

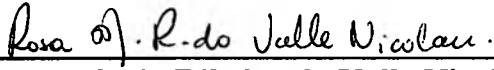
**“AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO
HIDROALCOÓLICO, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO DE
CUPHEA carthagenensis Jacq McBrite (sete-sangrias)
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE ANTIOXIDANTE”**

POR

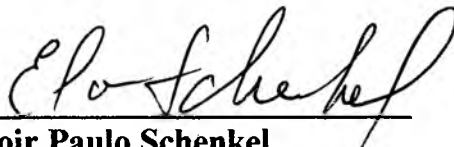
ELKE ZULEIKA SCHULDT

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Banca Examinadora em
sessão de defesa pública em 02 de Junho
de 1999.**

Banca Examinadora:



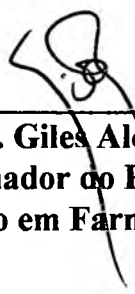
Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau
(FMC/UFSC-Membro Titular)



Eloir Paulo Schenkel
(Fac. de Farmácia/UFRGS-Membro Titular)



Jamil Assreuy Filho
(FMC/UFSC-Membro Titular)



Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 02 de Junho de 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
BRUTO HIDROALCOÓLICO, FRAÇÕES,
SUBFRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO DE *Cuphea
carthagenensis* Jacq Mcbride (SETE-SANGRIAS) -
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE.**

*Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.*

*Prof^ª Orientadora: Dr^ª Rosa Maria
Ribeiro do Valle Nicolau*

Prof^ª Co-orientadora: Dr^ª Karina Ckless

ELKE ZULEIKA SCHULDT

Florianópolis

1999

*Dedico este trabalho a meus queridos pais e primeiros professores, Rute e
Manfredo, por todo o amor e carinho dedicados e principalmente, pela
formação de meu caráter...*

...À minhas queridas irmãs Liliane, Ellen e Maíke pelo constante incentivo e apoio nos momentos difíceis...e à pequena Sofia, por sua alegria radiante... agradeço a Deus por vocês serem minhas companheiras nesta vida...

...À minha querida orientadora e amiga, Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, agradeço por todo o carinho e dedicação e por ensinar-me que cada vez que aprendemos algo, por mais simples e trivial que possa parecer, o momento dessa descoberta é único e deve ser vivido intensamente...

...À Prof.^a Dr.^a Karina Ckless, pelo constante auxílio e envolvimento para com meu trabalho, pelas excelentes sugestões e por sua sincera amizade, fazendo da ciência um aprendizado diário de disciplina, paciência e muito bom humor....

DEMAIS AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Marení Rocha Farias, agradeço pelas sugestões e pela oportunidade de trabalho conjunto com o Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Ao Prof. Dr. Mauro Nicolau, pela troca de informações e por propiciar integração com o Departamento de Fisiologia da UFSC.

A todos os Professores do Departamento de Farmacologia, em especial ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela colaboração, exemplo de profissionalismo e excelentes sugestões de trabalho.

A todos os Professores do Setor de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Antonio J. Lapa e Prof.^a Dr.^a Maria Teresa R. Lima-Landman, pela oportunidade de prestar cursos e estágios naquela instituição.

Ao Botânico Daniel de Barcellos Falkenberg, pela classificação da *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride.

À Melani D. S. Teixeira e Sandra R.R. Torres, amigas e irmãs, agradeço pelo constante incentivo, compreensão e por nosso eterno vínculo de amizade.

À Michelle F. Susin e Geisson M. Nardi, pelo carinho, ajuda e momentos de trabalho compartilhados.

Aos amigos Elisabeth Wazlawik e Rodrigo R. Peters, agradeço o amparo e as palavras de incentivo.

Aos colegas da turma de mestrado 1997, Adriana Barbosa, Alessandra Beirith, Rafaela L. Ribeiro, José Eduardo da S. Santos e Nelson de Mello - porque "Éramos Seis" ...e o seremos para sempre. Um agradecimento especial à querida amiga Rafaela (Rafitcha), por sua imensa alegria e otimismo.

Aos queridos e eternos amigos chilenos, Carolina, Renée e Federico W. Plitt.

À Cida Terlizzi, agradeço pela carinhosa acolhida em São Paulo e a Marcos Nicoletti, pela prestatividade e delícias culinárias.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, pelo auxílio prestado. Um agradecimento especial à Elza B. Ramos, Vilma da Silva e Roberto Cardoso.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A Deus...causa, consequência e propósito de todas as coisas.

Para ser grande, sê inteiro.

Nada teu exagera ou exclui,

sê todo em cada coisa.

Põe o quanto és no mínimo que fazes,

assim em cada lago a lua toda brilha

porque alta vive...

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS | v |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. As Plantas Medicinais no Brasil | 01 |
| 1.2. <i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq) Mcbride | 02 |
| 1.3. Óxido Nítrico | 06 |
| 1.3.1. NO e Tônus Vascular | 07 |
| 1.3.2. NO e Demais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) | 10 |
| 1.3.3. Desordens Cardiovasculares Relacionadas com o NO | 12 |
| 1.3.3.1. Hipertensão Arterial | 12 |
| 1.3.3.2. Aterosclerose | 15 |
| 1.4. Flavonóides como Antioxidantes | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1. Objetivos Gerais | 20 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 20 |
| 3. MATERIAIS | 22 |
| 3.1. Animais | 22 |
| 3.2. Drogas | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Material Botânico | 23 |
| 4. MÉTODOS | 23 |
| 4.1. Extração | 23 |
| 4.2. Fracionamento dos Extratos | 24 |
| 4.2.1. Testes Fitoquímicos Preliminares | 24 |
| 4.2.2. Identificação da Substância FC01 (quercetina-3-sulfato) | 27 |
| 4.3. Montagem das Preparações Isoladas de Anel de Aorta Torácica de rato | 27 |
| 4.3.1. Protocolos Experimentais Farmacológicos | 28 |
| 4.3.1.1. Caracterização do Efeito Vasorelaxante do EBHA, AcOEt, BuOH, subfrações SN-1, PPT-1 e do FC01 de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 29 |
| 4.3.1.2. Verificação da Influência da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na Via NO/GMPc | 29 |
| 4.3.1.3. Verificação da Influência da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na Contração Induzida pelo cálcio e pela fenilefrina | 30 |
| 4.3.1.4. Verificação da Influência da Incubação Prévia de atropina no Relaxamento Induzido pela Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 31 |
| 4.3.1.5. Influência da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> no Vasorelaxamento Induzido pelos Compostos S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) | 31 |
| 4.4. Capacidade Seqüestradora de Radical Anion Superóxido (O ₂ ⁻) | 32 |
| 4.4.1. Método Enzimático | 32 |
| 4.4.2. Método Não-Enzimático | 33 |
| 4.5. Determinação de Danos Oxidativos à Desoxirribose | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6. Apresentação dos Resultados e Análise Estatística | 35 |
| 5. RESULTADOS | 37 |
| 5.1. Estudo Farmacológico | 37 |
| 5.1.1. Avaliação do Relaxamento Induzido pelo EBHA, Frações, Subfrações e FC01 de <i>Cuphea carthagenensis</i> em Aorta Torácica de Rato | 37 |
| 5.1.2. Determinação da Influência de Diferentes Drogas Atuantes na via NO/GMPc no Vasorelaxamento Induzido pela Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 43 |
| 5.1.3. Determinação da Influência da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na Contração Induzida pelo cálcio e pela fenilefrina | 48 |
| 5.1.4. Determinação da Influência da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> em Receptores Colinérgicos Muscarínicos (M ₃) | 53 |
| 5.1.5. Determinação da Influência de Diferentes Incubações da Fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> no Vasorelaxamento Induzido pelos Compostos S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1) | 55 |
| 5.2. Estudo Bioquímico | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.1. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical Ânion Superóxido (O_2^-) pelo EBHA, Frações AcOEt e BuOH e Quercetina Sulfatada (FC01) de <i>Cuphea carthagenensis</i> - <u>Método Enzimático</u> | 60 |
| 5.2.2. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical Ânion Superóxido (O_2^-) pelo EBHA, Frações AcOEt e BuOH e Quercetina Sulfatada (FC01) de <i>Cuphea carthagenensis</i> - <u>Método Não-Enzimático</u> | 61 |
| 5.2.3. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical Hidroxila (OH) pelo EBHA, Frações AcOEt e BuOH e Quercetina Sulfatada (FC01) de <i>Cuphea carthagenensis</i> - <u>Medida da Degradação da Desoxirribose</u> | 69 |
| 6. DISCUSSÃO | 76 |
| RESUMO E CONCLUSÕES | 91 |
| SUMMARY AND CONCLUSIONS | 95 |
| BIBLIOGRAFIA | 98 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Constituintes Químicos Presentes nos Compostos de <i>Cuphea carthagenensis</i> Jacq McBride | 26 |
| Tabela 2 - Relaxamento induzido pelo EBHA, frações, subfrações e FC01 de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 42 |
| Tabela 3 - Efeito de diferentes drogas sobre o relaxamento induzido pela fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 47 |
| Tabela 4 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na contração induzida pelo cálcio | 50 |
| Tabela 5 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na contração induzida pela fenilefrina | 52 |
| Tabela 6 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de <i>cuphea carthagenensis</i> no relaxamento induzido pelo SNAP | 57 |
| Tabela 7 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de <i>cuphea carthagenensis</i> e da SOD no relaxamento induzido pelo SIN-1 | 59 |

| | |
|--|----|
| | vi |
| Tabela 8 - Relação das médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico (AU) e de redução do <i>nitro blue tetrazolium</i> , do ensaio enzimático e não-enzimático | 68 |
| Tabela 9 - Relação das médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose | 75 |
| Figura 1 - <i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq) Mcbride | 05 |
| Figura 2 - Esquema de fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico de <i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq) Mcbride | 25 |
| Figura 3 - Estrutura da substância quercetina-3-sulfato (FC01), isolada a partir de interface insolúvel de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 27 |
| Figura 4 - CCR cumulativas ao EBHA, BuOH e AcOEt de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 39 |
| Figura 5 - CCR cumulativas ao EBHA, BuOH, SN-1 e PPT-1 de <i>Cuphea carthagenensis</i> (endotélio íntegro e lesado) | 40 |
| Figura 6 - CCR cumulativas ao FC01 de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 41 |
| Figura 7 - CCR cumulativas à fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na ausência e na presença de L-NOARG e L-arginina | 45 |

| | |
|---|----|
| Figura 8 - CCR cumulativas à fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> na ausência e na presença de azul de metileno e ODQ..... | 46 |
| Figura 9 - CCR cumulativas ao cálcio, na ausência e na presença de incubações crescentes da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 49 |
| Figura 10 - CCR cumulativas à fenilefrina, na ausência e na presença de incubações crescentes da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 51 |
| Figura 11 - CCR à fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> e à acetilcolina, na ausência e na presença de atropina | 54 |
| Figura 12 - CCR cumulativas ao SNAP, na ausência e na presença da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 56 |
| Figura 13 - CCR cumulativas ao SIN-1, na ausência e na presença da fração BuOH de <i>Cuphea carthagenensis</i> e na ausência e na presença de SOD | 58 |
| Figura 14 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico e redução do NBT obtidas pelos ensaios enzimático e não-enzimático, realizado com o EBHA de <i>Cuphea carthagenensis</i> | 63 |
| Figura 15 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico e redução do NBT obtidas pelos ensaios enzimático e não-enzimático, realizado com a fração AcOEt de <i>Cuphea carthagenensis</i> .. | 64 |

- Figura 16** - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico e redução do NBT obtidas pelos ensaios enzimático e não-enzimático, realizado com a fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* .. 65
- Figura 17** - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico e redução do NBT obtidas pelos ensaios enzimático e não-enzimático, realizado com FC01 de *Cuphea carthagenensis* 66
- Figura 18** - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico e redução do NBT (Método Enzimático) e redução do NBT (Método Não-Enzimático), na concentração de 100 μ g/mL 67
- Figura 19** - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência e na presença de EBHA de *Cuphea carthagenensis* 70
- Figura 20** - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência e na presença da fração AcOEt de *Cuphea carthagenensis* 71
- Figura 21** - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência e na presença da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* 72

Figura 22 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de
degradação da desoxirribose, na ausência e na presença de FC01 de *Cuphea*
carthagenensis 73

Figura 23 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de
degradação da desoxirribose na presença do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 de
Cuphea carthagenensis, nas concentrações de 0,1 ; 1,0 ; 10,0 ; 100 μ g/mL
..... 74

1 - INTRODUÇÃO

De todos os métodos da medicina natural a fitoterapia é sem dúvida a mais antiga. Dele já lançava mão o homem pré-histórico, que aprendeu, como os animais, a distinguir as plantas comestíveis daquelas que podiam ajudá-lo a sanar suas doenças.

O conjunto de dados a respeito de plantas e de suas virtudes curativas, transmitidos de uma geração a outra, aos poucos foi sendo enriquecido com a incorporação contínua de novos conhecimentos, adquiridos através da experimentação prática guiada pela intuição. Na antigüidade, chineses, egípcios, hindus, gregos e romanos já dispunham de informações mais detalhadas sobre ervas medicinais sendo com o tempo classificadas e catalogadas, de acordo com critérios que levavam em conta tanto sua forma, cor, sabor e aroma como também suas ligações com os astros e seus atributos mágicos.

Com a evolução da ciência e o aperfeiçoamento dos sistemas e instrumentos de análise, as plantas medicinais começaram a ser estudadas do ponto de vista de sua composição química, procurando-se isolar seus princípios ativos para verificar que efeitos exerciam sobre o organismo animal e humano.

1.1. As Plantas Medicinais no Brasil

Historicamente, a maioria das plantas medicinais introduzidas nas primeiras farmacopéias o foram por sua reputação terapêutica sendo que as referências existentes são anteriores a 1960. Em toda a América Latina, as fontes de informação sobre plantas medicinais provém da medicina popular e dos antigos compêndios de fitoterapia, refletindo o emprego de remédios

numa época em que critérios éticos e científicos não haviam sido definidos (Jorquera *et al.*, 1993).

No Brasil, as plantas medicinais são consideradas como produtos não-éticos, tratados em muitos casos como suplemento alimentar, podendo ser adquiridas em farmácias de manipulação, supermercados e feiras livres, sendo o controle de qualidade bastante precário ou não existente. Além disso, no atual momento ainda não se faz necessário por lei o registro no Ministério da Saúde ou qualquer outro órgão controlador para o comércio e venda de plantas medicinais, a granel ou embalados como chás em saquinhos (Ferreira *et al.*, 1998).

Com relação as estimativas do mercado mundial de fitoterápicos, as estatísticas variam consideravelmente em função dos diferentes critérios empregados para a análise. Tomando-se como exemplo o trabalho de Jörg Grünwald (1995), baseado em dados do IMS e do Herbal Medical Database, o mercado mundial de fitoterápicos está avaliado em US\$ 12,4 bilhões, representando cerca de 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos.

1.2. *Cuphea carthagenensis* (Jacq) Mcbride

As plantas de uso popular indicadas empiricamente, foram durante muitos anos empregadas no tratamento de uma série de enfermidades. Deve ser considerado, no entanto, que ao serem utilizadas como “medicamentos”, devem ser avaliadas como tal, pela real comprovação de sua efetividade e seu índice terapêutico.

Sete-sangrias, cuféia ou guanxuma vermelha são os nomes populares dados às várias espécies do gênero *Cuphea* da família *Lythraceae*. A família das Litráceas, constituída de 22 gêneros e 500 espécies, é característica das regiões tropicais e subtropicais do continente americano, sendo encontrada

principalmente no Brasil e no México. O termo “Litrácea”, segundo Hoehne (1939-1978) derivou de *Lythrum*, que significa “sangue derramado”. As sete-sangrias mais populares no Brasil são as do gênero *Cuphea*, sendo-lhes atribuídas propriedades anti-sifilítica, antifebril, diaforética, laxativa, diurética e depurativa, além de ser considerada excelente remédio contra a aterosclerose, hipertensão arterial e palpitações do coração. (Hoehne, 1939-1979; Pio Corrêa, 1926-1979; Almeida, 1993). São plantas campestres, resistentes a períodos de seca prolongada e de raízes extremamente rijas e longas. As plantas desse gênero caracterizam-se por apresentarem pequenas flores, róseas ou vermelhas, apresentando longa giba sobre a base do cálice, típica das Litráceas. O gênero *Cuphea* tem no Brasil sua maior representação (93 espécies). Entre elas, são encontradas as arbustivas raras e as arborescentes nulas, sendo todas ervas com menos de 50 cm de altura (Santos *et al.*, 1987).

Na Ilha de Santa Catarina, as sete-sangrias são encontradas nas localidades de Jurerê, Rio Tavares, Rio Vermelho e Pântano do Sul, sempre em terrenos úmidos, como é de preferência da planta (Lourteig, 1969; Daros *et al.*, 1996). Na localidade da Costa da Lagoa foram encontradas as espécies *Cuphea carthagenensis* (Jacq) Mcbride e *Cuphea calophylla* Cham. et Schlecht identificadas pelo botânico Daniel de Barcellos Falkenberg (Depto de Botânica/UFSC).

Apesar de sua popularidade o gênero *Cuphea* ainda é muito pouco estudado. Estudos químicos se restringem ao óleo da semente, rico em ácido láurico e cáprico e de interesse para a indústria alimentícia, e aos extratos apolares da planta com identificação de stigmasterol, sitosterol, açúcares livres e triterpenos (Gonzalez *et al.*, 1994) sem referências à presença de flavonóides, caracterizados em ensaios fitoquímicos preliminares (Grenand *et al.*, 1987).

Estudos farmacológicos preliminares confirmaram a ação hipotensora do extrato bruto aquoso de *Cuphea aperta* Koehne, efeito este dissociado da ação anticolinesterásica também apresentada pelo mesmo extrato e evidenciaram uma ação em nível central com potenciação do sono barbitúrico (Santos *et al.*, 1987; Soezima *et al.*, 1992).



Figura 1 - *Cuphea carthagenensis* (Jacq) McBride. Coletada na Localidade da Costa da Lagoa - Florianópolis - Santa Catarina.

1.3. Óxido Nítrico

Nos últimos anos, o óxido nítrico (NO), um gás lipossolúvel, de meia vida curta e altamente reativo, tornou-se uma das moléculas mais exploradas da pesquisa biomédica. O interesse pelo papel fisiológico do óxido nítrico (NO) teve início na década de 80, quando Furchgott e Zawadzki (1980) caracterizaram esta molécula como sendo o Fator de Relaxamento Dependente do Endotélio (EDRF), responsável pelo relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. Em 1988, Palmer *et al.* verificaram que o NO é sintetizado a partir de um dos nitrogênios guanidino do aminoácido L-arginina, que é convertida em L-citrulina e que essa reação é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A formação NO a partir da L-arginina é promovida em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a formação do intermediário N^o-hidroxi-L-arginina. Na segunda etapa, o NO e a L-citrulina são gerados a partir da molécula intermediária e da oxidação de NADPH e H₄biopterina (cofatores da enzima NOS) (Aoki *et al.*, 1995).

Existem até o momento, três isoformas de NOS, codificadas por gens distintos, que diferem quanto aos cofatores necessários para a sua síntese e quanto à sua função (Moncada, 1994). A NOS do tipo I, também chamada de NOS neuronal (n-NOS) por estar presente nas células nervosas e a NOS do tipo III ou endotelial (e-NOS), presente nas células endoteliais vasculares e plaquetas, são ditas constitutivas. Estas isoformas são dependentes de cálcio e calmodulina para sua ativação e produzem quantidades picomolares de NO, liberadas em curtos períodos (Aoki *et al.*, 1995). No processo de formação do NO a partir das isoformas constitutivas, o íon cálcio liga-se à proteína calmodulina, formando um complexo que interage com a NOS. A enzima por sua vez, consome a L-arginina e libera NO e L-citrulina (Aoki *et al.*, 1995).

A liberação do NO proveniente das NOS constitutivas é promovida por estímulos físicos ou ainda por determinados agonistas (bradicinina, histamina, acetilcolina) e hormônios (Schulz e Triggle, 1994).

Uma outra isoforma, denominada de NOS do tipo II é também chamada de NOS induzida (iNOS), pois sua síntese nas células precisa ser induzida por fatores como lipopolissacarídeos bacterianos e/ou determinadas citocinas (Schulz e Triggle, 1994). Esta enzima é cálcio independente e pode ser encontrada em muitos tecidos, como nas células lisas musculares e macrófagos e nesse caso, o NO é produzido em quantidades nanomolares e por longos períodos (Aoki *et al.*, 1995).

Todas as isoformas de NOS descritas requerem NADPH (forma reduzida do dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina), L-arginina e oxigênio molecular como substratos e FAD (dinucleotídeo de flavina), FMN (mononucleotídeo de flavina), THB₄ (tetrahidrobiopterina) e grupamento heme como cofatores, liberando NO e L-citrulina como produtos (Schulz e Triggle, 1994; Lüscher, 1991).

A vasta localização celular das NOS somada à meia vida efêmera do NO e sua grande capacidade de difusão, revelam sua importância em inúmeros sistemas biológicos. Dentre inúmeros mecanismos descritos, o NO desempenha papel relevante em processos imunológicos, na aprendizagem e na memória, na neurotransmissão, no controle da pressão arterial e ainda na inibição da agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 1991; Snyder e Brecht, 1992).

1.3.1. NO e Tônus Vascular

O endotélio possui um papel relevante na homeostase vascular, bem como na modulação de diversas funções fisiológicas (Jaffe, 1985; Vane *et al.*,

1990; Ramos, 1992). As células endoteliais sintetizam e liberam uma grande variedade de substâncias como as endotelinas, angiotensina, fator ativador de plaquetas, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, interleucinas, prostaciclina e NO (Lüscher, 1994). O equilíbrio entre a síntese e a liberação dos agentes vasoconstritores e vasodilatadores mantém o sistema cardiovascular sob um tônus controlado de vasodilatação e a regulação desse tônus é de fundamental importância no controle da pressão arterial e do fluxo sanguíneo (Harrison. *et al.*, 1992; Snyder e Bred, 1992; Falcone, 1995).

A liberação basal de NO consiste num dos mais simples e fundamentais mecanismos de adaptação do sistema cardiovascular na manutenção do tônus normal dos vasos. O NO é liberado pelas células endoteliais quando ocorre um aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*). A elevação da pressão sanguínea sobre a parede dos vasos, promove um aumento compensatório na liberação de NO, que então relaxa esses vasos (Sessa *et al.*, 1994; Lüscher, 1991).

Quando o NO difunde-se para o citoplasma das células lisas vasculares subjacentes ao endotélio, liga-se ao ferro presente no grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel, alterando sua conformação. Esta enzima por sua vez, converte o nucleotídeo trifosfato de guanosina (GTP), formando o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), segundo mensageiro intracelular, responsável por muitas das ações do NO (Furchgott, 1984). A atuação do GMPc sobre proteínas quinase, determinadas fosfodiesterases e canais iônicos, os quais modulam a concentração intracelular de cálcio, promove a diminuição da força de contração e conseqüente relaxamento muscular (Milbourne e Bygrave, 1995; Marín e Rodríguez-Martínez, 1995). Pequenas concentrações de NO são capazes de ativar a guanilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de GMPc (Ignarro, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Aoki *et al.*, 1995).

A importância do NO no controle do tônus vascular pode ser evidenciada pela administração experimental de certos inibidores das enzimas NOS e guanilato ciclase (Gibson e Lilley, 1997). A administração de análogos da L-arginina, como o N^ω-nitro-L-arginina (L-NOARG) por via oral ou endovenosa é capaz de promover a contração significativa de artérias (Vallance *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1990) além de uma hipertensão que pode ser mantida por períodos relativamente longos (Rees *et al.*, 1989; Vallance *et al.*, 1989). Na etapa de formação do GMPc, tanto o azul de metileno quanto o 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alfa]quinoxalina (ODQ), ambas drogas inibidoras da enzima guanilato ciclase, são também capazes de inibir o relaxamento induzido pelo NO em anéis de aorta torácica de coelhos (Ragazzi *et al.*, 1995; Husain *et al.*, 1987).

O NO não somente controla a pressão arterial e o fluxo sanguíneo (Griendling e Alexander 1996), como também atua na agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1990) e na proliferação do músculo liso vascular (Dubey *et al.*, 1993). Quando o NO difunde-se para o interior das plaquetas, o aumento de GMPc promove a diminuição da agregação plaquetária e previne a adesão destas ao endotélio (Lüscher, 1994; Fernandes e Assreuy, 1995).

