- [5] M. E. B. Oliveira, N. B. Guerra, L. M. Barros, and R. E. Alves, "Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi," *Embrapa Agroindústria Tropical*, p. 32, 2008.
- [6] W. de Paula-Junior, F. H. Rocha, L. Donatti, C. M. T. Fadel-Picheth, and A. M. Weffort-Santos, "Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, pp. 625–630, 2006.
- [7] J. Khouri, I. S. Resck, M. Poças-Fonseca et al., "Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb)," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 442–448, 2007.
- [8] A. L. Miranda-Vilela, I. S. Resck, and C. K. Grisolia, "Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 31, no. 4, pp. 956–963, 2008.
- [9] R. Roesler, R. R. Catharino, L. G. Malta, M. N. Eberlin, and G. Pastore, "Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 711–717, 2008.
- [10] L. A. Yochum, A. R. Folsom, and L. H. Kushi, "Intake of antioxidant vitamins and risk of death from stroke in postmenopausal women," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, no. 2, pp. 476–483, 2000.
- [11] I. C. Arts and P. C. Hollman, "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, pp. 317S–325S, 2005.
- [12] D. Taubert, R. Roesen, C. Lehmann, N. Jung, and E. Schömig, "Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial," *Journal of the American Medical Association*, vol. 298, no. 1, pp. 49–60, 2007.
- [13] H. Yamada and H. Watanabe, "Tea polyphenols in preventing cardiovascular diseases," *Cardiovascular Research*, vol. 73, no. 2, pp. 439–440, 2007.
- [14] Y. D. Rattmann, S. Crestani, F. R. Lapa et al., "Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. HooK (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats," *Vascular Pharmacology*, vol. 50, no. 1-2, pp. 27–33, 2009.
- [15] A. L. Miranda-Vilela, *Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) [Thesis]*, University of Brasília, Brasília, Brazil, 2009.
- [16] P. M. Vanhoutte, H. Shimokawa, E. H. C. Tang, and M. Feletou, "Endothelial dysfunction and vascular disease," *Acta Physiologica*, vol. 196, no. 2, pp. 193–222, 2009.
- [17] R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki, "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine," *Nature*, vol. 288, no. 5789, pp. 373–376, 1980.
- [18] R. M. Rapoport, K. Schwartz, and F. Murad, "Effects of Na⁺,K⁺-pump inhibitors and membrane depolarizing agents on acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta," *European Journal of Pharmacology*, vol. 110, no. 2, pp. 203–209, 1985.
- [19] K. S. K. Chang, M. G. Feng, and R. F. Davis, "Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and— independent mechanisms," *Anesthesia and Analgesia*, vol. 78, no. 4, pp. 710–717, 1994.
- [20] J. Van de Voorde and I. Leusen, "Vascular endothelium and the relaxation effect of histamine on aorta of the rat," *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, vol. 256, no. 2, pp. 329–330, 1982.
- [21] P. C. Ghedini and C. E. Almeida, "Butanolic extract of *Aster squamatus* aerial parts is the active fraction responsible to the antiulcer and gastric acid antisecretory effects," *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 26, no. 6, pp. 889–892, 2007.
- [22] A. Machha, F. I. Achike, A. M. Mustafa, and M. R. Mustafa, "Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas," *Nitric Oxide*, vol. 16, no. 4, pp. 442–447, 2007.
- [23] P. G. Li, L. Sun, X. Han, S. Ling, W. T. Gan, and J. W. Xu, "Quercetin induces rapid NOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism," *Pharmacology*, vol. 89, pp. 220–228, 2012.
- [24] J. Gil-Longo and C. González-Vázquez, "Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 21, no. 4, pp. 304–309, 2010.