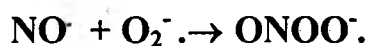
A participação da via L-arginina-NO tem sido implicada em várias desordens associadas tanto com a produção excessiva quanto com a subprodução de NO (Moncada e Higgs, 1993; Lüscher, 1994). Todavia, sendo o NO uma espécie reativa de oxigênio, outros mecanismos têm sido propostos para explicar as inúmeras enfermidades decorrentes do efeito inadequado desta molécula nas células alvo.

1.3.2. NO e Demais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O organismo dispõe de um sutil mecanismo de equilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (NO , O_2^- , ONOO^- , $\cdot\text{OH}$...) e os sistemas antioxidantes. No entanto, em doenças como no diabetes, aterosclerose, isquemia e em processos inflamatórios, ocorre um desequilíbrio na produção/inativação destas espécies reativas, havendo exposição celular ao estresse oxidativo e subseqüentes alterações na homeostase do cálcio. (Orrenius *et al.*, 1989; Pruijn *et al.*, 1989). O aumento da concentração de espécies reativas promove uma série de alterações como a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e a depleção intracelular de grupamentos tiólicos livres e ligados às membranas protéicas (Orrenius *et al.*, 1989; Bast *et al.*, 1991). Paralelamente, ocorrem a contração do músculo liso, o aumento da agregação plaquetária e a ativação de inúmeras enzimas degradativas, incluindo as fosfolipases, proteases e endonucleases (Orrenius *et al.*, 1989; Bast *et al.*, 1991).

A inativação do Fator de Relaxamento derivado do endotélio (EDRF) pelo O_2^- foi determinado antes mesmo da descoberta de que o EDRF se tratava do NO (Wei *et al.*, 1985; Rubanyi e Vanhoutte, 1986; Palmer *et al.*, 1987). O radical O_2^- é continuamente gerado *in vivo* na mitocôndria, através da cadeia respiratória (Shigenaga *et al.*, 1994) e por enzimas NADPH oxidases (Baggiolini e Wymann, 1990; Shigenaga *et al.*, 1994). Apesar disso, a concentração de O_2^- no interior das células é relativamente baixo, em torno de 10-100pM, devido a ação da enzima superóxido desmutase (SOD), que inativa o O_2^- formando H_2O_2 (Gryglewski *et al.*, 1986; Gartner e Fridovich, 1991).

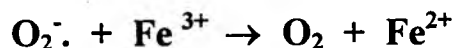
Embora a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD seja uma reação enzimática rápida (Klug *et al.*, 1972), a velocidade de reação deste ânion com o NO é duas a três vezes mais veloz. Desta maneira, o NO compete com a SOD pelo $O_2^{\cdot-}$, podendo ocorrer a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Beckman *et al.*, 1990).



A concentração de NO normalmente verificada *in vivo* varia de 10-100nM, mas pode ser significativamente aumentada, por exemplo durante uma oclusão de artéria cerebral, elevando a concentração para valores de até 4 μ M. Isso acarreta num maior número de moléculas de NO, que por sua vez podem reagir com o $O_2^{\cdot-}$, formando $ONOO^{\cdot-}$ (Malinski *et al.*, 1993).

O radical $ONOO^{\cdot-}$ é efetivamente mais reativo que seus precursores além de ser mais tóxico para a célula, quando comparado com o H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ou NO (Beckman *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1992; Brunelli *et al.*, 1995; Demiryurek *et al.*, 1998). Este radical é capaz de promover inúmeros danos oxidativos como a oxidação de proteínas (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995), a peroxidação lipídica (Radi *et al.*, 1991a) e a oxidação de grupamentos tiólicos (Radi *et al.*, 1991b). No interior da célula, o $ONOO^{\cdot-}$ reage com grupamentos tiólicos livres, com destaque para a glutathiona que é encontrada em maiores concentrações (Reed, 1990). Os grupamentos tiólicos são encontrados em altas concentrações (5-10 mM) no interior da célula e fazem parte do mecanismo de proteção contra a ação tóxica de radicais como o $ONOO^{\cdot-}$ (Radi *et al.*, 1991b; Augusto *et al.*, 1994). Estes grupamentos são os principais responsáveis pelo seqüestro de radicais peroxil e sua oxidação por parte do radical $ONOO^{\cdot-}$ acarreta em perda da função antioxidante. O sistema eficaz de proteção dos grupamentos tiólicos pode justificar a razão pela qual, aparentemente, não existam enzimas ou antioxidantes específicos para o $ONOO^{\cdot-}$. (Murphy *et al.*, 1998).

O radical OH \cdot pode ser gerado através da reação do O $_2\cdot^-$ e H $_2$ O $_2$ com determinados metais de transição como o ferro e o cobre presentes em determinadas proteínas:



Este tipo de radical pode ser gerado nas células em inúmeras situações, como na fagocitose (Baehner *et al.*, 1982), na biossíntese de prostaglandinas, especialmente na transformação de PGG $_2$ para PGH $_2$ (Torrieli *et al.*, 1984), na peroxidação lipídica (Marín e Rodríguez-Martínez, 1995) dentre outras.

Alguns estudos têm demonstrado que em neutrófilos, a geração de radicais OH \cdot é baixa (Ramos *et al.*, 1992) devido aos polimorfos apresentarem enzimas como a catalase e mieloperoxidases, responsáveis pelo consumo de H $_2$ O $_2$. Além disso, a maior parte do ferro encontrado em determinadas proteínas como transferrinas, lactoferrinas e ferritinas, está presente na sua forma inativa (Monteiro e Winterbourn, 1989), dificultando a reação de Fenton e conseqüentemente a formação de OH \cdot (Sauberman *et al.*, 1983). Por outro lado, caso estas células gerem uma quantidade considerável de O $_2\cdot^-$, estes radicais ganham acesso aos estoques intracelulares de ferro, promovendo a liberação do mesmo e conseqüentemente a geração de radicais OH \cdot (Grisham, 1992).

1.3.3. Desordens Cardiovasculares Relacionadas com o NO

1.3.3.1. Hipertensão Arterial

A hipertensão é uma desordem circulatória associada a uma alteração da pressão arterial decorrente de um aumento da resistência vascular periférica (Vanhoutte e Lüscher, 1986). No sistema cardiovascular, os elementos que em última análise determinam a resistência vascular periférica são as artérias de

pequeno calibre ou arteríolas, com diâmetro em torno de 200 μ m. (Folkow, 1982).

A combinação entre a descarga intermitente da bomba cardíaca e a alta resistência das arteríolas permite que o organismo mantenha um aporte sanguíneo constante nos tecidos. Por outro lado, caso ocorra um aumento adicional à resistência dessas arteríolas (decorrente do aumento da contração dos vasos e/ou espessamento da musculatura lisa vascular), ocorre também uma elevação adicional de pressão do sistema arterial para assegurar um fluxo inalterado nos capilares (Krieger e Krieger, 1995).

A hipertensão portanto, pode ser ocasionada pelo desequilíbrio entre a produção de fatores vasoconstritores e/ou pela produção deficiente de fatores vasodilatadores, com o conseqüente aumento do grau de contração da musculatura lisa vascular (Lüscher, 1994).

Além das catecolaminas liberadas pelo Sistema Nervoso Simpático, outras substâncias de ação vasoconstritora têm papel igualmente importante no controle da pressão arterial (Krieger e Krieger, 1995).

O endotélio vascular produz inúmeras substâncias vasoconstritoras passíveis de serem implicadas nos processos hipertensivos, como por exemplo a angiotensina II (AII) e a endotelina I (ET1) (Lüscher *et al.*, 1992). A angiotensina II, um octapeptídeo formado a partir da enzima conversora de angiotensina (ECA), está diretamente implicada na fisiopatogenia da hipertensão. A participação da angiotensina em processos hipertensivos pôde ser verificada em experimentos realizados com aorta e artéria coronária de ratos geneticamente hipertensivos (SHR - *Spontaneously hypertensive rats*). Nestes vasos, foi observado um aumento significativo das respostas contráteis induzidas pela angiotensina, além de uma maior atividade da ECA (Tschudi e Lüscher, 1995).

Com relação as endotelinas, o papel destes peptídeos na hipertensão permanece ainda controverso. No entanto, estudos têm revelado um aumento significativo no nível de endotelinas, em desordens ligadas a hipertensão arterial, como no infarte do miocárdio e na aterosclerose (Lüscher, 1994).

Apesar das inúmeras pesquisas relacionadas à patogenia da hipertensão, muitas questões permanecem ainda controversas. Inicialmente foi proposto que a simples diminuição da liberação de agentes vasodilatadores como NO, prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), poderiam acarretar o início da doença. No entanto vários estudos determinaram que enquanto certos leitos vasculares são afetados pela diminuição do relaxamento via endotélio, outros mantêm a função endotelial inalterada, em detrimento da pressão arterial elevada. (Lüscher e Vanhoutte, 1986; Lüscher, 1991; Tschudi *et al.*, 1991).

Uma das teorias mais aceitas atualmente, descreve que o vasorelaxamento deficiente que ocorre na hipertensão, diz respeito à inativação do NO, devido a um desequilíbrio entre sua produção e a geração concomitante das espécies reativas, como por exemplo, o radical ânion superóxido (Nava *et al.*, 1995).

De acordo com uma pesquisa recente, realizada com mulheres em situação de pré-eclâmpsia, foi verificado que embora a atividade da e-NOS seja maior nesta patologia, ocorre um aumento na formação de peroxinitrito, além de uma diminuição da atividade da SOD (Roggensack *et al.*, 1999). Estes dados corroboram com a teoria acima, onde a geração de peroxinitrito, seria uma consequência da inativação do NO pelo O₂⁻.

1.3.3.2. Aterosclerose

Em termos gerais, a aterosclerose pode ser definida pela formação de depósitos espessos de colesterol e seus ésteres na superfície das artérias, desencadeando processos de calcificação, necrose, trombose e ulceração de vasos. Está atualmente bem estabelecido que níveis plasmáticos elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) combinados com níveis baixos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) constituem fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Esterbauer *et al.*, 1990; Quinlan *et al.*, 1994; Batlouni, 1997).

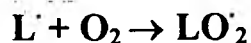
As LDL são formadas por um complexo de lípidos polares e neutros, uma proteína de grande peso molecular (apolipoproteína B ou apo B) e antioxidantes lipofílicos, principalmente o alfa-tócoferol e o beta-caroteno (Batlouni, 1997). A peroxidação lipídica tem início a partir dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos, localizados na parte externa e hidrofílica das LDL. Em seguida, atinge o centro hidrofóbico das lipoproteínas, oxidando os ácidos graxos poliinsaturados e o colesterol e finalmente, degrada a apo B (Steinbrecher *et al.*, 1990; Witztum, 1993).

Embora as reações de peroxidação lipídica envolvam, na maioria das vezes, uma série de componentes e produtos de oxidação, elas podem ser divididas em três fases principais: iniciação, propagação e reação terminal. A peroxidação lipídica inicia quando um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado é abstraído pelas EROs, com a subsequente formação de um radical alquila. De acordo com o esquema abaixo:



onde R[•] representa a espécie reativa iniciante capaz de promover a oxidação do ácido graxo poliinsaturado e LH representa o substrato lipídico.

A fase de propagação ocorre quando o radical alquila formado reage prontamente com o oxigênio molecular, formando um radical peroxila:



O radical peroxila por sua vez, é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo poliinsaturado com a concomitante formação de um novo radical lipídico (alquila) juntamente com um lipídio hidroperóxido:



Visto que os radicais alquila e peroxila podem ser regenerados, ocorre conseqüentemente uma reação em cadeia, com um ciclo de propagação indefinido e as moléculas lipídicas (substratos da reação) sendo continuamente convertidas em peroxilipídeos a partir de cada reação inicial. Contudo, este ciclo não é 100% eficiente e radicais peroxila podem reagir entre si, finalizando a reação em cadeia. A oxidação de lipídeos pode ainda ser promovida por metais de transição, como o cobre e as heme proteínas, através de um processo que requer a presença de hidroperóxidos lipídicos (Thomas e Jackson, 1991).



(Darley-Usmar *et al.*, 1995)

De acordo com a literatura, uma série de mecanismos têm sido sugeridos na patogenia da aterosclerose. Após a formação dos ateromas, a passagem de NO poderia estar sendo dificultada devido a alta proliferação da musculatura lisa vascular (Lopez *et al.*, 1989). Ainda segundo Rubbo *et al.*, (1994) a inativação do NO pelo $O_2^{\cdot-}$ (gerando $ONOO^{\cdot-}$) favoreceria a oxidação, sendo que a reação do NO com os produtos intermediários da peroxidação lipídica impediria a propagação da reação em cadeia (Rubbo *et al.*, 1994). O radical $ONOO^{\cdot-}$ por sua vez, participa na aterosclerose, basicamente de duas maneiras. Devido a ser um produto resultante da inativação do NO e não ser capaz de ativar a guanilato ciclase de maneira efetiva, contribui para a circulação

vascular deficiente. Além disso, o ONOO^- pode iniciar a peroxidação lipídica *per se* ou através da oxidação de grupamentos sulfidrílicos, facilitando desta maneira a formação dos ateromas (White *et al.*, 1994).

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha um importante papel na patogenia da aterosclerose despertou crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Os antioxidantes seqüestram os radicais formados, juntamente com outras enzimas capazes de prevenir a ação de espécies reativas (Farber *et al.*, 1990; Sies, 1993). Por outro lado, nas doenças cardiovasculares, os antioxidantes presentes na própria lipoproteína, nem sempre são capazes de oferecer uma proteção satisfatória e uma extensiva peroxidação lipídica pode ocorrer, contribuindo para a patogenia da aterosclerose (Palinski *et al.*, 1989; Esterbauer *et al.*, 1990; Yla-Herttuala *et al.*, 1990; Salonen *et al.*, 1992).

1.4. Flavonóides como Antioxidantes

Os flavonóides são compostos derivados biossinteticamente da chalcona e largamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados em diversos alimentos como maçã, uva, brócolis, cebola, aipo, pêssego, chá e vinho tinto (Dragsted, 1993; Batlouni, 1997; Kaneko e Baba, 1999). Muito embora apresentem variações estruturais, todos são formados por quinze átomos de carbono no seu núcleo básico, arranjados numa configuração C6-C3-C6, com dois anéis aromáticos ligados por três unidades de carbono que podem ou não formar um terceiro anel. Neste último caso, o núcleo básico vem a constituir o 2-fenilbenzopirano, característico para a maioria dessas substâncias (Rice-Evans, 1996).

O atual interesse das pesquisas no que diz respeito a bioatividade dos flavonóides é devido, ao menos em parte, ao potencial benéfico de seus

componentes fenólicos (Saponara e Bosisio, 1998), os quais possuem a capacidade de seqüestrar as espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sistemas biológicos, impedindo a oxidação de biomoléculas (Dragsted, 1993). De acordo com inúmeras pesquisas descritas na literatura, a ingesta dietética deficiente de substâncias antioxidantes, como a vitamina E, vitamina C, o beta-caroteno e determinados flavonóides, estaria associada a maior incidência de desordens cardiovasculares (Esterbauer *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1994; Batlouni, 1997).

Estudos indicam que a quercetina, um dos principais flavonóides encontrados em frutas e plantas de uso medicinal, é capaz de remover radicais superóxido e peróxidos lipídicos, inibindo a oxidação das LDL e os efeitos citotóxicos das LDL oxidadas em macrófagos (Husain *et al.*, 1987; Negre-Salvagyre e Salvagyre, 1992). Noutro experimento, a administração suplementar de quercetina + catequina numa dieta rica em ácidos graxos mono e poliinsaturados, promoveu a redução da peroxidação lipídica em ratos (Fremont *et al.*, 1998). Outras pesquisas indicam que dietas ricas em vegetais também protegem o organismo contra certos tipos de câncer, sendo essa proteção atribuída, ao menos em parte, aos flavonóides presentes na alimentação, além da vitamina C e dos β -carotenos (Avila *et al.*, 1994; Duthie e Dobson, 1999).

O vinho tinto contém diversos compostos fenólicos, flavonóides e não flavonóides, incluindo as catequinas, epicatequinas, flavonóis, antocianinas e taninos solúveis. Uma questão recentemente discutida é a correlação entre o consumo de vinho tinto e a dieta rica em flavonóides, com a baixa incidência de doença arterial coronária (DAC), observada em algumas regiões da França (paradoxo francês). O sul da França mantém uma baixa incidência de DAC, a despeito do alto consumo de cigarros e gorduras na dieta (Renaud e De Lorgeril, 1992). Acredita-se que, sendo a fonte alimentar daquele país muito

rica em constituintes fenólicos presentes no óleo de oliva, frutas cítricas e no próprio vinho tinto, poderia estar contribuindo na diminuição do número de casos da doença (Andriambeloson, 1997).

A associação entre a ingestão dietética de flavonóides e mortalidade coronária subsequente foi também avaliada num estudo envolvendo 5133 homens e mulheres, entre 30 e 69 anos, sem histórico de cardiopatias, de 30 comunidades da Finlândia. As observações iniciaram-se em 1967/72 e foram acompanhadas até 1992. Os autores concluíram que os indivíduos com baixa ingestão de flavonóides apresentaram maior risco de desenvolver DAC (Knekt *et al.*, 1996).

Os flavonóides têm sido portanto, muito discutidos na literatura, sendo suas propriedades terapêuticas amplamente sugeridas em inúmeras pesquisas feitas em animais e humanos, empregando-se os mais diferentes métodos de investigação. Com base nos dados obtidos na literatura, o presente estudo propõe uma possível ação vasorelaxante do EBHA, frações e subfrações de *Cuphea carthagenensis*, pela realização de estudos farmacológicos, *in vitro*, seguidos de ensaios bioquímicos para a verificação da capacidade antioxidante.

2 - OBJETIVOS

A partir do conhecimento do emprego popular de *C. carthagenensis* (Jacq) McBride em desordens cardiocirculatórias, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

2.1. Objetivos gerais

2.1.1. Investigar a atividade farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA), frações acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH), subfrações SN-1 e PPT-1 e quercetina sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* no músculo liso vascular;

2.1.2. Relacionar o efeito obtido nos experimentos farmacológicos com a atividade antioxidante dos componentes ativos da planta;

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar a atividade farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA), frações acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH), subfrações SN-1 e PPT-1 e quercetina sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* com relação a capacidade vasorelaxante, em experimentos realizados através do preparo de anéis isolados de aorta torácica de ratos;

2.2.2. Verificar a influência de determinadas drogas atuantes na via NO/GMPc, no relaxamento induzido pela fração BuOH;

2.2.3. Verificar a influência da incubação prévia da fração BuOH na contração induzida pelo cálcio e pela fenilefrina;

2.2.4. Analisar a influência da fração BuOH no relaxamento induzido por determinados compostos doadores de NO;

2.2.5. Verificar a influência da incubação prévia de atropina, no relaxamento induzido pela fração BuOH;

2.2.6. Caracterizar, através de ensaios bioquímicos, a capacidade sequestradora de O_2^- e OH^- do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 de *C. carthagenensis* procurando relacionar a atividade antioxidante com os resultados obtidos nos experimentos farmacológicos *in vitro*.

3 - MATERIAIS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos machos Wistar (10 - 12 semanas), pesando entre 180 - 220 gramas, provindos do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em grupos de 5 a 10 e mantidos em caixas plásticas com serragem, à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. A água e ração comercial foram fornecidas *ad libitum*.

3.2. Drogas

Todas as soluções foram preparadas com água destilada ou deionizada, com sais de pureza analítica (Merk A.G., Rio de Janeiro, Brasil). As drogas, bem como o EBHA, frações, subfrações e quercetina sulfatada foram dissolvidas em água destilada tamponada com fosfato (PBS, concentração em mM: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10) da Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

As seguintes drogas foram utilizadas: cloridrato de fenilefrina, cloridrato de acetilcolina, cloreto de azul de metileno, N^{\ominus} -nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, sulfato de atropina, superóxido dismutase (SOD), *nitro-blue-tetrazolium* (NBT), ácido nitrilotriacético (NTA), desoxirribose, ácido tiobarbitúrico (TBA), fenazina-metasulfato, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alfa]quinoxalin-1-one (ODQ), xantina, xantina oxidase, todas da Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA. A droga S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) foi preparada de acordo com Field *et al.*, 1978. O

cloreto férrico, manitol e o peróxido de hidrogênio foram adquiridos da Reagen e o ácido tricloroacético (TCA) foi adquirido da Merk A.G., Rio de Janeiro, Brasil.

3.3. Material Botânico

A espécie *Cuphea carthagenensis* foi coletada na localidade da Costa da Lagoa da Conceição (Florianópolis, SC), sempre no período matutino. Para a colheita do material (partes aéreas da planta), optou-se pelo final da primavera e início do verão, no período de dezembro/janeiro de 1995/96 (**Lote 1**) e janeiro de 1997 (**Lote 2**). Os períodos escolhidos estão relacionados com a época de inflorescência da planta, onde a mesma pode ser reconhecida com mais facilidade.

O material foi identificado pelo Prof. Daniel de Barcellos Falkenberg, do Depto. de Botânica da UFSC. Em seguida, foi inicialmente seco à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo posteriormente moído empregando-se um triturador de facas.

4 - MÉTODOS

4.1 Extração

Os procedimentos de extração, fracionamento, isolamento e identificação de quercetina-3-sulfato, bem como os ensaios fitoquímicos preliminares foram realizados pela Prof^a Dr^a Marení Rochia Farias, do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Para o isolamento da quercetina-3-sulfato (FC01) foi utilizado um extrato bruto hidroalcoólico preparado por maceração (24 hs) empregando-se 2,7 kg

de folhas e caules, secos ao ar e moídos e 4 litros de etanol/água (80:20)), preparado com o material do Lote 1.

Para a obtenção do EBHA, frações e subfrações (utilizados nos experimentos farmacológicos e bioquímicos) o EBHA foi preparado por maceração empregando-se etanol/água (70:30) na proporção de 175g de planta para 850 ml de líquido extrator, por 3-4 dias. O extrato filtrado foi concentrado em evaporador rotatório para a eliminação do etanol e, posteriormente liofilizado, obtendo-se 47 g do extrato bruto hidroalcoólico liofilizado, preparados com o material do Lote 2.

4.2. Fracionamento dos Extratos

Os extratos foram suspensos em água e fracionados por partição empregando-se solventes de polaridade crescente (éter de petróleo < diclorometano < acetato de etila < n-butanol) de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.

4.2.1. Testes Fitoquímicos Preliminares

Com o objetivo de verificar os principais grupos de constituintes químicos presentes no EBHA, em cada uma das frações e interface insolúvel (ppt), foram realizadas algumas reações químicas clássicas de caracterização (Dominguez, 1973; Marini-Bettolo, 1980; Akerele, 1984). Os ensaios indicaram reações positivas para compostos polifenólicos, flavonóides, taninos e esteróides e/ou núcleos triterpênicos. No EBHA, não foi detectada a presença de saponinas, antraquinonas livres e alcalóides

A Tabela 1 resume os grupos químicos de metabólitos secundários obtidos na análise fitoquímica preliminar realizada com EBHA, frações e interface insolúvel de *Cuphea carthagenensis*.

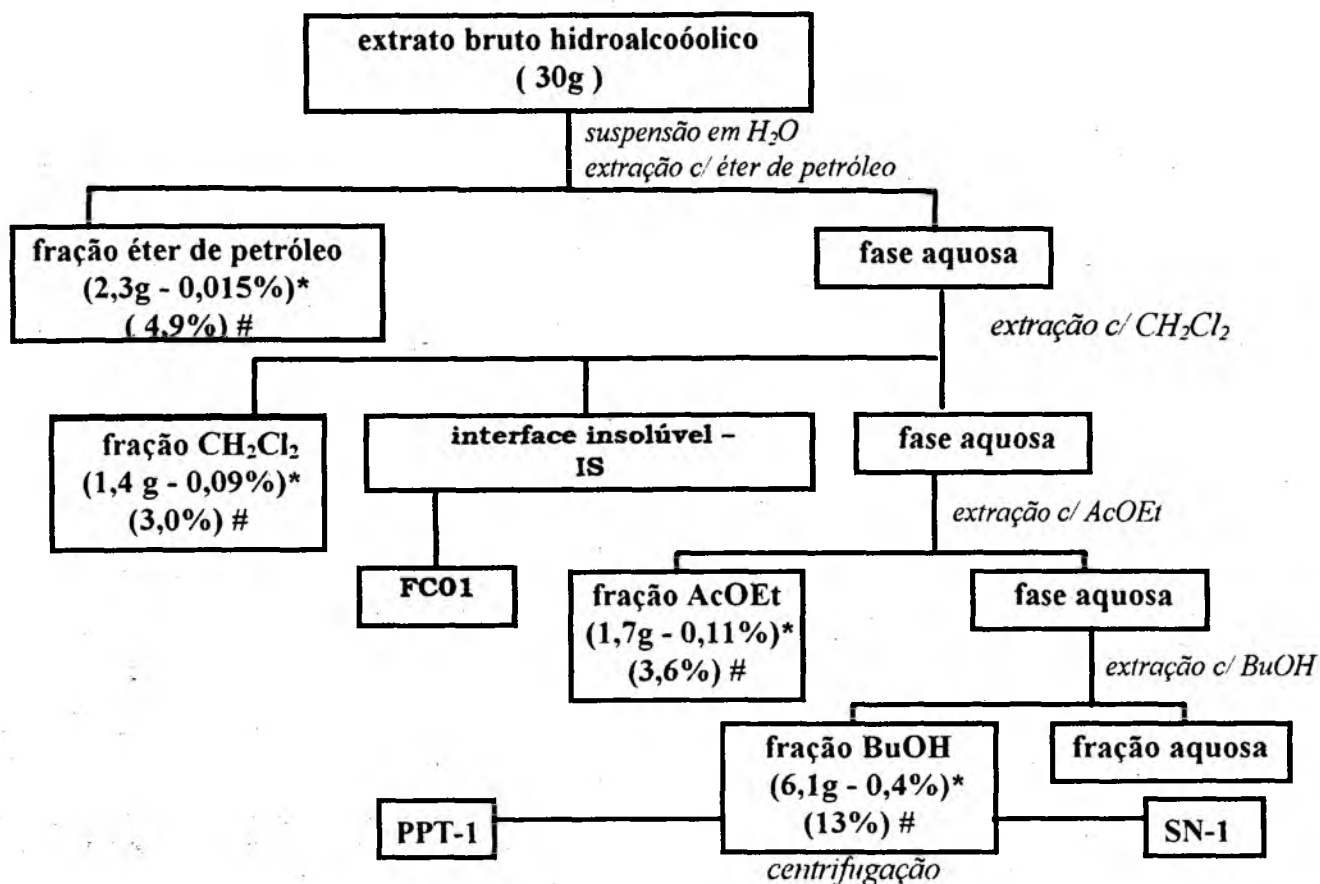


Figura 2 - Esquema de fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Mcbride.

* rendimento calculado em relação a planta seca.

rendimento calculado em relação ao extrato bruto.

Para as demais frações não foi possível calcular o rendimento devido à pequena quantidade obtida e à dificuldade de secagem do material.

TABELA 1 - Constituintes químicos presentes nos compostos de *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride.

| Reações de caracterização | Extrato ou Frações | | | | | | |
|--|--------------------|----|---------------------------------|-------|------|------|----|
| | EBHA | EP | CH ₂ Cl ₂ | AcOEt | BuOH | Aquo | IS |
| cloreto férrico (polifenóis) | + | - | - | + | + | + | + |
| cianidina ou Shinoda (flavonóides) | + | - | - | ++ | ++ | + | ++ |
| gelatina (taninos) | + | - | - | + | + | - | - |
| Stiasny (tan. Condensados) | + | - | - | - | + | - | - |
| (tan. Hidrolisáveis) | + | - | - | + | + | - | - |
| Bomträger (antraquinonas) | - | * | * | * | * | * | * |
| Liebermann-Buchard (núcleos triterpênicos e esteróides) | ± | ++ | + | - | - | - | - |
| Salkowsky (esteróides) | + | + | + | - | - | - | - |
| Espuma (saponinas) | - | * | * | * | * | * | * |
| Kedde (anel lactônico pentagonal insaturado dos cardenólídeos) | ± | - | - | ± | ± | ± | - |
| Keller-Killiani (desoxioses em extremidades livres dos heterosídeos cardiotônicos) | ± | + | + | - | - | - | - |
| Mayer | - | * | * | * | * | * | * |
| Dargendorff | - | * | * | * | * | * | * |
| Wagner | - | * | * | * | * | * | * |
| Bertrand (alcalóides) | - | * | * | * | * | * | * |

EBHA – extrato bruto hidroalcoólico; EP – fração éter de petróleo; CH₂Cl₂ - fração diclorometano; AcOEt = fração acetato de etila; BuOH – fração butanólica; Aquo – fração aquosa; IS - interface insolúvel.

++ reação positiva

+ reação fracamente positiva

± reação duvidosa

* não realizado

4.2.2. Identificação da Substância FC01 (quercetina-3-sulfato)

O grau de pureza de FC01 foi verificado através de cromatografia em camada delgada, sendo a substância identificada como quercetina-3-sulfato através de dados espectroscópicos de ultravioleta e ressonância magnética de C^{13} , em comparação com dados da literatura, bem como hidrólise e comparação cromatográfica com padrão de quercetina (Merck®).

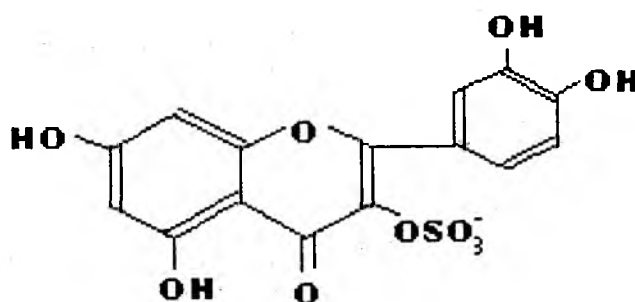


Figura 3 - Estrutura da substância quercetina-3-sulfato (FC01), isolada a partir da interface insolúvel (IS) de *Cuphea carthagenensis* e identificada através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

4.3. Montagem das Preparações Isoladas de Anel de Aorta Torácica de Rato

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica específica para este tipo de preparação, retirando-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (Andriambeloson *et al.*, 1997).

O vaso foi então seccionado na forma de anéis de 3 - 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume

total de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, de acordo com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 0,9; NaHCO₃ 25; glicose 11. Nos experimentos onde foram realizadas curvas concentração-resposta (CCR) cumulativas ao cálcio, foi utilizada solução de Krebs-Henseleit despolarizante, mediante a substituição isosmótica de NaCl (37mM) por KCl (80mM). A solução nutriente foi mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um polígrafo da marca Beckmann 511-A. A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos.

4.3.1. Protocolos Experimentais Farmacológicos

Após o período de equilíbrio que variou de 45 a 90 minutos, dependendo do ensaio experimental, as preparações foram contraídas com fenilefrina (30nM-100nM) para verificar a capacidade contrátil das mesmas.

A presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (ACh, 1μM) induzir ao relaxamento das preparações contraídas previamente com fenilefrina. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 80% foram consideradas com endotélio íntegro.

Nos experimentos onde pretendeu-se investigar a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorelaxante do EBHA, frações e subfrações, foi realizada a remoção da camada de células endoteliais (Corrêa *et al.*, 1991). Para este procedimento, uma das hastes utilizadas na montagem dos vasos ao sistema, foi levemente friccionada contra a superfície interna das preparações. A lesão do endotélio vascular foi considerada após a verificação da ausência

total de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh, 1 μ M), em vasos contraídos previamente com fenilefrina. Após o teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos. Convém esclarecer ainda, que cada preparação foi exposta a uma única CCR cumulativa ao EBHA, às frações, subfrações e ao FC01 de *Cuphea carthagenensis*.

4.3.1.1. Caracterização do Efeito Vasorelaxante do EBHA, AcOEt, BuOH, Subfrações SN-1, PPT-1 e do FC01 de *Cuphea carthagenensis*

Avaliadas a presença ou a ausência do endotélio vascular, as preparações foram lavadas com solução nutriente sendo aguardados 30 minutos para o retorno da tensão à linha de base. Em seguida, foram realizadas CCR cumulativas individuais (0,1 - 3000,0 μ g/mL) ao EBHA, às frações AcOEt, BuOH e às subfrações SN-1 e PPT-1, em anéis previamente contraídas com fenilefrina (30 - 100 nM). Nas CCR cumulativas realizadas com a quercetina sulfatada FC01, a concentração variou de 0,01 - 300,0 μ g/mL, em preparações contraídas previamente com fenilefrina (30 -100 nM).

4.3.1.2. Verificação da Influência da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* na Via NO/GMPc

Para avaliar a participação da via do óxido nítrico (NO) no efeito vasorelaxante da fração BuOH, foram realizadas CCR cumulativas à essa fração, em preparações com endotélio íntegro e na presença de N^w-nitro-L-arginina (L-NOARG, 10 e 30 μ M), inibidor da enzima NO-sintase (Moore *et al.*, 1990). O L-NOARG foi incubado 20 minutos antes da realização das CCR cumulativas à fração butanólica.

O efeito relaxante da fração BuOH em aorta torácica de ratos também foi avaliado na presença de um excesso de L-arginina (1mM), substrato endógeno de NO, incubada 10 minutos antes da adição do L-NOARG (10 μ M) ao banho. Após a incubação do L-NOARG foram aguardados 20 minutos para o início das CCR cumulativas à fração BuOH.

Com o intuito de investigar a influência da fração butanólica na etapa final de formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), foram realizadas incubações com azul de metileno (10 μ M), droga inibidora (não-seletiva) da enzima guanilato ciclase (Ragazzi *et al*, 1995), bem como com ODQ (1 μ M), um inibidor seletivo desta mesma enzima (Garthwaite *et al.*, 1995), adicionados 20 minutos antes do início das CCR cumulativas à fração butanólica.

4.3.1.3. Verificação da Influência da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* na Contração Induzida pelo cálcio e pela fenilefrina

O efeito da fração butanólica também foi avaliado em relação a resposta contrátil induzida pela fenilefrina e pelo cálcio. Nos experimentos onde procurou-se verificar a influência da fração BuOH na contração induzida pelo cálcio, foram realizadas CCR cumulativas (1 μ M - 30mM) ao cálcio, na ausência e na presença de incubações isoladas crescentes (10, 30 e 100 μ g/mL) da fração butanólica, adicionadas às cubas 20 minutos antes da realização das CCR cumulativas ao cálcio. Para a retirada do cálcio, as preparações foram lavadas com líquido de Krebs-Despolarizante a cada 15 minutos durante 1 hora, adicionado após a verificação da integridade do endotélio.

Nos experimentos com fenilefrina, foram realizadas CCR cumulativas a este agonista α 1 adrenérgico (1nM - 30 μ M), na ausência e na presença de

incubações isoladas crescentes (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) da fração butanólica, adicionadas às cubas 20 minutos antes do início da realização das CCR cumulativas à fenilefrina.

4.3.1.4. Verificação da Influência da Incubação Prévia de atropina no Relaxamento Induzido pela Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis*

Para investigar a influência da fração BuOH nos receptores colinérgicos muscarínicos M_3 , presentes no endotélio vascular e responsáveis pelo relaxamento induzido pela Ach (Furchgott e Zawadzki, 1980), foram realizadas também CCR cumulativas à fração BuOH na ausência e na presença de $1\mu\text{M}$ de atropina, adicionada 20 minutos antes do início das CCR cumulativas à fração butanólica. Neste protocolos, CCR cumulativas à acetilcolina (3nM - $1\mu\text{M}$) foram realizadas como controle positivo paralelo.

4.3.1.5. Influência da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* no Vasorelaxamento Induzido pelos Compostos S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1)

A possível capacidade sequestradora da fração butanólica sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs), foi avaliada pela realização de CCR cumulativas aos compostos S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) na ausência de endotélio vascular (Feelisch *et al.*, 1989; Holm *et al.*, 1998). Nos experimentos com o SNAP (1nM - $1\mu\text{M}$), as preparações foram submetidas a incubações isoladas (30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) da fração BuOH, 15 minutos antes da realização das CCR ao doador. Da mesma forma, as CCR cumulativas (0,1nM - $1\mu\text{M}$) ao SIN-1 foram realizadas

após 15 de incubação (30 e 100 µg/mL) da fração butanólica. Como controle positivo do SIN-1, foi utilizada a SOD (100U/mL), adicionada imediatamente antes da realização das CCR cumulativas ao composto doador de NO.

4.4. Capacidade Sequestradora de Radical Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

4.4.1. Método Enzimático

Neste ensaio, foi utilizado o sistema xantina /xantina oxidase (gerador de EROs), segundo Robak e Gryglewski (1988) para avaliar a capacidade sequestradora do EBHA, das frações e do FC01 sobre o radical ânion superóxido. A enzima xantina oxidase (XO) cataliza a formação do ácido úrico a partir da xantina, gerando também $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , segundo a reação:



Inicialmente foi avaliado o efeito do EBHA, das frações AcOEt, BuOH, bem como da quercetina sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* sobre a atividade da enzima XO. Este procedimento foi fundamental para determinar se o EBHA bem como as frações, seriam capazes de sequestrar $O_2^{\cdot-}$, ou simplesmente diminuir a eficiência do sistema gerador de $O_2^{\cdot-}$ (xantina/XO).

O meio de incubação deste ensaio consistiu de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,8), xantina (100 µM) e xantina oxidase (0,04 U/mL). Todos os compostos foram adicionados antes da adição da enzima. Um branco com cada concentração do composto teste foi realizado sem a adição da XO. A incubação foi realizada à temperatura ambiente (25 °C). Após 10 minutos de incubação, a reação foi bloqueada colocando-se os tubos teste em banho de gelo. Em seguida prosseguiu-se com a medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 295 nm. Considerou-se 100% da atividade da enzima a reação sem a presença do EBHA, de frações ou da quercetina sulfatada.

Para verificar a capacidade sequestradora de O_2^- foram realizados ensaios paralelos, utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, acrescentando ainda ao meio de reação $200\mu M$ de NBT (“*nitro blue tetrazolium*”) antes da adição das substâncias teste. O NBT reage prontamente com o O_2^- , sendo reduzido por este e formando um produto corado, que pode ser medido espectrofotometricamente a 560 nm. Nesta etapa, foi utilizada também a enzima superóxido dismutase (SOD; 100U/mL) como controle positivo do ensaio. Considerou-se 100% da redução do NBT a reação sem a presença de extrato, frações ou FC01.

4.4.2. Método Não-Enzimático

Para avaliar a capacidade sequestradora de O_2^- , além do método enzimático acima descrito, foi também utilizado o sistema fenazina-metasulfato-NADH para a geração deste radical, segundo Røbak e Gryglewski, 1988. Neste sistema, o O_2^- gerado, reduz o NBT produzindo o formazan.

O meio de incubação deste ensaio consistiu de fenazina-metasulfato ($10\mu M$), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH, $78\mu M$) e *nitro blue tetrazolium* (NBT, $25\mu M$) em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4). A enzima superóxido dismutase (SOD; 100U/mL) foi também utilizada neste ensaio, como controle positivo. Após dois minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se aos tubos teste, HCl 0,01N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm contra um branco o qual não continha fenazina-metasulfato. Tomou-se como 100% da redução do NBT, a reação sem a presença do EBHA, frações e FC01.

4.5. Determinação de Danos Oxidativos à Desoxirribose

O sistema gerador de EROs (radical $\text{OH}\cdot$) utilizado para detecção de danos oxidativos à desoxirribose foi realizado de acordo com Nishida *et al.*, 1991. A detecção dos produtos oxidados (TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizada como descrita em Halliwell e Gutteridge, 1981.

Neste ensaio é gerado radical $\text{OH}\cdot$, através da reação do $\text{Fe}^{3+} + \text{NTA}$ com o H_2O_2 . O radical $\text{OH}\cdot$, produzido através da reação de Fenton, é capaz de oxidar a desoxirribose. O produto dessa oxidação (TBARS) reage prontamente com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto corado, que é medido espectrofotometricamente. Os radicais $\text{OH}\cdot$ gerados provocam a degradação da desoxirribose, formando produtos similares ao dialdeído malônico, os quais reagem com o ácido tiobarbitúrico (Halliwell e Gutteridge, 1981). Os ensaios foram realizados em triplicatas, num volume final de 1,2 mL.

Inicialmente foi realizada uma pré-incubação de 25 μL de solução estoque de FeCl_3 (25 μM) com 100 μL da solução estoque de ácido nitrilotriacético (NTA; 100 μM), por 10 minutos à temperatura ambiente, para a formação do quelato. Posteriormente foi adicionado sequencialmente: água purificada em Sistema MilliQ (volume necessário para completar 1,2 mL), 150 μL de tampão fosfato (0,01M), 100 μL de solução de desoxirribose (2,8 mM) e por último, 100 μL H_2O_2 (1,4 mM). Os tubos foram incubados por 20 minutos em banho -maria a 37°C. Ao final da incubação foi realizada a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA - reagente de cor), onde foram adicionados aos ensaios 1 mL da solução de TBA 1% e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA - acidificante do meio), 2,8%.

Os ensaios foram incubados por mais 15 minutos à temperatura de 100°C para a formação de pigmento e ao final do tempo, resfriados

imediatamente em banho de gelo. A absorbância dos ensaios foi medida em espectrofotômetro visível a 532 nm à temperatura ambiente, contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose. Nos ensaios contendo as amostras, foi adicionado 240 mL das diluições dos mesmos ao meio de reação, antes da adição de H₂O₂. A absorbância de cada ensaio foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração de EBHA, frações ou FC01. O manitol, (250mM) foi utilizado paralelamente como controle positivo dos ensaios (inibição da degradação da desoxirribose). Os resultados foram expressos em percentagens, considerando-se os valores médios da absorbância dos controles como 100% da degradação da desoxirribose.

4.6. Apresentação dos Resultados e Análise Estatística

Os relaxamentos induzidos pelo EBHA, frações, subfrações, FC01, pelos doadores de NO (SNAP e SIN-1) e pela acetilcolina foram apresentados como porcentagem de relaxamento em relação à contração máxima da fenilefrina. As contrações induzidas pelo cálcio e fenilefrina foram apresentadas como percentagens da resposta máxima (considerada como 100%) de cada agonista, respectivamente.

As CI₅₀ (concentrações inibitórias que promoveram 50% dos relaxamentos máximos obtidos) e as CE₅₀ (concentrações efetivas que promoveram 50% da contração máxima de agonistas) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança para 95% (Fleming *et al*, 1972). Os relaxamentos máximos (R_{max}) e as contrações máximas (E_{max}) foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

Nos ensaios bioquímicos, os resultados foram expressos em porcentagens \pm EPM, considerando-se 100%, os valores médios da absorbância dos controles.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não-pareadas (Snedecor e Cochran, 1967) ou a análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes de Newman-Keuls ou Tukey como ANOVA-*post tests*, para experimentos com mais de duas amostras. As diferenças ponto-a-ponto entre os valores experimentais obtidos com diferentes grupos, que apresentaram níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5% ($p < 0,05\%$) foram consideradas estatisticamente significantes.

5 - RESULTADOS

5.1. Estudo Farmacológico

5.1.1. Avaliação do Relaxamento Induzido pelo EBHA, Frações, Subfrações e FC01 de *Cuphea carthagenensis*, em Aorta Torácica de Ratos

Para avaliar o efeito do EBHA e das frações AcOEt e BuOH sobre a musculatura lisa vascular, foram realizadas CCR cumulativas em anéis de aorta torácica de ratos, na presença de endotélio funcional. As CCR cumulativas ao EBHA e às frações (Figura 4) revelaram que a fração BuOH foi mais efetiva em promover o relaxamento das preparações como pode ser verificado pelos respectivos valores de $CI_{50} + I.C.$ e R_{max} descritos na Tabela 2.

Na Figura 5a estão novamente representadas as CCR cumulativas ao EBHA e BuOH, juntamente com as duas subfrações obtidas a partir da fração butanólica, o SN-1 e o PPT-1. Os resultados mostram que as subfrações SN-1 e PPT-1 não relaxaram as preparações de maneira semelhante a fração de origem (BuOH), sendo que ambas apresentaram valores de $CI_{50} + I.C.$ superiores aos valores obtidos com o EBHA. Com relação ao R_{max} , a fração BuOH relaxou as preparações de maneira semelhante à subfração SN-1, sendo que o relaxamento máximo promovido pelo EBHA foi similar à subfração PPT-1.

As CCR cumulativas ao EBHA, às frações e subfrações, realizadas na ausência de endotélio funcional, estão representadas na Figura 5b. Nesta figura, pode-se verificar que a retirada da camada endotelial promoveu um significativo deslocamento das CCR cumulativas para a direita, ou seja, são

necessárias concentrações superiores à $100\mu\text{g/mL}$ para promover o início do relaxamento independente da presença de endotélio.

O efeito da quercetina-3-sulfato (FC01) sobre o músculo liso vascular foi também avaliado. Como pode ser visto na Figura 6, este flavonóide promoveu apenas um discreto relaxamento das preparações, verificado somente nas concentrações superiores à $100\mu\text{g/mL}$.

A partir da análise dos primeiros resultados farmacológicos obtidos com o EBHA, frações, subfrações e FC01, optou-se pela fração butanólica (BuOH) de *Cuphea carthagenensis* para os experimentos subseqüentes, visto que apresentou os menores valores de CI_{50} e I.C.. Na Tabela 2 estão representadas as médias das concentrações efetivas (CI_{50}), acompanhadas de seus respectivos limites de confiança (IC95%) e relaxamento máximo.

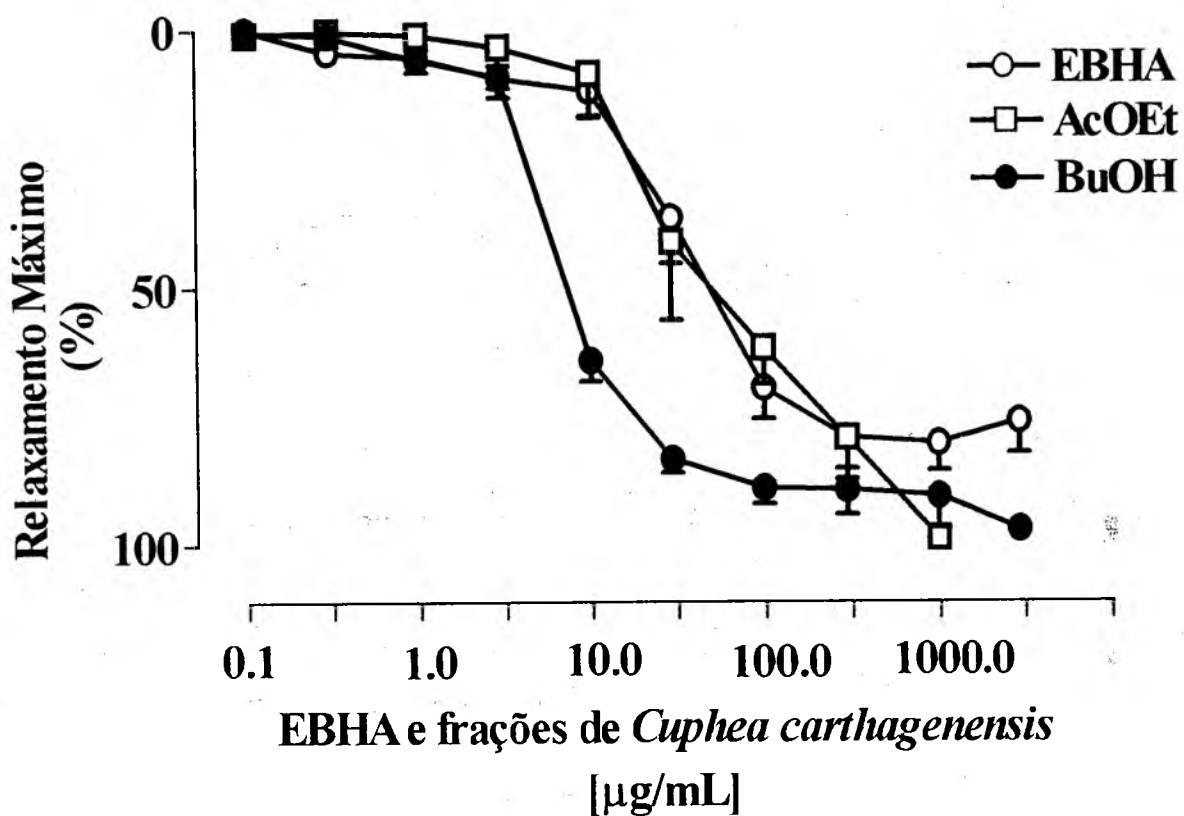


Figura 4 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao EBHA, BuOH e AcOEt de *Cuphea carthagenensis* (0,1 - 3000,0 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na presença de endotélio funcional. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 - 8 experimentos.

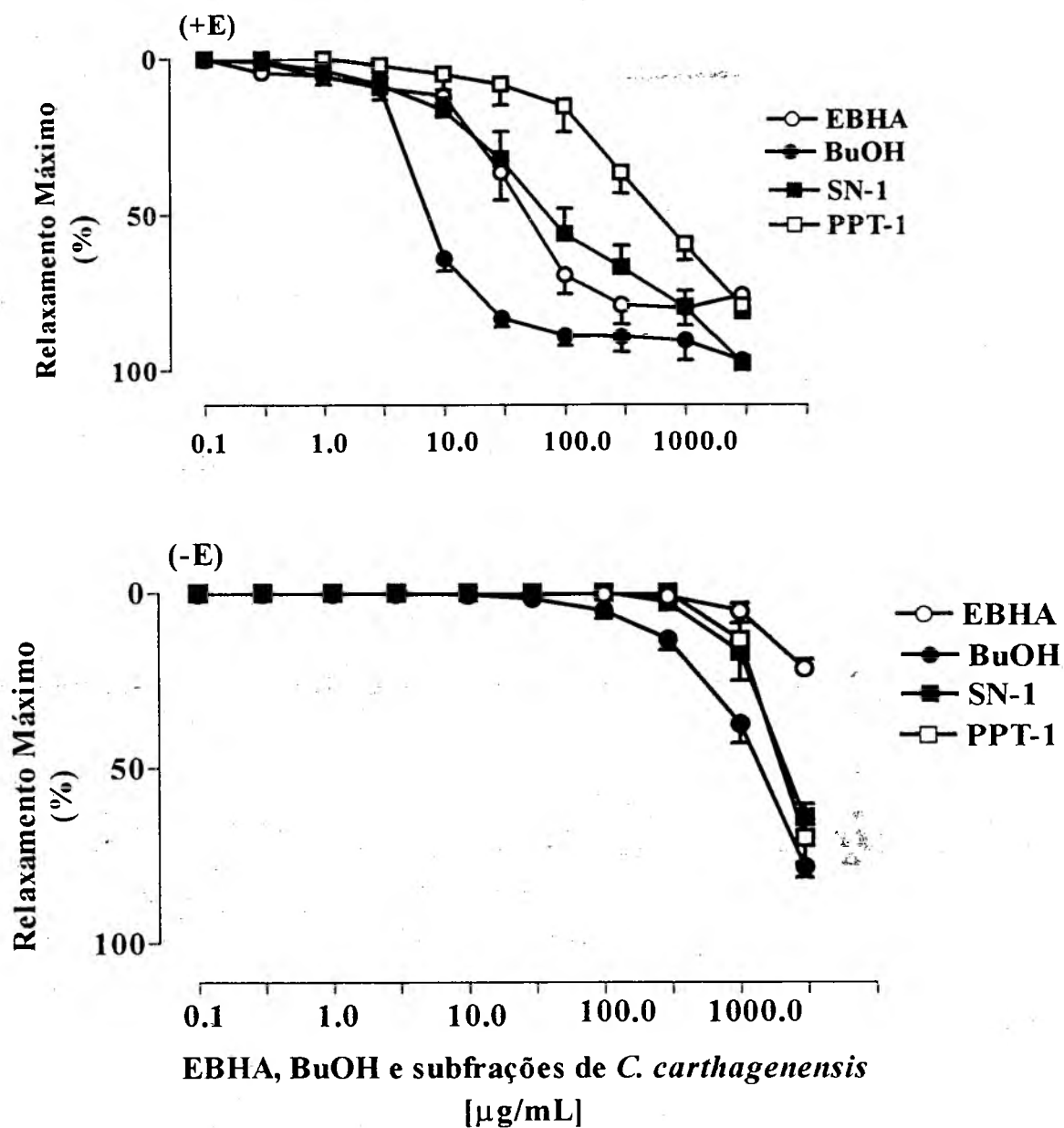


Figura 5 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao EBHA, BuOH, SN-1 e PPT-1 de *Cuphea carthagenensis* (0,1 - 3000,0 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na presença (+ E) e na ausência (-E) de endotélio funcional. Cada ponto representa a média ± EPM de 6 - 12 experimentos.

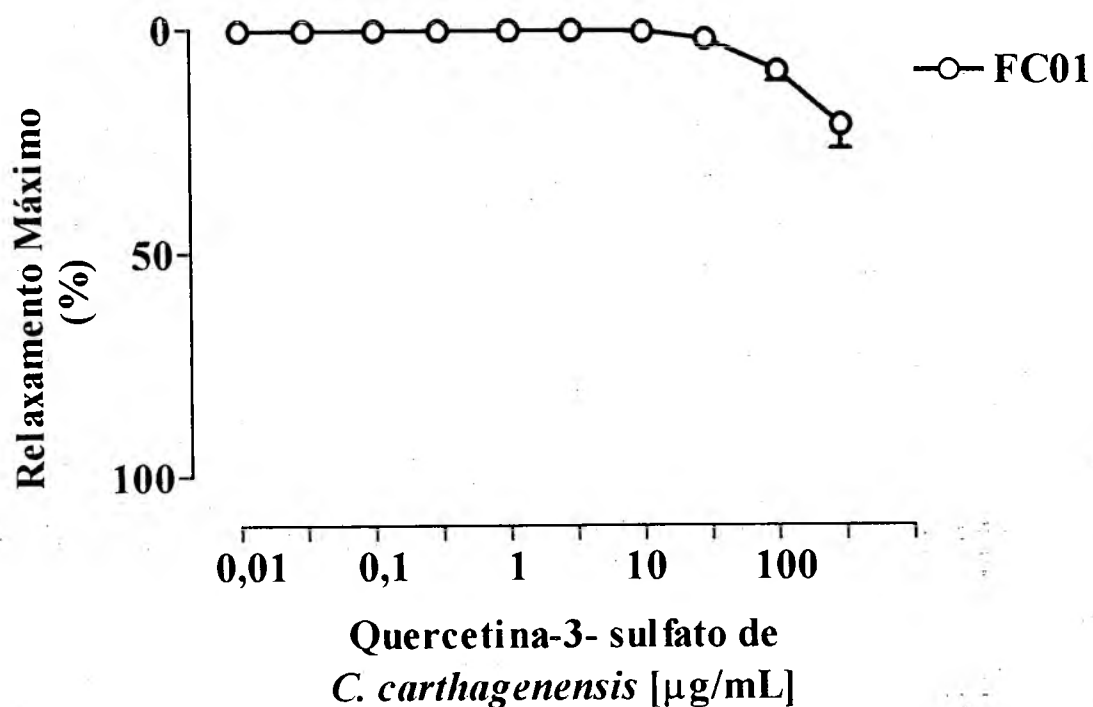


Figura 6 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao FC01 de *Cuphea carthagenensis* (0,01 - 300,0 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na presença de endotélio funcional. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 experimentos.

TABELA 2 - Relaxamento induzido pelo EBHA, frações, subfrações e FC01 de *Cuphea carthagenensis*, em preparações isoladas de aorta torácica de rato na presença (+E) e na ausência (-E) de endotélio funcional.

| | CI₅₀⁽¹⁾ (µg/mL) | Rmax⁽²⁾ (%) |
|-------------------|--|---|
| EBHA (+E) | 34,66 (19,42 - 61,86) | 76,02 ± 6,36 |
| EBHA (-E) | ND* | 21,80 ± 2,61 |
| AcOEt (+E) | 56,97 (34,19 - 94,91) | 98,78 ± 1,21 |
| AcOEt (-E) | ND* | ND* |
| BuOH (+E) | 6,85 (3,30 - 14,18) | 97,10 ± 1,83 |
| BuOH (-E) | 1105,00 (747,00 - 1463,00) | 78,32 ± 3,14 |
| SN-1 (+E) | 67,67 (38,68 - 118,40) | 97,93 ± 0,98 |
| SN-1 (-E) | 1467,00 (761,00 - 2173,00) | 64,30 ± 12,87 |
| PPT-1 (+E) | 487,91 (382,30 - 622,68) | 79,49 ± 4,01 |
| PPT-1 (-E) | 1525,00 (1336,00 - 1714,00) | 70,10 ± 9,58 |
| FC01 (+E) | ND* | 21,72 ± 5,38 |

⁽¹⁾ CI₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

⁽²⁾ R_{max} é apresentado como média ± EPM, referente à % do efeito máximo de relaxamento.

*ND : não determinado.

5.1.2. Determinação da Influência de Diferentes Drogas Atuantes na Via NO/GMPc, no Vasorelaxamento Induzido pela Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis*

De acordo com os resultados anteriores, a fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* promoveu o relaxamento das preparações, dependente da presença de endotélio. Para confirmar a relevância do endotélio no relaxamento induzido pela fração BuOH e avaliar o envolvimento da mesma na via NO/GMPc, procurou-se determinar a influência de diferentes drogas atuantes nesta via, no relaxamento promovido pela fração BuOH. Para isso, foram primeiramente realizadas CCR cumulativas ao BuOH na presença de diferentes incubações de L-NOARG, droga inibidora das enzimas NOS.

A Figura 7a ilustra as CCR médias ao efeito vasorelaxante da fração BuOH, na ausência e na presença de L-NOARG (10 e 30 μ M), em anéis de aorta torácica de rato, com endotélio íntegro. De acordo com ambas as incubações de L-NOARG, ocorreu um significativo deslocamento das CCR cumulativas à fração BuOH para a direita, sendo que o relaxamento induzido por esta fração praticamente não foi observado nem nas maiores concentrações. As incubações prévias com L-NOARG inibiram significativamente o relaxamento induzido pela fração BuOH, evidenciando a importância da presença do endotélio vascular no relaxamento promovido pela fração.

Para investigar a reversão do efeito promovido pelo L-NOARG, foram realizadas CCR cumulativas à fração BuOH, na presença do aminoácido L-arginina, substrato endógeno para a formação de NO. A figura 7b revela que a adição de 1mM de L-arginina, reverteu significativamente o efeito inibitório do

L-NOARG ($10\mu\text{M}$), sobre a resposta relaxante induzida pela fração butanólica. Os valores de R_{max} (100%) e $\text{CI}_{50} + \text{IC}$ 16,15 (9,93 - 26,26) das CCR cumulativas à fração BuOH na presença de L-arginina, aproximaram-se muito aos valores obtidos com o grupo controle: R_{max} (97,10); CI_{50} 6,85 (3,30 - 14,18), (Tabela 3).

Na figura 8, temos o efeito da incubação prévia do azul de metileno ($10\mu\text{M}$) e do ODQ ($1\mu\text{M}$), ambos inibidores da enzima guanilato ciclase, no relaxamento induzido pela fração BuOH. O tratamento prévio com o azul de metileno, inibiu cerca de 53 vezes o relaxamento induzido pela fração BuOH. O deslocamento significativo da CCR para a direita ocorreu também na presença do ODQ, que inibiu o relaxamento induzido pela fração butanólica cerca de 28 vezes. Os parâmetros farmacológicos analisados estão expressos na Tabela 3.

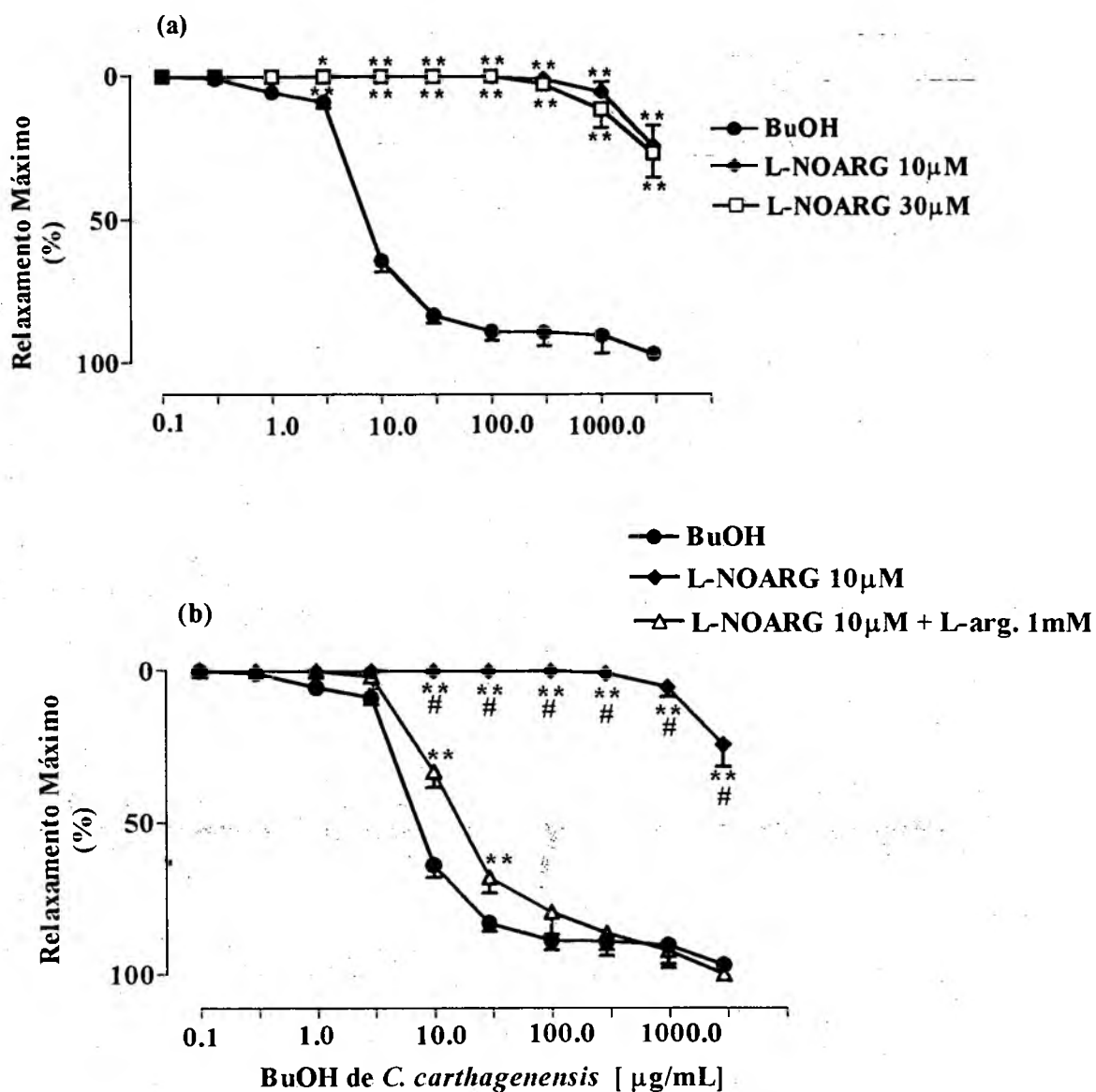


Figure 7 - Curvas concentração-resposta cumulativas médias à fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (0,1 - 3000,0 μg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na ausência e na presença de (a): L-NOARG (10 e 30 μM) e (b): L-NOARG (10 μM) + L-arginina (1 mM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ representa a diferença significativa dos grupos tratados, comparados ao grupo controle; # $p < 0,001$ representa a diferença entre os grupos tratados (ANOVA/Newman-Keuls). Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 - 7 experimentos.

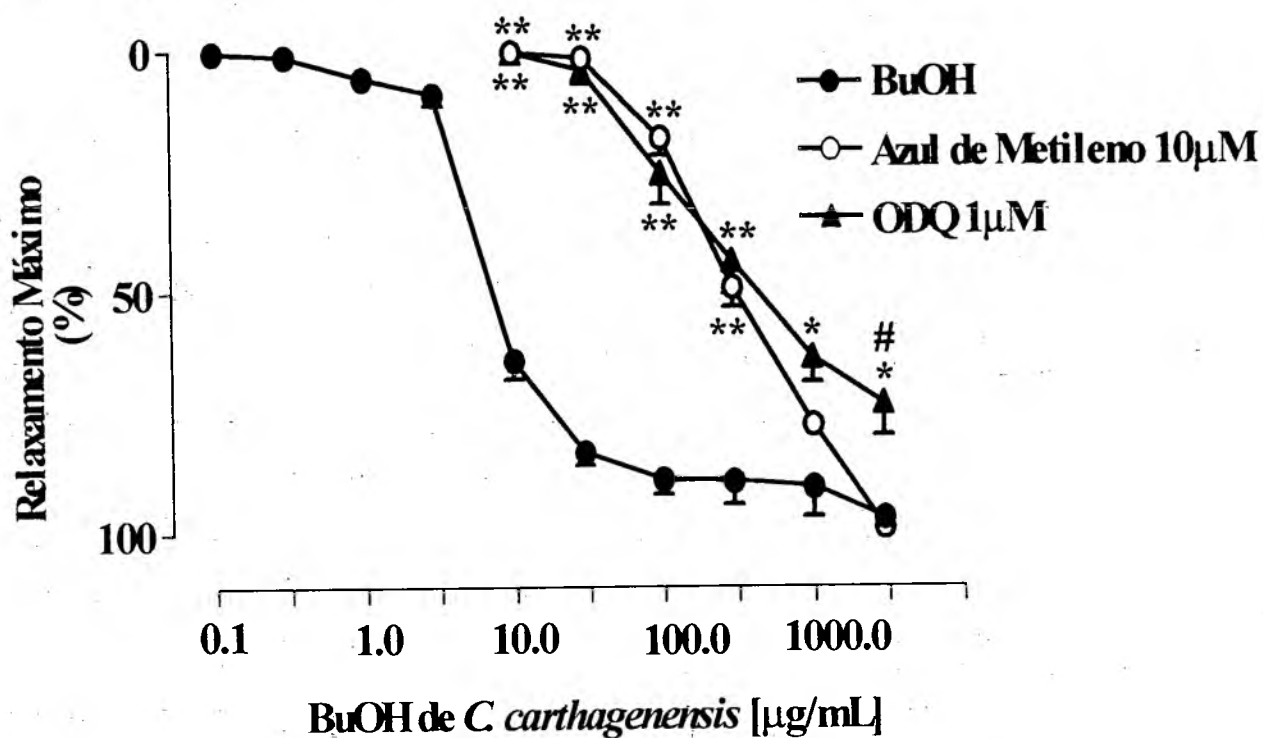


Figura 8 - Curvas concentração-resposta cumulativas médias à fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (0,1 - 3000,0 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na ausência e na presença de Azul de Metileno (10µM) e ODQ (1µM). Os asteriscos indicam diferença significativa * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ representam a diferença significativa dos grupos tratados, comparados ao grupo controle; # $p < 0,01$ representa a diferença entre os grupos tratados (ANOVA/Tukey). Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 - 7 experimentos.

TABELA 3 - Efeito de diferentes drogas sobre o relaxamento induzido pela fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* em aorta torácica isolada de rato na presença de endotélio funcional

| DROGA | CONCENTRAÇÃO (μM) | CI₅₀⁽¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$) | Rmax⁽²⁾ (%) |
|-------------------------|--|--|-----------------------------------|
| Controle | - | 6,85 (3,30 - 14,18) | 97,10 \pm 1,83 |
| Azul de Metileno | 10 | 373,00 (238,00 - 584,23) | 99,07 \pm 0,92 |
| ODQ | 1 | 196,50 (125,80 - 306,82) | 73,28 \pm 6,63 |
| L-NOARG | 10 | -- | 24,61 \pm 7,24 |
| L-NOARG | 30 | -- | 27,02 \pm 8,42 |
| L-NOARG + Larg | 10 e 1000 | 16,15 (9,93 - 26,26) | 100,0 \pm 0,00 |

(¹) CI₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

(²) Rmax é apresentado como média \pm EPM, referente à % do efeito máximo de relaxamento.

5.1.3. Determinação da Influência da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* na Contração Induzida pelo cálcio e pela fenilefrina:

O efeito de diferentes incubações da fração BuOH foi também verificado sobre a contração induzida pelo cálcio e pela fenilefrina. As incubações isoladas de 10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram escolhidas partindo-se dos dados obtidos com as CCR cumulativas controle à fração butanólica, onde, na presença de endotélio, observamos uma CI_{50} próxima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e na ausência do endotélio, observamos um indício de relaxamento apenas em concentrações superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na Figura 9 e Tabela 4, pode-se observar que em nenhuma das incubações prévias realizadas com a fração BuOH (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi observado algum deslocamento para a direita das CCR cumulativas ao cálcio ou qualquer diminuição significativa da contração máxima.

O resultado do efeito de diferentes incubações prévias (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da fração BuOH na contração induzida pela fenilefrina estão ilustrados na Figura 10 e expressos na Tabela 5. De acordo com a Figura 10, a incubação prévia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração BuOH deslocou significativamente a CCR à fenilefrina, não diminuindo porém, o efeito máximo do agonista α_1 adrenérgico. As demais incubações da fração BuOH não foram estatisticamente significantes.

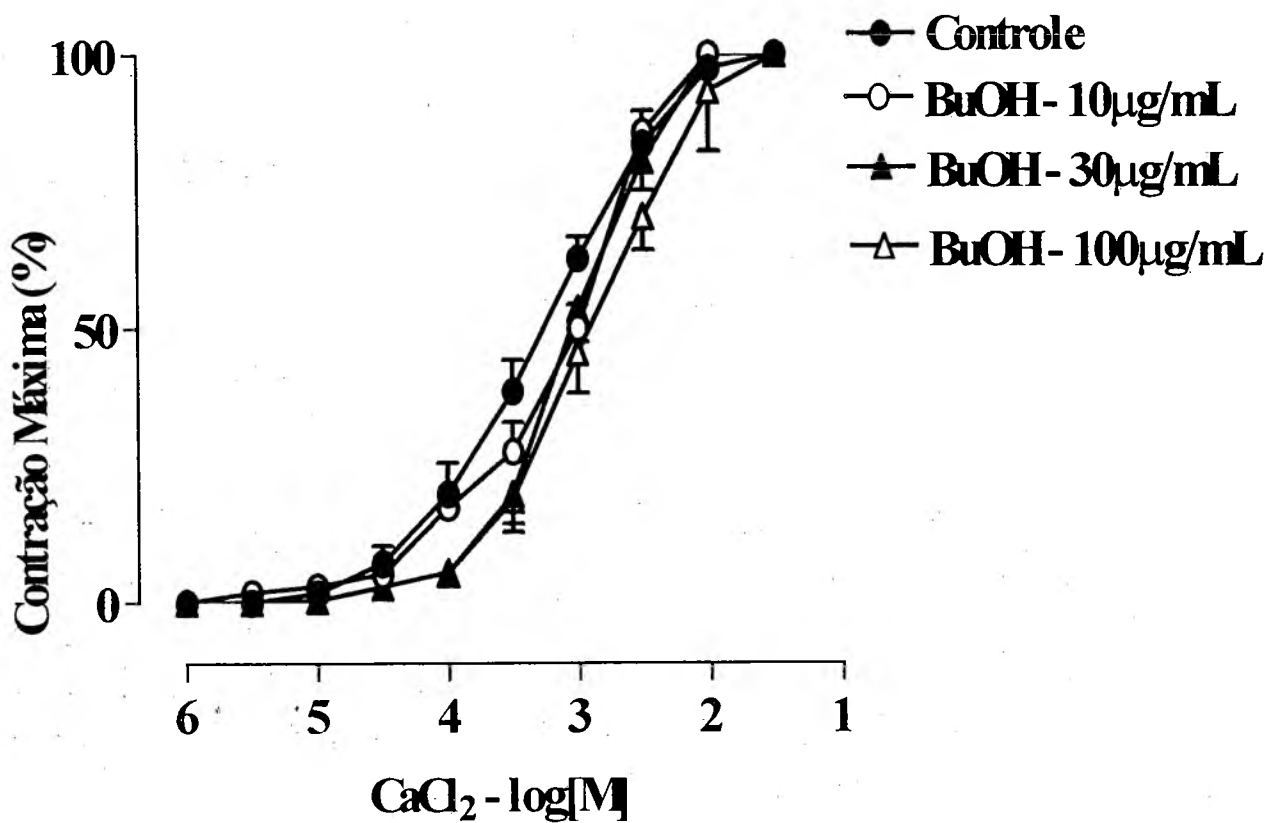


Figura 9 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao cálcio, em anéis de aorta torácica isolada de rato, despolarizadas com KCl (80mM), na ausência e na presença de incubações isoladas crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (10, 30 e 100 µg/mL). Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 - 8 experimentos.

TABELA 4 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* na contração induzida pelo cálcio em preparações isoladas de aorta torácica de rato

| INCUBAÇÕES ($\mu\text{g/mL}$) | CE₅₀⁽¹⁾ (mM) | E_{max}⁽²⁾ (%) |
|---|--|---|
| Controle | 0,56 (0,45 - 0,70) | 100,00 \pm 0,00 |
| 10 | 1,00 (0,70 - 1,40) | 100,00 \pm 0,00 |
| 30 | 1,07 (0,83 - 1,40) | 100,00 \pm 0,00 |
| 100 | 1,41 (1,23 - 1,62) | 100,00 \pm 0,00 |

⁽¹⁾ CE₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

⁽²⁾ E_{max} é apresentado como média \pm EPM, referente à % do efeito máximo de contração do agonista.

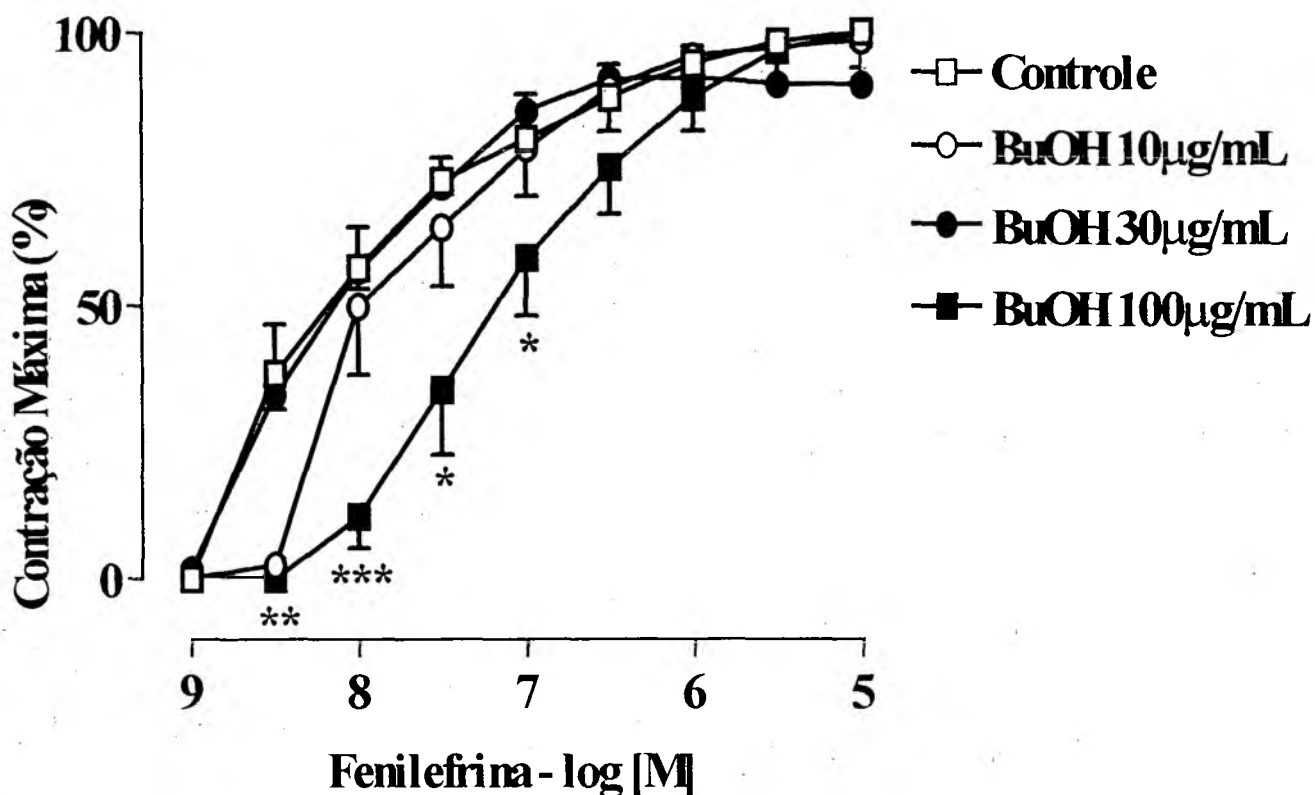


Figura 10 - Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina (10 - 30 nM), em anéis de aorta torácica isolada de rato, na ausência e na presença de incubações isoladas crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (10, 30 e 100 µg/mL). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ referente ao grupo 100µg/mL em relação ao grupo controle (teste *t* não-pareado). Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 - 8 experimentos.

TABELA 5 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* na contação induzida pela fenilefrina, em preparações isoladas de aorta torácica de rato

| INCUBAÇÕES (µg/mL) | CE₅₀ ⁽¹⁾ (nM) | E_{max} ⁽²⁾ (%) |
|--------------------------------|---|--|
| Controle | 4,00 (1,00 - 11,00) | 100,00 ± 0,00 |
| 10 | 10,00 (5,00 - 22,00) | 98,48 ± 1,52 |
| 30 | 4,00 (2,00 - 7,00) | 90,35 ± 8,67 |
| 100 | 63,00 (45,00 - 89,00) | 99,74 ± 6,28 |

(¹) CE₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

(²) E_{max} é apresentado como média ± EPM, referente à % do efeito máximo do agonista.

5.1.4. Determinação da Influência da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* em Receptores Colinérgicos Muscarínicos (M_3)

A Figura 11a ilustra as CCR cumulativas à fração BuOH na ausência e na presença de atropina ($1\mu\text{M}$), em anéis de aorta torácica com endotélio. De acordo com a Figura 11a, a incubação prévia de atropina não modificou significativamente o relaxamento induzido pela fração BuOH, como pode ser verificado pelos respectivos valores de $CI_{50} + IC$ ($\mu\text{g/mL}$) e R_{max} (%): BuOH (controle): 6,85 (3,30 - 14,18) e $97,10 \pm 1,83$; BuOH + atropina: 9,15 (6,67 - 12,54) e $97,53 \pm 2,47$. O controle positivo da atropina está ilustrado na Figura 11b, onde foram realizadas CCR cumulativas à acetilcolina, na ausência e na presença de atropina ($1\mu\text{M}$), em anéis de aorta torácica de rato com endotélio vascular. Os valores de $CI_{50} + IC$ e R_{max} (%) corresponderam, respectivamente, a: acetilcolina (controle): 0,10 (0,03 - 0,30) μM e 100%; acetilcolina + atropina: 0,21 (0,02 - 2,40) mM e 100%.

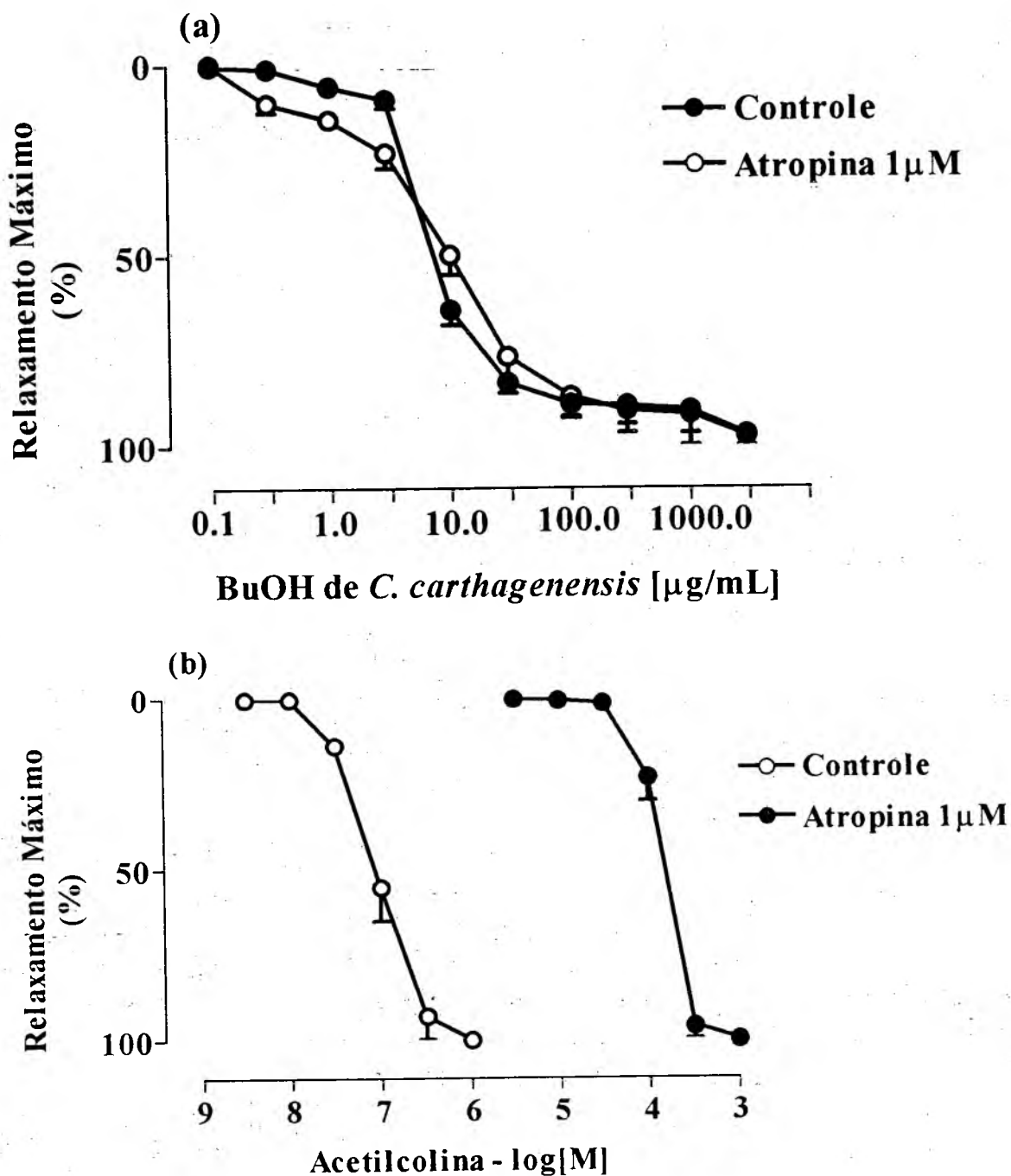


Figura 11 - Curvas concentração-resposta cumulativas médias (a) à fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (0,1 - 3000,0 $\mu\text{g/mL}$) e (b) à acetilcolina, em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na ausência e na presença de atropina (1 μM). Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 experimentos.

5.1.5. Determinação da Influência de Diferentes Incubações da Fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* no Vasorelaxamento Induzido pelos Compostos S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 3-morfolinosidnonimina (SIN-1)

O efeito de diferentes incubações da fração butanólica de *Cuphea carthagenensis* foi também avaliado no relaxamento induzido pelo SNAP e pelo SIN-1 (ambos doadores de NO em solução aquosa), em anéis de aorta torácica de rato, desprovidos de endotélio.

A Figura 12 ilustra as CCR cumulativas ao SNAP (doador de NO), na ausência e na presença de 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ da fração BuOH. A incubação prévia de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ da fração BuOH deslocou de forma significativa, as CCRc ao SNAP para a esquerda, ou seja, a presença da fração butanólica facilitou o relaxamento induzido pelo doador de NO. Na Tabela 6 estão demonstradas as $\text{CI}_{50} + \text{IC}$ das CCR cumulativas ao SNAP, na ausência e na presença das diferentes incubações de BuOH.

Na Figura 13a estão ilustradas as CCR cumulativas ao composto SIN-1 (doador de $\text{NO} + \text{O}_2^-$) na ausência e na presença de diferentes concentrações de BuOH (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), em preparações desprovidas de endotélio. Somente a incubação prévia com 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração BuOH, deslocou significativamente as CCR ao SIN-1.

As CCR cumulativas ao SIN-1, na ausência e na presença da administração prévia imediata da SOD (100U/mL), estão ilustradas na Figura 13b. Nestes experimentos foi verificado que na presença da SOD (enzima que seqüestra O_2^-), ocorreu um significativo deslocamento das CCR ao SIN-1 para a esquerda, confirmando o seqüestro de radicais O_2^- nas condições experimentais. Os parâmetros farmacológicos estão expressos na Tabela 7.

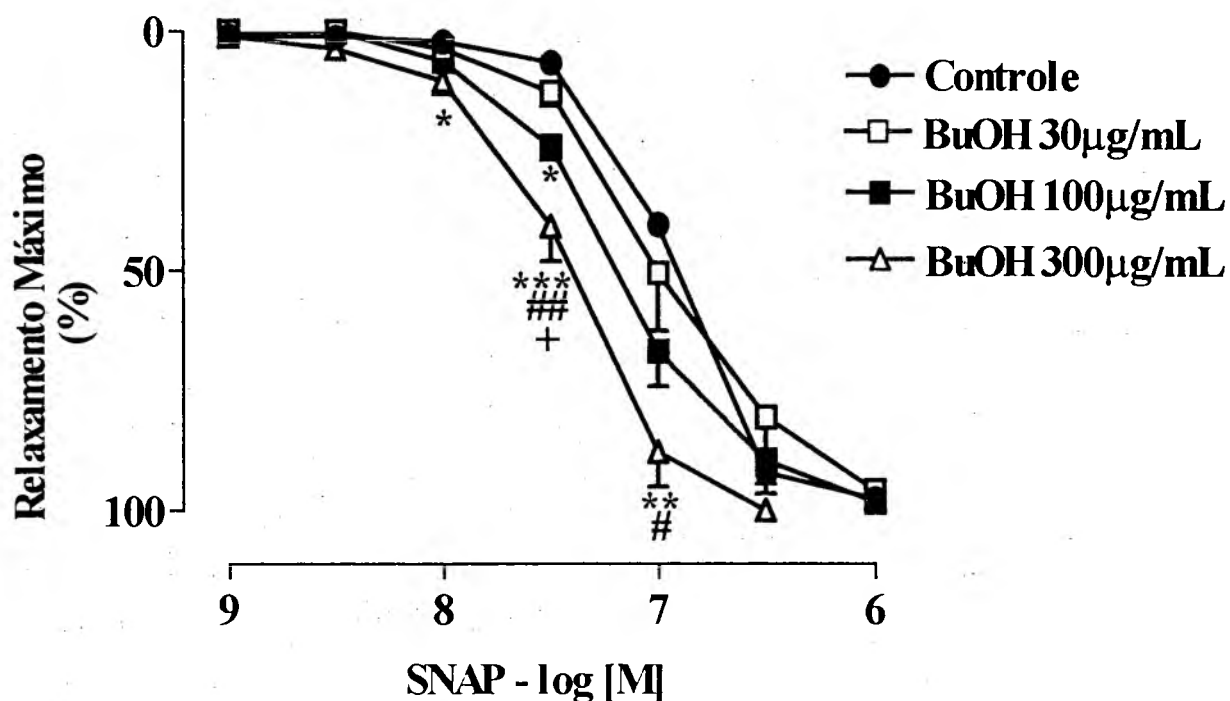


Figura 12 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao SNAP, em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM), na ausência e na presença de incubações isoladas crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (30, 100 e 300 µg/mL). * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ referente aos grupos tratados, comparados ao grupo controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ referente à diferença entre os grupos (30 e 300 µg/mL); + $p < 0,05$ referente à diferença entre os grupos (100 e 300 µg/mL) - ANOVA/Tukey. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 - 6 experimentos.

TABELA 6 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* no relaxamento induzido pelo composto S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), na ausência de endotélio funcional

| INCUBAÇÕES ($\mu\text{g/mL}$) | CI₅₀⁽¹⁾ (μM) | Rmax⁽²⁾ (%) |
|---|---|----------------------------------|
| Controle | 0,14 (0,07 - 0,28) | 100,00 \pm 0,00 |
| 30 | 0,13 (0,08 - 0,20) | 95,83 \pm 4,16 |
| 100 | 0,07 (0,05 - 0,12) | 98,26 \pm 1,73 |
| 300 | 0,05 (0,03 - 0,10) | 100,00 \pm 0,00 |

⁽¹⁾ CI₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

⁽²⁾ Rmax é apresentado como média \pm EPM, referente à % do efeito máximo de relaxamento.

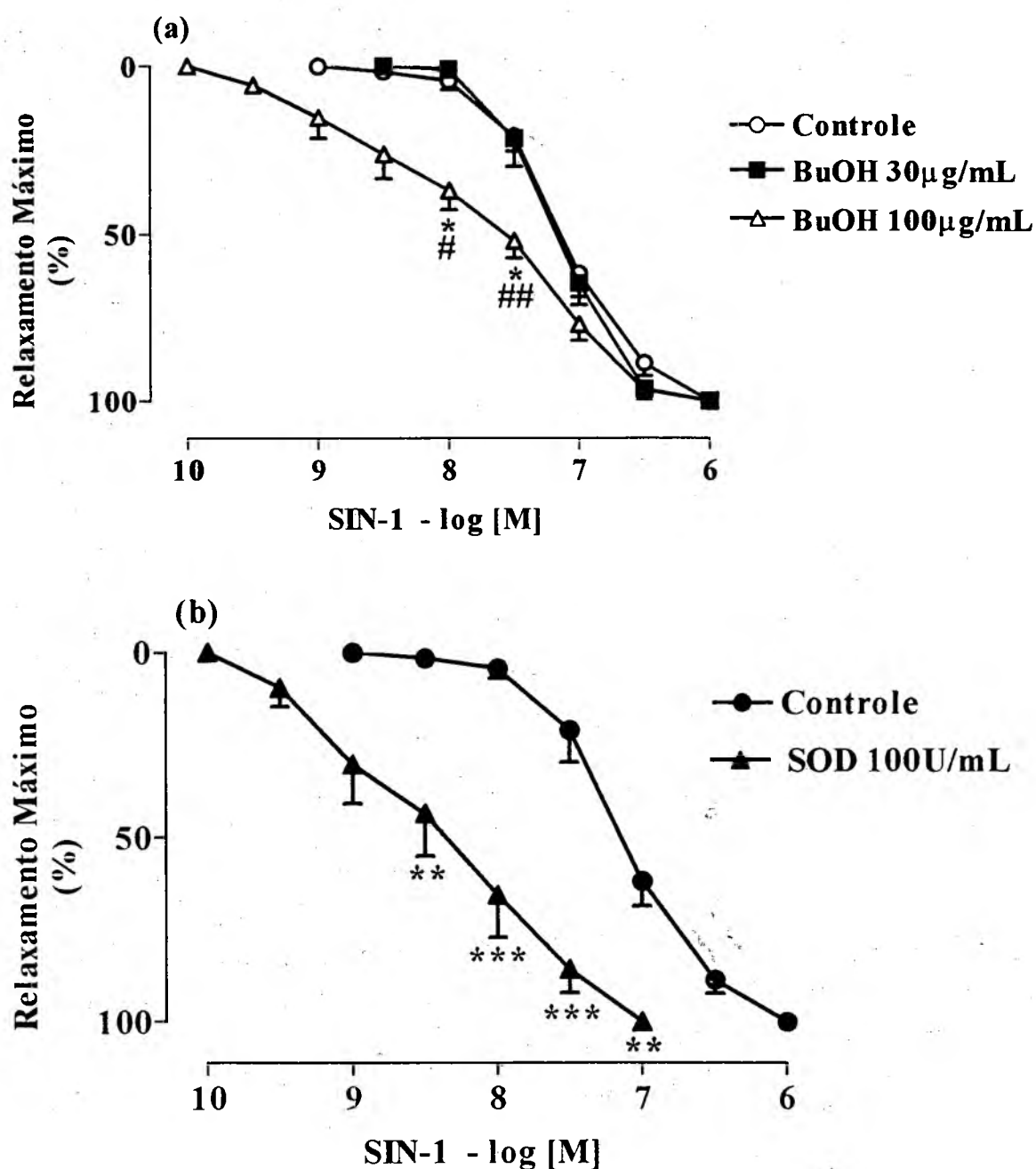


Figura 13 - Curvas concentração-resposta cumulativas ao SIN-1, (a) na ausência e na presença de incubações isoladas crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* (30 e 100 µg/mL) e (b) na ausência e na presença de superóxido dismutase (SOD, 100U/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (10 - 30 nM). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ referente ao grupos tratados comparados com o grupo controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ referente à diferença entre os grupos tratados; ANOVA/Tukey. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 - 7 experimentos.

TABELA 7 - Efeito de incubações crescentes da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* e da SOD no relaxamento induzido pelo composto S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SIN-1), na ausência de endotélio funcional

| INCUBAÇÕES | CI₅₀⁽¹⁾ (nM) | Rmax⁽²⁾ (%) |
|--------------------|---|---|
| Controle | 85,00 (46,00 - 154,00) | 100,00 ± 0,00 |
| 30µg/mL | 74,00 (26,00 - 199,00) | 100,0 ± 0,00 |
| 100µg/mL | 28,00 (14,00 - 57,00) | 100,0 ± 0,00 |
| SOD 100U/mL | 4,00 (1,00 - 10,00) | 100,0 ± 0,00 |

⁽¹⁾ CI₅₀ é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

⁽²⁾ Rmax é apresentado como média ± EPM, referente à % do efeito máximo de relaxamento.

5.2. Estudo Bioquímico

5.2.1. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical Ânion Superóxido (O_2^-) pelo EBHA, Frações AcOEt e BuOH e Quercetina Sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* - Método Enzimático

Na Figura 14a estão representadas as médias percentuais de formação de ácido úrico e redução do NBT, em amostras contendo EBHA de *Cuphea carthagenensis*. Neste histograma observa-se que ocorreu uma inibição estatisticamente significativa da redução do NBT na concentração de 100 μ g/mL do EBHA, quando comparada com o controle e com todas as demais concentrações testadas. Com relação ao percentual de formação de ácido úrico, os resultados indicam que não ocorreu inibição significativa da atividade da enzima xantina oxidase em qualquer concentração testada, quando comparada ao grupo controle (100% de atividade enzimática).

Quanto à avaliação da capacidade seqüestradora de ânions superóxido pela fração AcOEt, foi detectado uma inibição significativa, tanto na atividade enzimática como na redução do NBT, em amostras contendo 100 μ g/mL da fração AcOEt (Figura 15a).

A Figura 16a corresponde aos ensaios realizados com a fração BuOH de *Cuphea carthagenensis*. Da mesma maneira, estes resultados revelam que na maior concentração testada (100 μ g/mL), ocorreu uma inibição significativa tanto da formação de ácido úrico como na redução do NBT, quando comparado com o grupo controle (100% de redução do NBT) e com as demais concentrações testadas.

Os valores correspondentes aos percentuais de formação de ácido úrico e redução do NBT em amostras com diferentes concentrações de quercetina-3-sulfato (FC01), estão expressos na Figura 17a. Nestes ensaios também ocorreu uma inibição significativa, tanto na atividade da enzima xantina oxidase como também no percentual de redução do NBT, das amostras contendo a maior concentração de FC01 (100µg/mL).

A diferença estatística entre os grupos (EBHA, frações AcOEt e BuOH e do FC01), com relação ao percentual de formação de ácido úrico, estão ilustradas na Figura 18a. Como pode ser verificado nesta figura, tanto as frações como a quercetina sulfatada promoveram significativamente a inibição da xantina oxidase, quando comparadas ao EBHA. Os diferentes percentuais de redução do NBT pelo método enzimático, na concentração de 100µg/mL de EBHA, frações e FC01, estão ilustrados na Figura 18b. Todos os grupos inibiram de forma semelhante a redução do NBT, com diferença significativa apenas entre o EBHA e a fração AcOEt.

Os valores numéricos percentuais de formação do ácido úrico e de redução do NBT, promovidos pelo EBHA, frações e FC01 (nas concentrações de 0,1; 1,0; 10 e 100µg/mL), estão expressos na Tabela 8.

5.2.2. Determinação da Capacidade Sequestradora do Radical Ânion Superóxido (O_2^-) pelo EBHA, Frações AcOEt e BuOH e Quercetina Sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* - Método Não-Enzimático

Na Figura 14b está ilustrado o percentual de redução do NBT em amostras contendo diferentes concentrações do EBHA de *Cuphea carthagenensis*. De acordo com a análise estatística realizada, não foram

encontradas diferenças significativas entre nenhuma das concentrações testadas, nem mesmo com relação ao controle.

A diminuição significativa no percentual de redução do NBT, em amostras contendo a fração AcOEt, foi verificada somente na concentração de 100 μ g/mL, de acordo com a Figura 15b.

A capacidade sequestradora do radical ânion superóxido pela fração BuOH e FC01 de *Cuphea carthagenensis*, está representada pelos percentuais de redução do NBT, expressos nas Figuras 16b e 17b, respectivamente. A diferença estatística significativa ocorreu somente na concentração de 100 μ g/mL de BuOH e de FC01. Na Figura 18c estão expressas as diferenças percentuais de redução do NBT pelo método não-enzimático, observadas entre os grupos. Nesta figura pode-se observar que tanto a fração butanólica como o FC01 promoveram uma maior inibição da redução do NBT, quando comparados ao EBHA. Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a fração AcOEt e os demais grupos (EBHA, BuOH e FC01).

Os valores numéricos percentuais de redução do NBT, promovidos pelo EBHA, frações e FC01 (nas concentrações de 0,1; 1,0; 10 e 100 μ g/mL), estão expressos na Tabela 8.

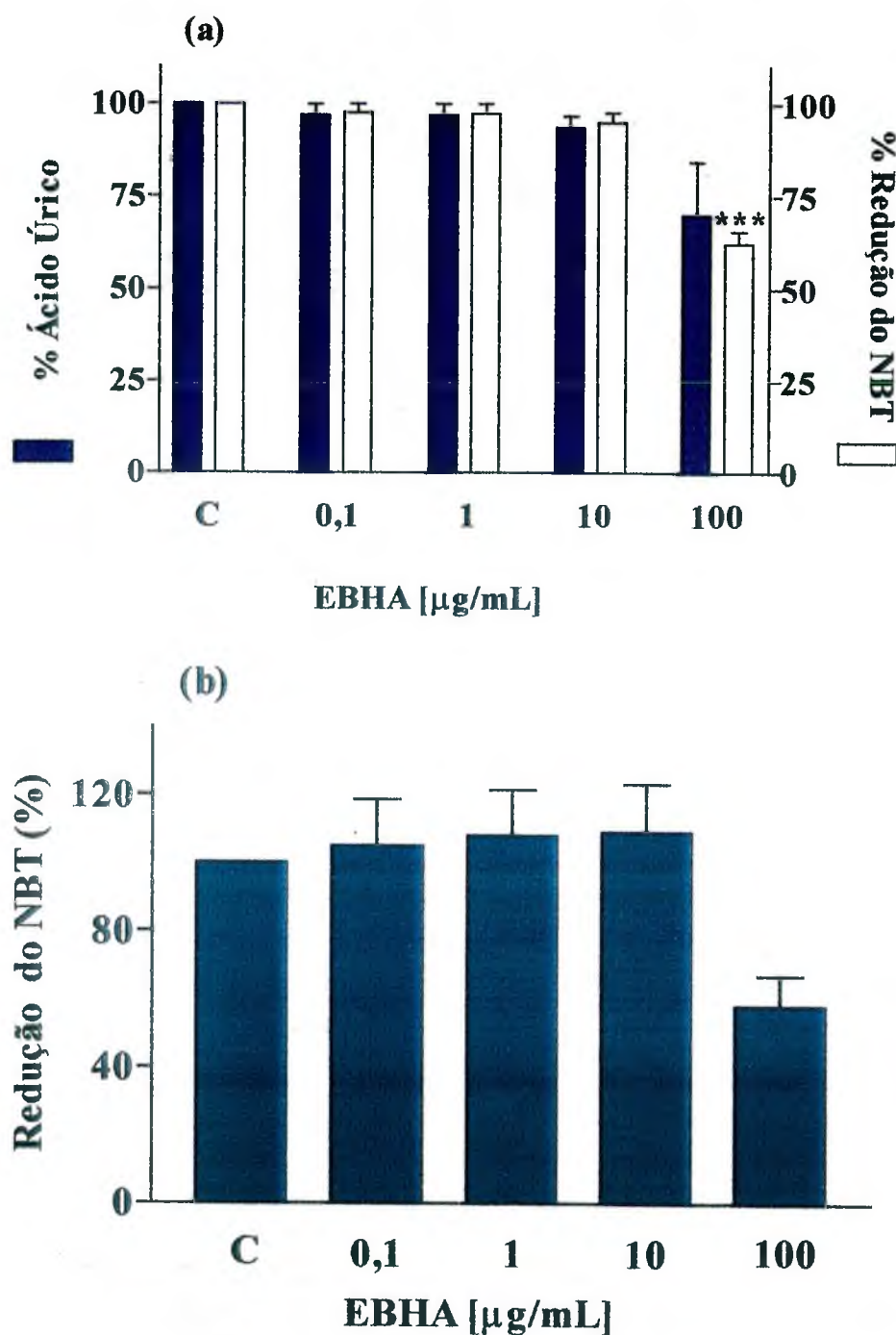


Figura 14 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de (a) ácido úrico e redução do NBT obtidas pelo ensaio enzimático e médias percentuais \pm EPM de (b) redução do NBT obtidas pelo ensaio não-enzimático de geração do radical ânion superóxido (O_2^-) realizado com EBHA de *Cuphea carthagenensis*. *** $p < 0,001$, indica diferença estatística significativa contra o controle e todas as demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

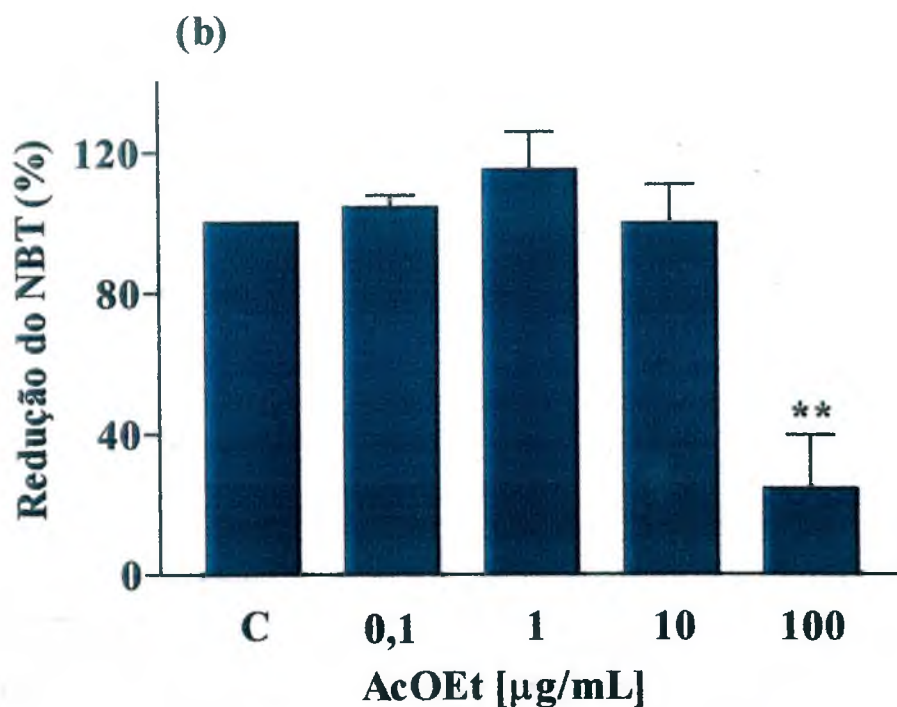
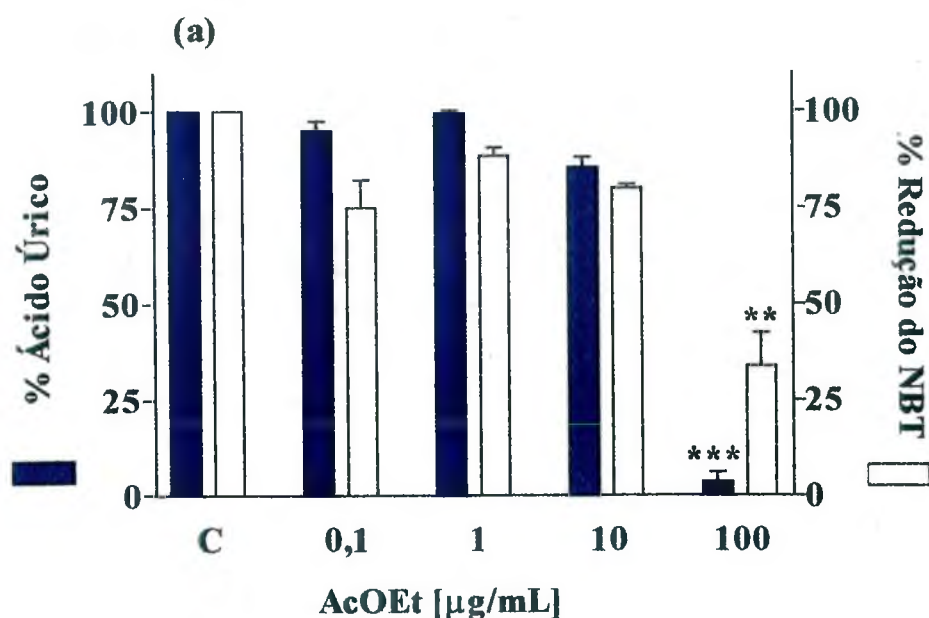


Figura 15 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de ácido úrico e redução do NBT obtidas pelo ensaio enzimático (a) e médias percentuais \pm EPM de redução do NBT obtidas pelo ensaio não-enzimático (b) de geração do radical ânion superóxido (O_2^-) realizado com AcOEt de *Cuphea carthagenensis*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica diferença estatística significativa contra o controle e todas as demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

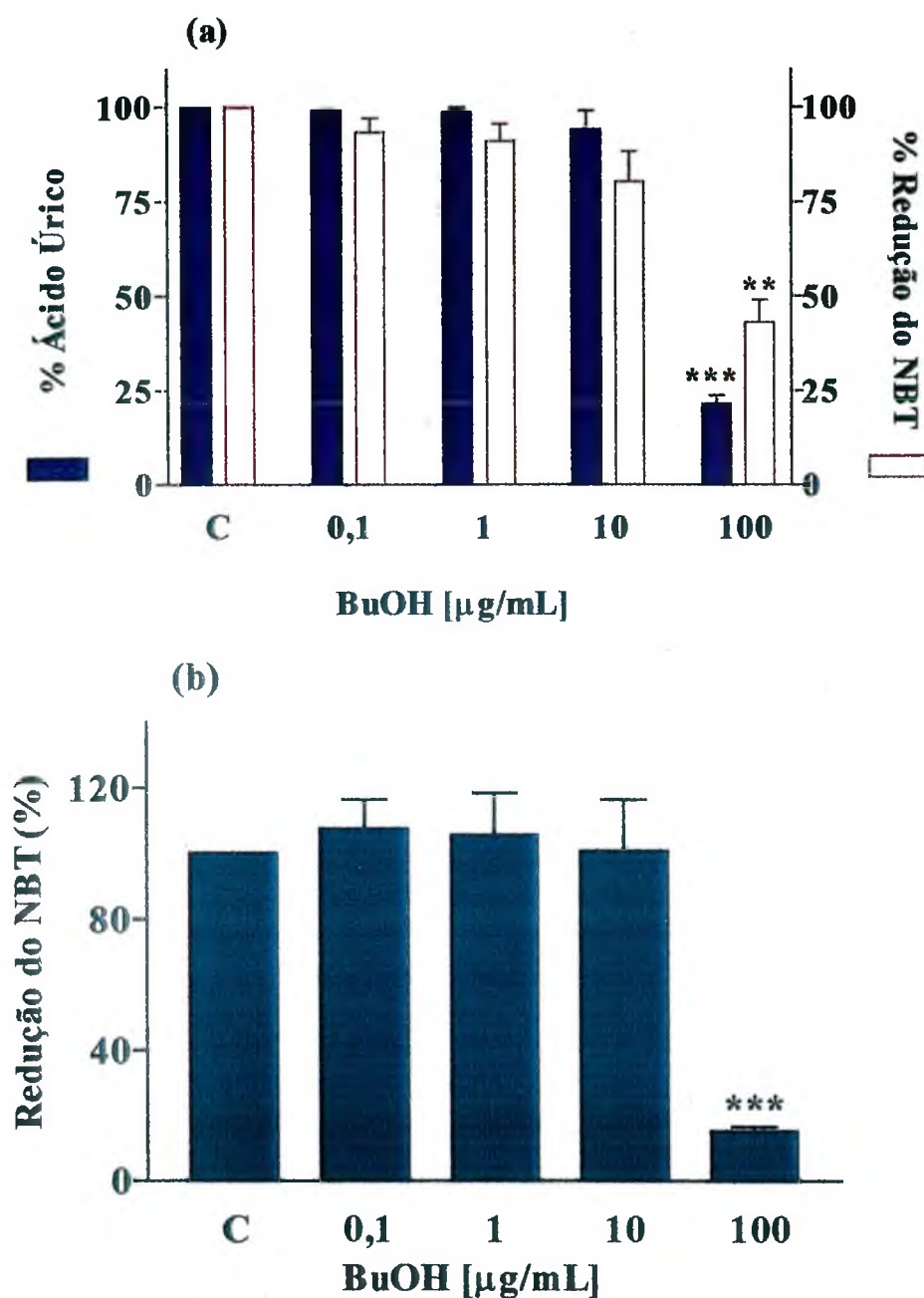


Figura 16 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de (a) ácido úrico e redução do NBT obtidas pelo ensaio enzimático e médias percentuais \pm EPM de (b) redução do NBT obtidas pelo ensaio não-enzimático de geração do radical ânion superóxido (O_2^-), realizado com BuOH de *Cuphea carthagenensis*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa contra o controle e todas as demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

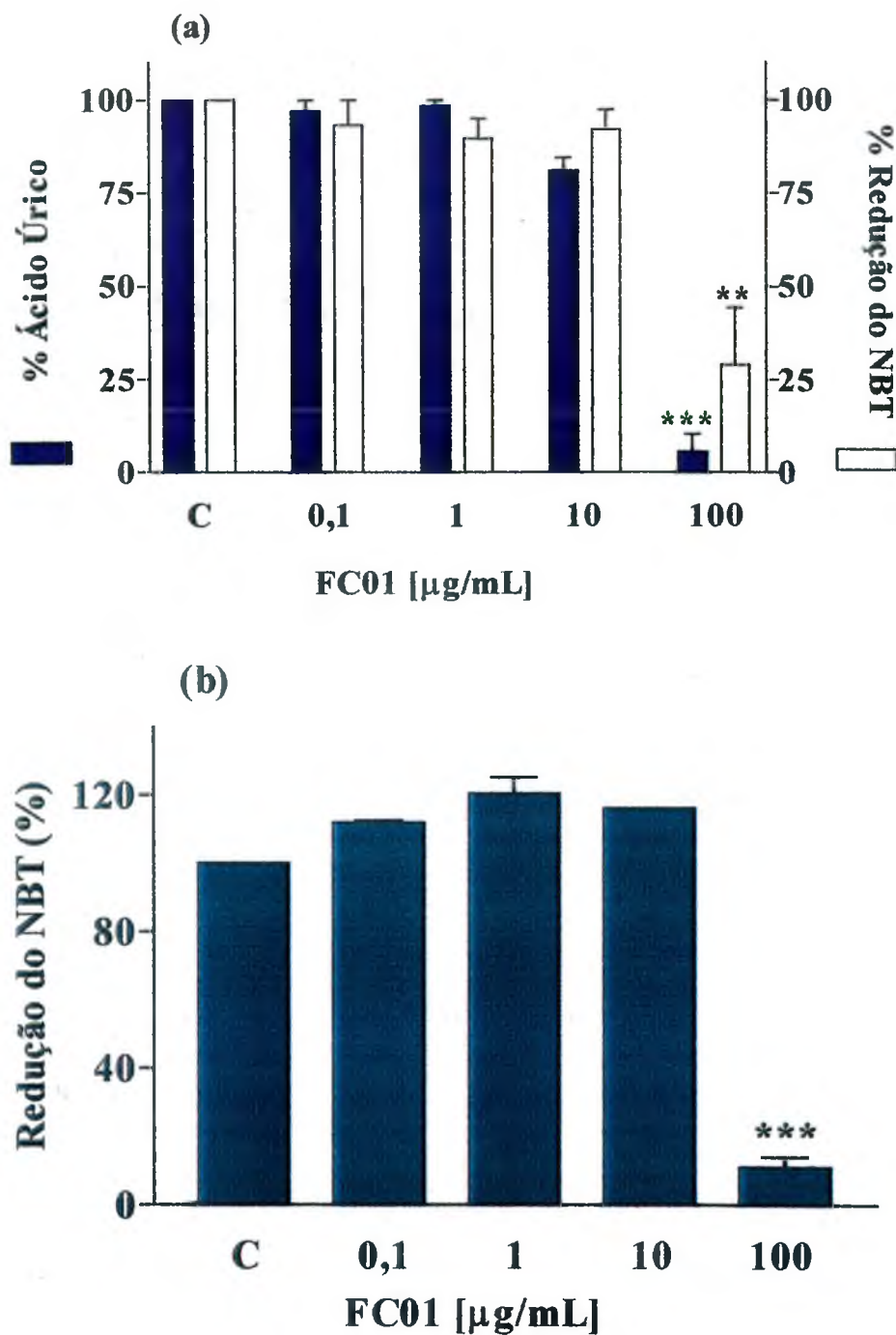


Figura 17 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de (a) ácido úrico e redução do NBT obtidas pelo ensaio enzimático e médias percentuais \pm EPM de redução (b) do NBT obtidas pelo ensaio não-enzimático de geração do radical ânion superóxido (O_2^-), realizado com FC01 de *Cuphea carthagenensis*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa contra o controle e todas as demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

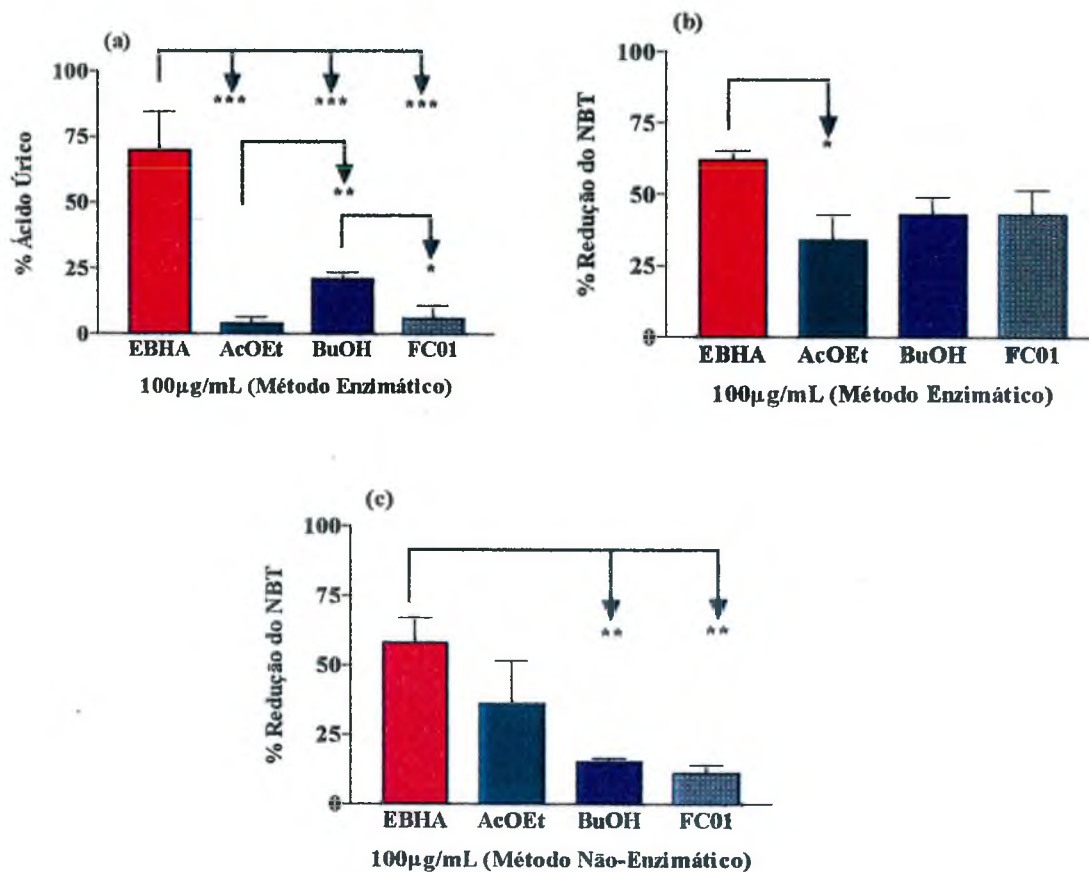


Figura 18 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de ácido úrico (a) e redução do NBT (b) obtidas pelo ensaio enzimático e médias percentuais \pm EPM de redução do NBT (c) obtidas pelo ensaio não-enzimático de geração do radical ânion superóxido (O_2^-), na concentração de 100 µg/mL. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa entre os grupos. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (teste t -não pareado).

TABELA 8 - Relação das médias percentuais \pm EPM de formação de ácido úrico (AU) e de redução do *nitro blue tetrazolium* (NBT), do ensaio enzimático e não-enzimático

| Sistema Enzimático | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | EBHA | | AcOEt | | BuOH | | FC01 | |
| $\mu\text{g/mL}$ | AU | NBT | AU | NBT | AU | NBT | AU | NBT |
| 0,1 | 97 \pm 3,0 | 98 \pm 2,3 | 95 \pm 2,5 | 75 \pm 7,1 | 99 \pm 0,6 | 93 \pm 3,7 | 97 \pm 3,0 | 93 \pm 6,6 |
| 1,0 | 97 \pm 3,0 | 97 \pm 2,7 | 99 \pm 0,6 | 88 \pm 2,2 | 99 \pm 1,3 | 91 \pm 4,5 | 98 \pm 1,6 | 90 \pm 4,2 |
| 10,0 | 94 \pm 3,2 | 95 \pm 2,6 | 85 \pm 2,7 | 80 \pm 1,0 | 94 \pm 5,0 | 80 \pm 7,9 | 81 \pm 3,6 | 92 \pm 5,3 |
| 100,0 | 70 \pm 14,5 | 62 \pm 3,3 | 4 \pm 2,5 | 34 \pm 8,8 | 21 \pm 2,4 | 43 \pm 6,1 | 6 \pm 4,7 | 43 \pm 8,5 |
| Sistema Não-Enzimático | | | | | | | | |
| | EBHA | AcOEt | BuOH | FC01 | | | | |
| $\mu\text{g/mL}$ | NBT | NBT | NBT | NBT | | | | |
| 0,1 | 105,00 \pm 13,70 | 104,00 \pm 3,40 | 107,00 \pm 9,10 | 112,00 \pm 0,60 | | | | |
| 1,0 | 108,00 \pm 13,40 | 115,00 \pm 10,70 | 106,00 \pm 12,70 | 120,00 \pm 5,00 | | | | |
| 10,0 | 109,00 \pm 14,30 | 100,00 \pm 11,00 | 101,00 \pm 15,80 | 116,00 \pm 0,00 | | | | |
| 100,0 | 58,00 \pm 9,00 | 36,00 \pm 15,50 | 15,00 \pm 1,30 | 11,00 \pm 3,00 | | | | |

5.2.3. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical OH^\cdot pelo EBHA, Frações BuOH, AcOEt e Quercetina Sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* - Medida da Degradação da Desoxirribose

Na figura 19 estão representadas as diferentes concentrações de EBHA de *Cuphea carthagenensis* utilizadas para determinar a capacidade seqüestradora do radical OH^\cdot . Neste histograma pode ser verificado que a inibição da degradação do açúcar é dependente da concentração de EBHA, sendo evidenciada já nas menores concentrações.

Da mesma maneira, todas as concentrações testadas da fração AcOEt (Figura 20) promoveram a inibição da degradação da desoxirribose quando comparadas ao grupo controle (correspondente à 100% de degradação).

Na Figura 21, temos o histograma representando os resultados obtidos com a fração BuOH, que promoveu significativamente a inibição da degradação da desoxirribose, de forma similar ao FC01, ilustrado na Figura 22). De acordo com a Figura 23, todos os grupos analisados promoveram a inibição da degradação da desoxirribose de maneira similar, em todas as concentrações testadas. O FC01, no entanto, obteve maior destaque pois apresentou diferença estatística com relação ao EBHA, AcOEt e BuOH, na concentração de $1,0\mu\text{g/mL}$ (Figura 23b), ao EBHA e BuOH na concentração de $10,0\mu\text{g/mL}$ (Figura 23c) e ao EBHA, AcOEt e BuOH na concentração de $100\mu\text{g/mL}$ (Figura 23d). Os dados numéricos percentuais de degradação da desoxirribose acompanhadas de seus respectivos EPM, estão expressos na Tabela 9.

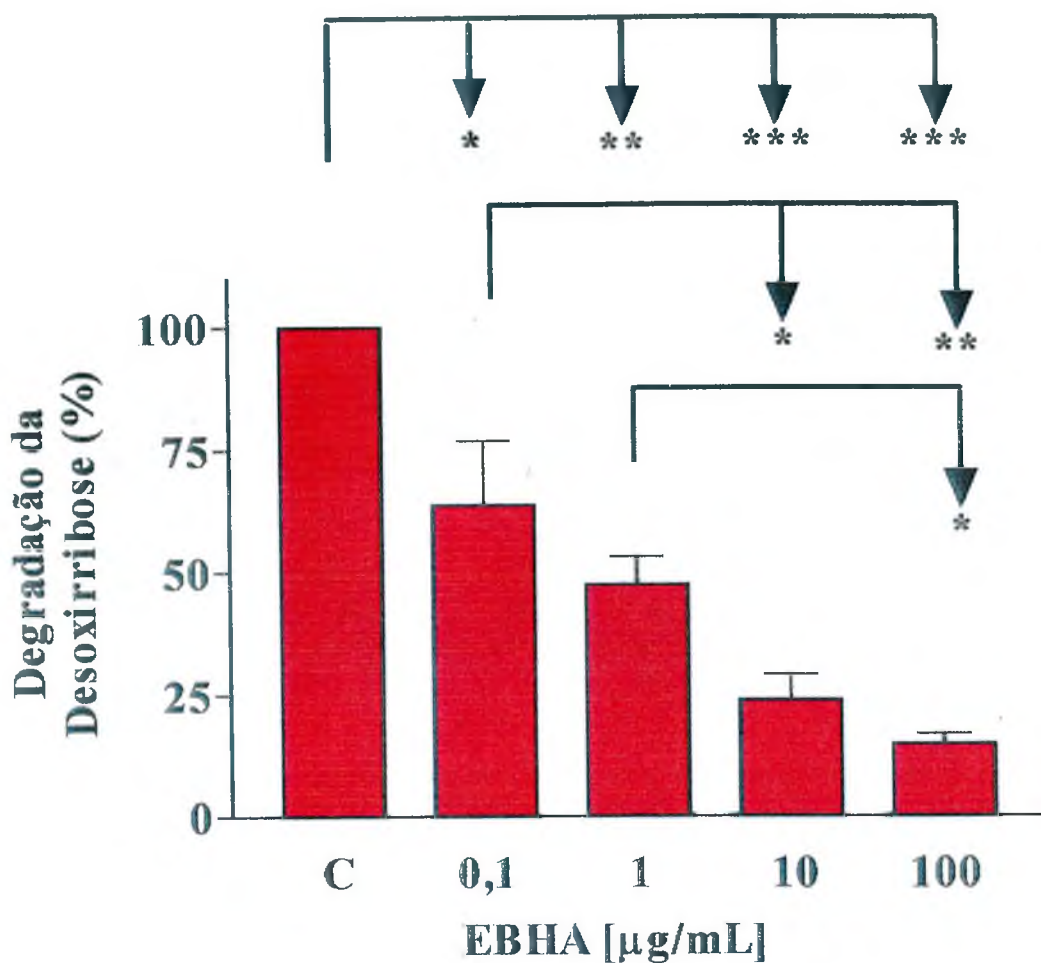


Figura 19 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência (C) e na presença (0,1 - 100) $\mu\text{g/mL}$ do EBHA de *Cuphea carthagenensis*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: indica diferença significativa com relação ao grupo controle e demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

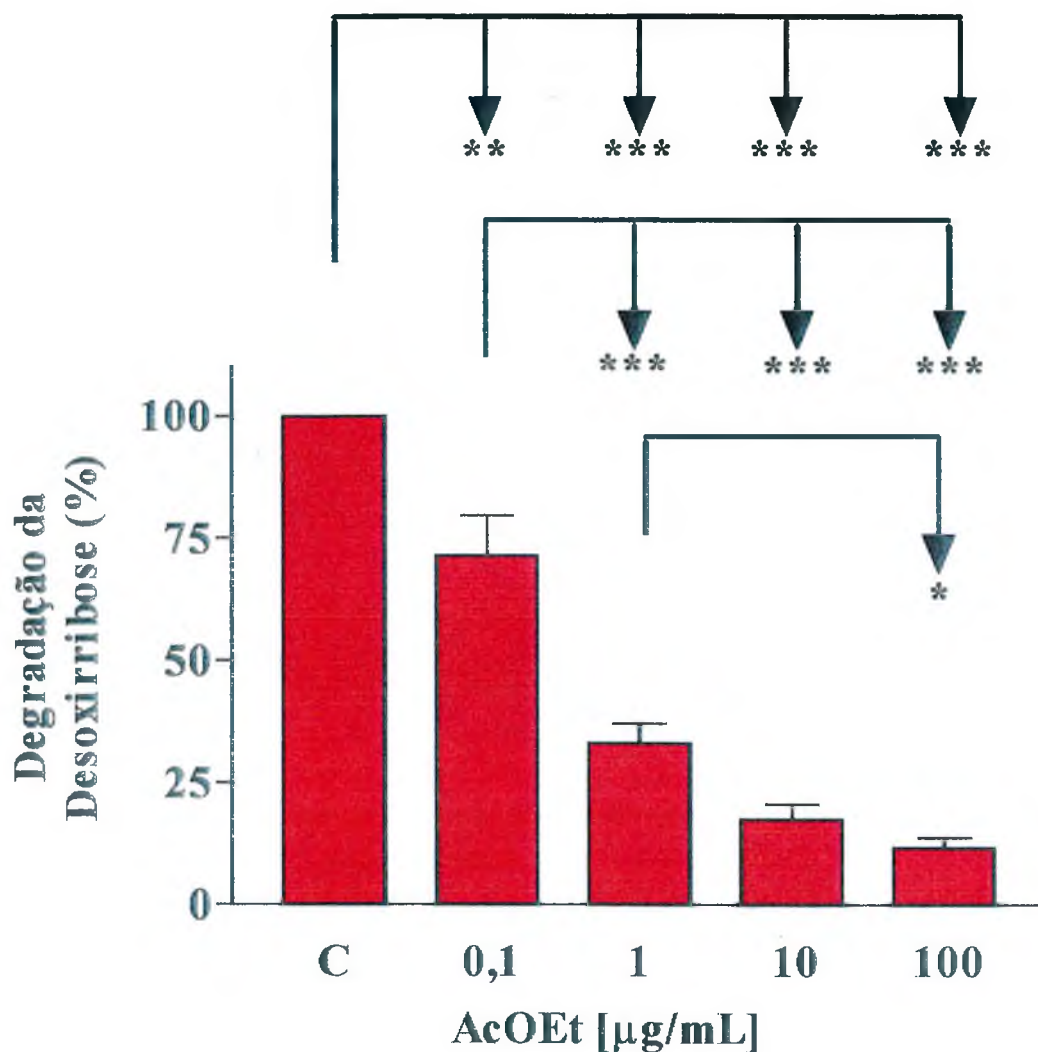


Figura 20 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência (C) e na presença (0,1 - 100) $\mu\text{g/mL}$ da fração AcOEt de *Cuphea carthagenensis*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa com relação ao grupo controle e demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

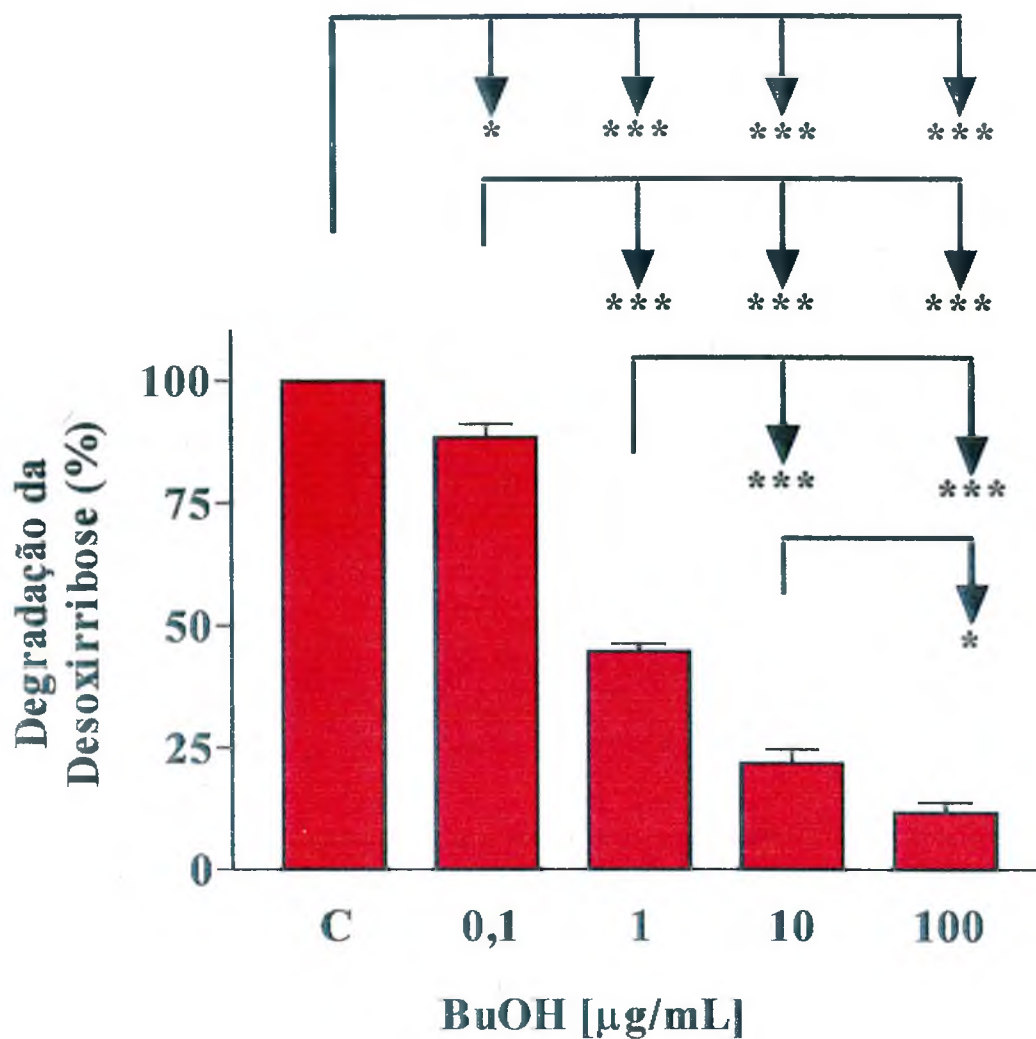


Figura 21 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência (C) e na presença (0,1 - 100) $\mu\text{g/mL}$ da fração BuOH de *Cuphea carthagenensis*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa com relação ao grupo controle e demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

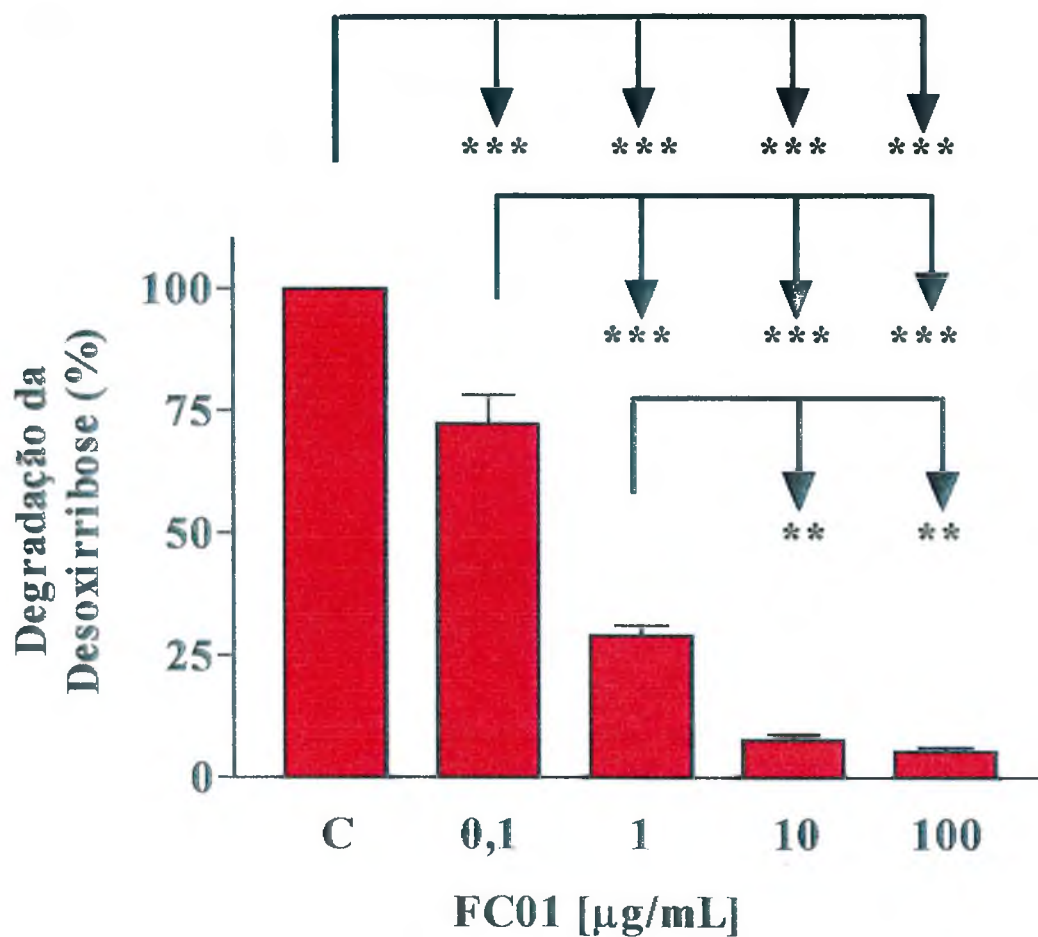


Figura 22 - Histograma representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose, na ausência (C) e na presença (0,1 - 100) $\mu\text{g/mL}$ do FC01 de *Cuphea carthagenensis*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica diferença significativa com relação ao grupo controle e demais concentrações. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata. (ANOVA/ Tukey).

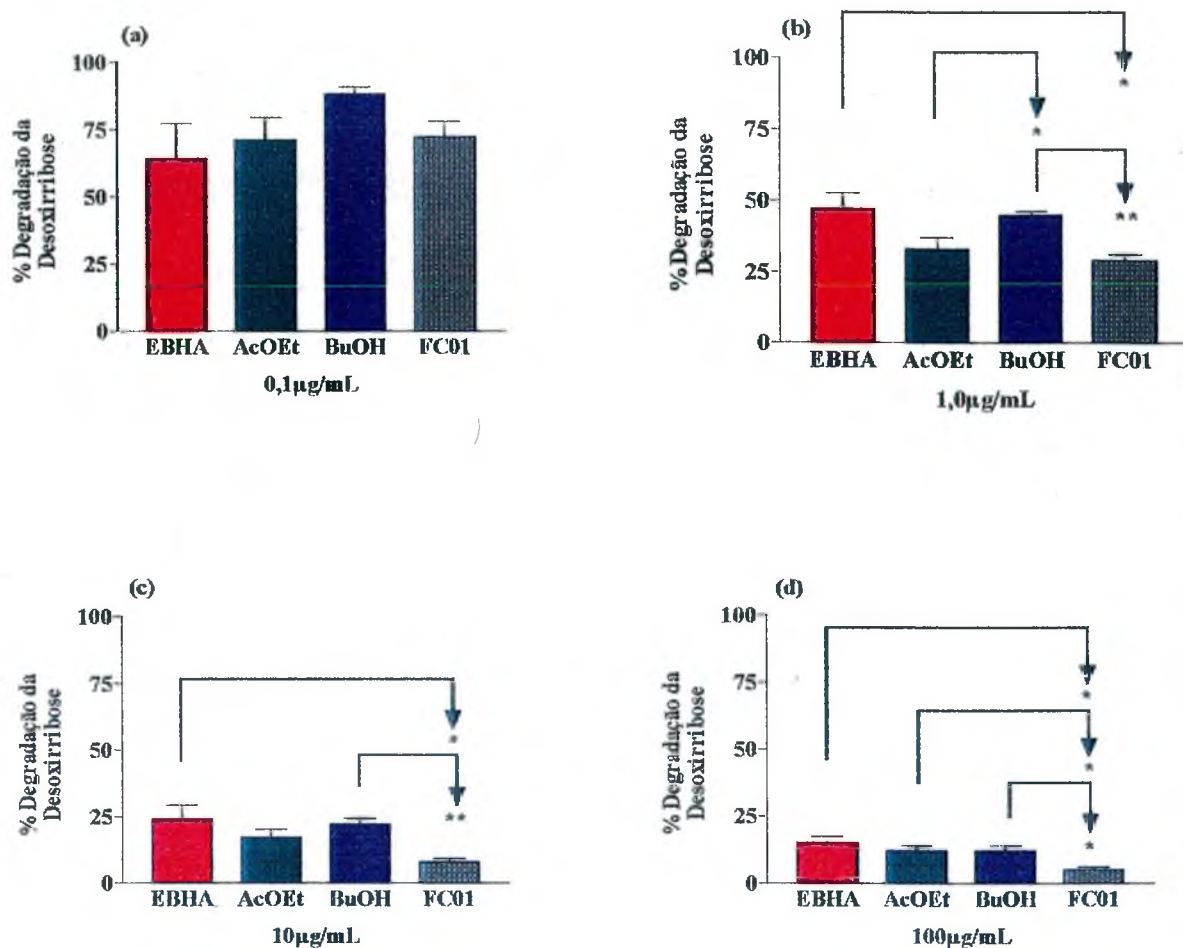


Figura 23 - Histogramas representando as médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose na presença do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 de *Cuphea carthagenensis* nas concentrações de 0,1 (a); 1,0 (b); 10 (c) e 100 (d) $\mu\text{g/mL}$. ** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indica diferença significativa entre os grupos. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata (teste *t*-não pareado).

TABELA 9 - Relação das médias percentuais \pm EPM de degradação da desoxirribose.

| $\mu\text{g/mL}$ | EBHA | AcOEt | BuOH | FC01 |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0,1 | 64,00 \pm 13,20 | 71,00 \pm 8,20 | 88,00 \pm 2,80 | 72,00 \pm 5,80 |
| 1,0 | 47,00 \pm 5,80 | 33,00 \pm 4,00 | 45,00 \pm 1,40 | 29,00 \pm 2,10 |
| 10,0 | 24,00 \pm 5,20 | 17,00 \pm 3,20 | 22,00 \pm 2,30 | 8,00 \pm 1,20 |
| 100,0 | 15,00 \pm 2,30 | 12,00 \pm 2,00 | 12,00 \pm 2,00 | 5,00 \pm 0,90 |

* * *

6 - DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo contribuir com o estudo fitoquímico, farmacológico e bioquímico de uma planta nativa, a *Cuphea carthagenensis* (Jacq)Mcbride, popularmente conhecida como Sete-Sangrias ou Guanxuma Vermelha, largamente utilizada na medicina popular como antihipertensiva, dentre outras demais indicações.

O estudo teve inicialmente o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos na atividade hipotensora de *Cuphea carthagenensis*, efeito este, verificado pela população da comunidade da Costa da Lagoa, no município de Florianópolis, SC. Anteriormente aos experimentos bioquímicos e farmacológicos, foram também desenvolvidos uma série de ensaios fitoquímicos, realizados com o EBHA e com as frações da planta.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos, o EBHA de *Cuphea carthagenensis*, bem como as frações e subfrações, promoveram um significativo relaxamento dos anéis de aorta torácica de ratos, que ocorreu somente na presença de endotélio funcional.

Nas pesquisas realizadas com plantas medicinais que apresentam efeito no sistema cardiovascular, o endotélio ocupa um papel fundamental de estudo, visto que os mecanismos de ação sugeridos para muitos extratos de plantas estão diretamente relacionados com a via do NO (Fitzpatrick *et al.*, 1995; Wazlawik *et al.*, 1997). A partir de experimentos realizados com anéis de aorta torácica de ratos, certos pesquisadores verificaram que uma determinada mistura de polifenóis existentes no vinho, promovia relaxamentos dependentes da presença do endotélio vascular. Além disso, em outras preparações onde o endotélio foi removido, foram necessárias concentrações 1000 vezes maiores da mistura testada, para promover o relaxamento das preparações (Andriambelason *et al.*, 1997). O trabalho citado vai ao encontro aos

resultados obtidos no presente estudo, onde somente a partir de concentrações superiores a $100\mu\text{g/mL}$, passou-se a observar um relaxamento que independia da presença do endotélio vascular, tanto com o EBHA, bem como com as frações (BuOH e AcOEt) e subfrações (SN-1 e PPT-1) de *C. carthagenensis*. A atividade verificada nas maiores concentrações, valeu-se portanto, a algum outro tipo de mecanismo não relacionado com a via NO/GMPc.

Nos experimentos onde foi preservado o endotélio, observamos ainda que ambas as subfrações testadas (SN-1 e PPT-1) promoveram relaxamentos inferiores à sua fração de origem, a fração BuOH. A diminuição da capacidade vasorelaxante das subfrações poderia ter ocorrido: 1) Pelo método de separação não ser o mais adequado para a extração dos componentes ativos 2) por existir alguma relação de sinergismo químico-farmacológico entre os componentes ativos da fração BuOH, não permitindo a verificação deste efeito quando separamos os mesmos. O sinergismo entre flavonóides pôde ser verificado através de um estudo onde se procurou analisar o efeito inibitório da quercitrina e da afzelina sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), de pulmão de coelhos. Os pesquisadores constataram uma maior inibição da ECA quando estes dois flavonóides eram testados conjuntamente (Hansen *et al.*, 1996).

Nos experimentos farmacológicos realizados com a quercetina sulfatada (FC01) também foi observado apenas um discreto relaxamento, obtido nas maiores concentrações ($> 100\mu\text{g/mL}$). Neste caso, pode-se sugerir que a quercetina sulfatada não estar relacionada com o efeito biológico da planta ou necessita da presença de algum outro componente ativo para exercer sua atividade. Uma outra hipótese (relacionada com a inibição do NO) poderia ser sugerida com relação ao FC01 não ter promovido o relaxamento das preparações. Segundo um trabalho de Chiesi e Schwaller, de 1995, a

quercetina é capaz de inibir a eNOS em cultura de células endoteliais bovinas, provavelmente por interagir com o sítio de ligação da calmodulina.

De acordo com os resultados iniciais obtidos com o EBHA, frações e subfrações de *Cuphea carthagenensis*, nas preparações com endotélio íntegro e lesado, a fração BuOH foi escolhida para os ensaios farmacológicos subsequentes, visto que apresentou os menores valores de CI_{50} .

Para investigar o possível envolvimento do NO no relaxamento induzido pela fração BuOH, foram primeiramente utilizados o L-NOARG e o aminoácido L-arginina (Moore *et al.*, 1990; Frew *et al.*, 1993). Nos experimentos realizados somente com o L-NOARG (10 e 30 μ M), o relaxamento induzido pela fração BuOH foi significativamente abolido na presença deste inibidor das NOS. Os inibidores das NOS (L-NOARG, L-NAME, L-NMMA) promovem o bloqueio da atividade enzimática por serem análogos do substrato L-arginina, competindo com o aminoácido pelo sítio ativo da enzima (Aoki, 1995). Em outros experimentos, nos quais além do L-NOARG (10 μ M) foi adicionado também a L-arginina (1mM), foi observada uma reversão do efeito inibitório promovido pelo L-NOARG sobre o relaxamento induzido pela fração butanólica, alcançando valores muito próximos aos obtidos com as curvas controle à fração BuOH.

A dependência da camada de células endoteliais somada a inibição do efeito vasorelaxante verificada após a administração do L-NOARG, sugere a participação da via L-arginina/NO no relaxamento induzido pela fração butanólica. Esta hipótese permite a citação de alguns possíveis mecanismos relacionados com a formação de óxido nítrico: A ligação da e-NOS com o complexo cálcio/calmodulina envolve inicialmente o rompimento de uma ligação, entre a e-NOS e uma proteína chamada caveolina (Feron, 1999). Os componentes ativos da planta poderiam facilitar a dissociação do complexo e-NOS+caveolina ou ainda facilitar a translocação da e-NOS após sua

dissociação. Além disso, uma outra proteína chamada Hsp90 (*heat-shock protein*, responsável pela modulação de vários sinais intracelulares), é também recrutada pela e-NOS, quando agonistas (Por exemplo, a histamina) ou o próprio *shear stress* estimulam a produção de NO (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). A ligação e-NOS+Hsp90 aumenta a atividade da e-NOS e subseqüentemente, a formação de NO; os flavonóides também poderiam estar implicados com a ativação deste complexo.

Com o intuito de investigar a influência da fração butanólica na etapa subseqüente do relaxamento induzido pelo NO, foram utilizados os inibidores da enzima guanilato ciclase, o azul de metileno e o ODQ (Ragazzi *et al.*, 1995; Gathwaite *et al.*, 1995). Nesta etapa, foi constatada uma relação direta entre o relaxamento induzido pela fração BuOH e a formação de GMPc, pois com a inibição da enzima guanilato ciclase, ocorreu uma diminuição da capacidade do BuOH em relaxar a musculatura lisa vascular.

De acordo com primeiros resultados obtidos nas preparações isoladas, sugere-se o envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento vascular induzido pela fração BuOH, pelos seguintes motivos: a) na ausência do endotélio vascular, foram necessárias concentrações muito maiores da fração BuOH, para promover o relaxamento; b) o relaxamento foi significativamente inibido na presença do inibidor da NOS; c) a inibição induzida pelo L-NOARG foi praticamente revertida com L-arginina; d) a utilização de inibidores da guanilato ciclase também diminuiu o relaxamento induzido pela fração BuOH.

Os componentes ativos responsáveis pelos efeitos verificados com a fração BuOH de *Cuphea carthagenensis* poderiam ser atribuídos à duas classes de compostos polifenólicos, os taninos e os flavonóides, detectados nos ensaios fitoquímicos preliminares. Os flavonóides são substâncias capazes de promover relaxamento dependente de concentração, às respostas contráteis induzidas por noradrenalina ou KCl, em aortas de ratos (Herrera *et al.*, 1996).

Inúmeros mecanismos de transdução intracelular têm sido relacionados com os efeitos vasodilatadores dos flavonóides sobre o músculo liso. Determinados extratos de plantas contendo flavonóides são capazes de induzir o vasorelaxamento dependente da presença do endotélio, através da liberação e/ou aumento da atividade do NO, com conseqüente aumento nos níveis intracelulares de GMPc (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Andriambelason *et al.*, 1997). O aumento dos níveis de GMPc, de acordo com alguns estudos, pode ocorrer devido à inativação de determinadas fosfodiesterases (enzimas responsáveis pelo metabolismo do AMPc e GMPc) promovida pelos flavonóides (Beretz *et al.*, 1986; Saponara e Bosisio, 1998).

A formação e o aumento nos níveis de GMPc por sua vez, pode desencadear uma série de eventos intracelulares, relacionados à fosforilação protéica, inativação enzimática e mobilização de íons. Por meio de um estudo realizado com células musculares lisas e hepatócitos, foi verificado que o aumento do GMPc, promove a inibição do trifosfato de inositol (IP₃ - segundo mensageiro intracelular responsável pela liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares). O GMPc, atuando sobre proteínas quinases dependentes de GMPc (as quais são capazes de fosforilar os receptores do IP₃), diminui portanto a liberação de Ca²⁺ no meio intracelular, facilitando o relaxamento do músculo liso (Komalavilas e Lincoln, 1994). De acordo com certos pesquisadores, determinados flavonóides são ainda capazes de inibir o aumento da concentração intracelular de cálcio, pela inibição direta da fosfolipase C (Kyo *et al.*, 1998), enzima responsável pela geração de IP₃.

Os flavonóides são ainda capazes de inibir a proteína quinase C, responsável pela fosforilação de proteínas envolvidas com a mobilização intracelular de Ca²⁺ (Ferriola *et al.*, 1989), e interferem com o influxo de íons Ca²⁺, através da inibição de ATPases de membrana (Middleton e Kandaswami, 1993). No plasma de indivíduos septicêmicos, a quercetina

promoveu também a inibição significativa da fosfolipase A₂ (uma das enzimas mais importantes do processo inflamatório) nas amostras testadas (Lee *et al.*, 1982; Lindahl e Tagesson, 1993). Outros flavonóides isolados de *T. microphyllum* foram também capazes de inibir significativamente o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (Abad *et al.*, 1995).

Os taninos presentes no BuOH de *Cuphea carthagenensis* também poderiam estar contribuindo no efeito vasorelaxante verificado nos experimentos com a fração BuOH. De acordo com Russel e Rohrbach (1989), concentrações micromolares de taninos condensados promoveram o relaxamento de anéis de artéria pulmonar de coelhos, contraídos previamente com noradrenalina.

A suposta influência da fração BuOH sobre o influxo de Ca²⁺ nas células vasculares e sobre canais de Ca²⁺ modulados por receptor foi também verificada através da realização de CCR ao cálcio e à fenilefrina, na ausência e na presença de incubações isoladas e crescentes da fração BuOH. Com relação às CCR ao Ca²⁺, não foi verificada alteração em nenhuma das concentrações da fração BuOH testadas. Por outro lado, nos experimentos com a fenilefrina, houve um deslocamento significativo das curvas para a direita, verificado somente na incubação de 100µg/mL da fração BuOH. Através de estudo realizado com anéis de aorta torácica de ratos, Fitzpatrick *et al.*, 1993, verificaram que a incubação prévia com extrato de casca de uva (rico em polifenóis) diminuiu a contração máxima induzida pela fenilefrina, na presença de endotélio, sendo que em outras preparações onde o endotélio foi removido, tal efeito não foi observado. Godfraind (1986) verificou também que a via NO/GMPc é passível de interagir com canais de Ca²⁺ modulados por receptor, não sendo todavia sensível à canais de Ca²⁺ operados por voltagem. Porém, em nossos experimentos, a fração BuOH não alterou o efeito máximo

do agonista, mas promoveu o deslocamento para a direita, da CCR à fenilefrina sem alterar o efeito máximo, caracterizando um antagonismo competitivo.

Nos experimentos onde foi adicionada atropina (1 μ M) para a verificação de alguma possível influência da fração BuOH sobre receptores muscarínicos, não foi observada qualquer alteração significativa por parte do relaxamento induzido pela fração BuOH. Portanto, a possibilidade da fração butanólica exercer alguma atividade sobre este tipo de receptor foi descartada.

Outra possível atuação dos componentes ativos da fração BuOH pode estar relacionada com a capacidade dos polifenóis em doarem elétrons, estabilizarem moléculas reativas e quelarem metais de transição, caracterizando-os como antioxidantes (Rice-Evans, 1997). O aumento da atividade biológica do NO associado ao acúmulo de GMPc, pode ser devido a um aumento na geração de NO ou a uma diminuição de sua inativação por outras espécies reativas (Fitzpatrick, 1993). A última hipótese foi investigada através de experimentos realizados com o SNAP e o SIN-1, ambos doadores de NO e NO + O₂⁻, respectivamente (Holm *et al.*, 1998), em preparações desprovidas de endotélio.

As incubações isoladas de 100 e 300 μ g/mL da fração BuOH, adicionadas nos 15 minutos antecedentes ao início das curvas ao SNAP e ao SIN-1, facilitaram o relaxamento de ambos os compostos doadores, verificado pelo deslocamento para a esquerda, estatisticamente significativa das curvas, na presença da fração butanólica.

Sabemos que o SNAP libera apenas NO em solução aquosa (Menconi *et al.*, 1998; Holm *et al.*, 1998). Em nosso sistema, utilizamos uma mistura carbogênica com 95% O₂ e uma p O₂ em torno de 400-500 mmHg, superior aos níveis fisiológicos que estão por volta dos 20% de O₂ e 130 - 150 mmHg. Segundo Kelm *et al.* (1991), neste tipo de sistema, a meia-vida do NO pode ser comprometida, pela rápida reação deste radical com o O₂ e O₂⁻. gerados

no meio. Portanto, nas CCR ao SNAP, o relaxamento significativo das preparações verificado na presença da fração BuOH pode ter ocorrido devido a uma maior disponibilidade do NO no meio, em função do seqüestro das espécies reativas pelos componentes ativos presentes na fração butanólica.

Nos experimentos realizados com o SIN-1, podemos da mesma forma inferir a participação dos polifenóis presentes na fração BuOH, no seqüestro de O_2^- . A real liberação de radicais O_2^- nas condições experimentais pôde ser comprovada nos experimentos realizados com a SOD que converte o ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (Squadrito *et al.*, 1998). O deslocamento para a esquerda da CCR ao SIN-1, verificado após a adição da SOD correspondeu portanto, a dismutação do O_2^- pela enzima. Ainda com relação ao deslocamento verificado na CCR ao SIN-1, na presença da fração BuOH, ocorreu um deslocamento significativo, todavia menor que o deslocamento promovido pela SOD. Isso provavelmente ocorreu devido à velocidade de reação do O_2^- com a SOD e com a fração BuOH serem distintas. De acordo com Tsujimoto *et al.* (1993) certos compostos fenólicos apresentam uma significativa atividade seqüestradora de O_2^- , porém em níveis menores quando comparados com a SOD.

De acordo com os resultados até aqui apresentados, foi verificado que nos experimentos com o SNAP e o SIN-1, a concentração da fração butanólica que promoveu a facilitação do relaxamento por parte dos doadores, foi de $100\mu\text{g/mL}$, ou seja, a mesma concentração da fração BuOH que promoveu o início do relaxamento independente da presença de endotélio. Portanto, depreende-se do exposto acima, que a fração BuOH poderia, nas concentrações próximas a CI_{50} , desencadear um mecanismo que envolvesse diretamente a produção e liberação de NO, e em maiores concentrações, estar promovendo ainda o relaxamento do músculo liso, via seqüestro de espécies

reativas, facilitando desta maneira a difusão do NO (liberado pelo SNAP e pelo SIN-1) para a célula lisa vascular.

De acordo com vários trabalhos descritos na literatura, os flavonóides, compostos derivados do núcleo fundamental 2-fenilbenzopirano, estão presentes em muitas plantas e alimentos e são capazes de suprimir a formação de radicais livres, ou pelo seqüestro dos mesmos, ou ainda por se ligarem a metais pesados como o Fe^{2+} e o Cu^{2+} , os quais são responsáveis por uma série de reações formadoras de radicais livres, como por exemplo a reação de Fenton : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}\cdot$ (Duarte *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1996).

As pesquisas referentes ao processo de estresse oxidativo e a importância dos antioxidantes marcou seu início quando, em 1969, McCord e Fridovich descobriram o papel relevante da SOD verificando que esta enzima é um dos primeiros mecanismos de defesa das células eucariontes nos processos oxidativos.

A partir dos dados obtidos com os experimentos farmacológicos clássicos, procurou-se comprovar a hipótese de que a fração butanólica poderia efetivamente, em maiores concentrações, estar seqüestrando EROs. Dada a atual relevância dos flavonóides em relação a capacidade de seqüestrarem as EROs nos sistemas biológicos (Hanasaki *et al.*, 1994), continuou-se a investigação com os experimentos bioquímicos, a fim de avaliar a possível capacidade antioxidante da fração butanólica. Os mesmos ensaios foram também realizados com o EBHA, fração AcOEt e FC01, com o intuito de verificar se estas substâncias teriam alguma atividade antioxidante, apesar de não apresentarem a mesma atividade da fração BuOH nos experimentos farmacológicos.

De acordo com os resultados obtidos com o método enzimático de geração de O_2^- , pode-se observar que tanto o EBHA, como as demais frações e o FC01, promoveram tanto a inibição da redução do NBT, quanto a inibição

da enzima xantina oxidase (XO), ambos os efeitos verificados novamente na concentração de 100µg/mL.

A enzima XO é encontrada nas células endoteliais, normalmente na sua forma inativa, quando então é denominada xantina desidrogenase. Quando o endotélio é exposto à neutrófilos ativados (os quais geram grandes quantidades de O_2^-), ocorre a conversão da xantina desidrogenase para XO (Ward, 1991). O aumento da atividade da XO implica na geração de ácido úrico, além de O_2^- e H_2O_2 . Os radicais O_2^- por sua vez reduzem o Fe^{3+} para Fe^{2+} , permitindo a reação de Fenton e conseqüente formação de radicais (OH). A reação da xantina com a enzima XO tem sido a muito tempo reconhecida em gerar O_2^- e H_2O_2 tendo recentemente sido descrito o seu papel relevante em patologias como na artrite gotosa e na isquemia (McCord, 1985).

Muitos ácidos fenólicos e flavonóides são conhecidos na literatura, pela capacidade de reduzirem os níveis de formação de ácido úrico, sendo que a inibição da enzima XO parece estar relacionada com a presença de hidroxilas na molécula (Cotelle *et al.*, 1992; Rohnert *et al.*, 1998). Flavonóides como a baicaleína, miricetina, luteolina e quercetina são potentes inibidores da XO, verificado através da diminuição da formação de ácido úrico (Cos *et al.*, 1998). Segundo os resultados obtidos, tanto o extrato como as frações e o FC01 apresentaram uma significativa diminuição da formação de ácido úrico, com destaque no entanto, para a fração AcOEt e para o FC01. Com relação ao FC01, os resultados concordam com os trabalhos da literatura, que apontam a quercetina como um composto que apresenta alta capacidade em inibir a enzima XO, bem como em seqüestrar radicais O_2^- . (Cos *et al.*, 1998).

Com relação à capacidade do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 diminuírem o percentual de redução do NBT, pode-se sugerir que todos apresentam a capacidade de seqüestrarem radicais O_2^- . No entanto, a percentagem relativa de redução do NBT foi discretamente maior quando comparada com o

percentual de formação de ácido úrico. Isto significa que os níveis de geração de radicais O_2^- foram superiores aos esperados, baseando-se nos níveis de inibição da enzima XO. De acordo com este raciocínio, uma certa atividade pró-oxidante das amostras poderia ser considerada. Sem descartar esta possibilidade, deve-se, contudo, atentar para algumas supostas variáveis, igualmente importantes, que poderiam ter interferido na captura dos radicais O_2^- . A primeira diz respeito à própria enzima XO, a qual, como já foi mencionado, não gera exclusivamente radicais O_2^- . A segunda vai ao encontro de uma pesquisa de Britigan *et al.*, (1990) que verificaram uma concentração excedente de íons ferro em várias preparações comerciais de XO testadas. Segundo o trabalho destes pesquisadores, o ferro excedente permite que a reação de Fenton possa ser desencadeada promovendo a geração de outro radical: o OH^\cdot . Caso essa última variável tenha ocorrido, os componentes ativos presentes nas frações e o FC01 poderiam estar reagindo com outros radicais gerados, como o H_2O_2 ou supostamente o OH^\cdot , aumentando a maior disponibilidade e a concentração de O_2^- no meio de reação.

Para maior segurança quanto à efetiva capacidade sequestradora de O_2^- , o EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 foram submetidos a uma outra bateria de ensaios, onde foram gerados radicais O_2^- sem a interferência de qualquer enzima. Nestes resultados foi confirmada a capacidade do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 em sequestrarem o O_2^- , na concentração de $100\mu\text{g/mL}$. Outros trabalhos descritos na literatura apontam vários flavonóides como sequestradores de radicais O_2^- . Num estudo semelhante, Hanasaki *et al.*, (1994) verificaram que flavonóides como a epicatequina, miricetina, rutina, catequina, epigallocatequina, quercetina, galangina e morina apresentam uma alta capacidade sequestradora de radicais O_2^- sendo que apenas a epigallocatequina não apresentou efeitos inibitórios sobre a enzima XO.

A importância da descoberta de novas substâncias capazes de inativarem o O_2^- , está implicada na alto poder deste radical em ser o precursor de vários mecanismos geradores de outras espécies reativas. O peroxinitrito ($ONOO^-$) gerado a partir da inativação do NO pelo radical O_2^- . (White *et al.*, 1994), se decompõe a dióxido de nitrogênio (NO_2^-) e radical hidroxila (OH) (Radi *et al.*, 1993). Em pH fisiológico, o $ONOO^-$ é consideravelmente mais reativo que o O_2^- e o NO; sendo implicado na patogenia de inúmeras enfermidades como aterosclerose, hipertensão, artrite e endotoxemia (Demiryurek *et al.*, 1998).

Nos experimentos realizados para verificar a capacidade do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 em seqüestrarem o radical OH, utilizamos o ensaio da degradação da desoxirribose. De acordo com os resultados, tanto o EBHA como as frações e o FC01 inibiram a degradação da desoxirribose. Esta inibição foi concentração-dependente, sendo bastante significativa já nas menores concentrações utilizadas em nossos ensaios ($0,1\mu\text{g/mL}$).

Como já foi abordado ao longo deste trabalho, o radical OH pode ser gerado na presença de metais de transição como o ferro (Fe^{2+}) (Rubanyi, 1988; Debi e Goutier, 1990). As hemoglobinas e as ferritinas são proteínas responsáveis pelo armazenamento do ferro no organismo, porém, na sua forma inativa, inapropriada para desencadear a reação de Fenton. Por outro lado, a grande concentração de ferritina nas células endoteliais favorece o estresse oxidativo, ou seja, o O_2^- produzido nestas células pode mobilizar o Fe^{3+} e com isso dissociar o íon presente na ferritina, desencadeando o início da produção de radicais OH.

As células endoteliais apresentam uma grande susceptibilidade ao estresse oxidativo e isto se deve em parte, a alta concentração de ferritina (Ward, 1991) presente nestas células. O O_2^- gerado na célula endotelial pode

mobilizar o Fe^{3+} e com isso dissociar o íon presente na ferritina, desencadeando o início da produção de radicais $\text{OH}\cdot$.

Embora o radical $\text{OH}\cdot$ tenha um período de duração muito efêmero (cerca de alguns microsegundos) sua alta reatividade é suficiente para desencadear certas reações em cadeia, como alterações no DNA e peroxidação lipídica (Cross *et al.*, 1987; Halliwell, 1991). De acordo com Sun e Chen (1998), dentre as inúmeras espécies reativas de oxigênio geradas no organismo, o ONOO^- e o $\text{OH}\cdot$ estão entre as mais potentes podendo desencadear danos irreversíveis à proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos.

Os resultados sugerem que os componentes ativos, presentes no EBHA, bem como nas frações BuOH e AcOEt e o FC01 de *Cuphea carthagenensis*, exerceram atividade inibidora sobre a degradação da desoxirribose, possivelmente pelo seqüestro de radicais $\text{OH}\cdot$. Os flavonóides são potentes seqüestradores de radicais $\text{OH}\cdot$ sendo tão ou até mais potentes que os seqüestradores clássicos deste radical, como o etanol e o butanol (Husain *et al.*, 1987). Estudos indicam que a inibição da peroxidação lipídica verificada na presença de determinados flavonóides se deve as propriedades seqüestradoras de radicais O_2^- e $\text{OH}\cdot$ (Takahama, 1983; Husain *et al.*, 1987). Em trabalho realizado com determinados compostos fenólicos, isolados de *Salvia miltiorrhiza* (muito utilizada na China em casos de trombose e isquemias), estes compostos foram capazes de potencialmente inibir o estresse oxidativo induzido pelo Fe^{2+} /Cisteína, em membranas de hepatócitos de rato (Liu *et al.*, 1992).

Muitos trabalhos têm sugerido que certas espécies vegetais apresentam componentes ativos que protegem o organismo de desordens cardiocirculatórias (Fitzpatrick *et al.*, 1995; Wazlawik *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1997). Os flavonóides encontrados numa grande variedade de plantas utilizadas na medicina popular, promovem uma série de efeitos biológicos

como o relaxamento de vasos, a diminuição da peroxidação lipídica, a inibição da agregação plaquetária e o seqüestro de espécies reativas de oxigênio. (Husain *et al.*, 1987; Fitzpatrick *et al.*, 1993; Polette *et al.*, 1996; Cos *et al.*, 1998; Kaneko e Baba, 1999). Contudo, são necessários maiores estudos referentes aos mecanismos de absorção, distribuição e metabolismo dos flavonóides, para posterior correlação dos efeitos obtidos em condições experimentais com os benefícios provenientes da dieta (Formica e Regelson, 1995).

O presente estudo sugere que determinados polifenóis presentes na fração butanólica de *Cuphea carthagenensis* promovem o relaxamento da musculatura lisa vascular, atuando na via do NO/GMPc. Sem descartar a existência de outros mecanismos, sugere-se que os polifenóis da fração BuOH, participam do aumento da atividade biológica do NO, de duas maneiras: 1) os efeitos verificados nos experimentos farmacológicos poderiam ser diretamente atribuídos à formação de NO (dissociação do complexo e-NOS/caveolina; translocação da e-NOS; aumento da ligação e-NOS/Hsp90, aumento da concentração de cálcio intracelular, na célula endotelial) o qual, uma vez liberado, atuaria nos sistemas de transdução intracelular, envolvidos no vasorelaxamento. 2) Os polifenóis presentes na *Cuphea carthagenensis* poderiam, em maiores concentrações, contribuir com algum mecanismo clássico de transdução (inibição de fosfodiesterases, PKC, fosfolipase C), e ainda promover o aumento simultâneo da atividade biológica do NO pelo seqüestro de espécies reativas de oxigênio.

Alterações na via NO/GMPc estão relacionadas com a maior incidência de problemas cardiovasculares, como a hipertensão e a aterosclerose. O presente trabalho sugere que os efeitos verificados a partir do uso popular de *Cuphea carthagenensis* podem estar relacionados com os componentes ativos da planta. No entanto, mais estudos são necessários para o isolamento e a

identificação destes componentes, presentes nas frações de *Cuphea carthagenensis*, particularmente na fração butanólica.

* * *

RESUMO E CONCLUSÕES

A *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae) é uma planta nativa encontrada em várias regiões brasileiras e países americanos, popularmente indicada na medicina popular em distúrbios cardiovasculares.

Nosso estudo teve o objetivo de investigar a atividade farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA), frações acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH), subfrações SN-1 e PPT-1 e quercetina sulfatada (FC01) de *Cuphea carthagenensis* no músculo liso vascular, procurando ainda relacionar o efeito obtido nos experimentos farmacológicos com a atividade antioxidante dos componentes ativos da planta. Os experimentos farmacológicos desenvolvidos com o EBHA de *Cuphea carthagenensis*, bem como com as frações, subfrações e FC01 demonstraram que:

1. As adição cumulativa de concentrações (0,1 - 3000,0 µg/mL) do EBHA, bem como das frações AcOEt e BuOH e subfrações SN-1 e PPT-1 às preparações, promoveu um relaxamento dos anéis de aorta torácica de ratos contraídos previamente com fenilefrina, na presença de endotélio funcional. Por outro lado, a adição cumulativa (0,01 - 300,0 µg/mL) do composto FC01 às preparações, promoveu apenas um discreto vasorelaxamento dos anéis, verificado somente nas maiores concentrações. De acordo com nossos resultados, o relaxamento induzido pelo EBHA, AcOEt, BuOH, SN-1 e PPT-1 dependeu exclusivamente da presença do endotélio, nas concentrações inferiores a 100µg/mL. A fração BuOH promoveu os menores valores de CI_{50} quando comparada com o EBHA, AcOEt, SN-1 e PPT-1. Desta maneira, a fração butanólica foi a fração de escolha para os experimentos farmacológicos subsequentes.

2. O envolvimento do endotélio e do NO foram investigados através do uso do inibidor da enzima NO-sintase (L-NOARG). Além disso, como o NO induz ao relaxamento do músculo liso vascular via ativação da guanilato ciclase e acúmulo de GMPc, a possível interferência do BuOH nesta etapa também foi investigado. O pré tratamento dos anéis com o L-NOARG (10 e 30 μM) promoveu uma inibição bastante significativa no relaxamento induzido pela fração BuOH. Por outro lado, a incubação com L-arginina praticamente reverteu a inibição promovida pelo L-NOARG. O azul de metileno (10 μM) e o ODQ (1 μM) também promoveram um efeito inibitório no relaxamento induzido pela fração BuOH, com significativo deslocamento para a direita, da curva concentração-resposta à fração BuOH. O tratamento prévio dos anéis com atropina (1 μM) não afetou o relaxamento induzido pela fração BuOH.

3. A possível interferência da fração BuOH na contração induzida pelo cálcio e pela fenilefrina também foi investigada. A incubação prévia com concentrações isoladas crescentes da fração BuOH (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não interferiram significativamente nas contrações induzidas pelo cálcio. Por outro lado, nas CCR ao agonista α -adrenérgico, ocorreu um deslocamento significativo, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

4. A influência da fração BuOH no relaxamento induzido por determinados compostos doadores de NO (SNAP, que libera NO e SIN-1, que libera NO e O_2^- .) também foi investigada, em preparações sem a presença de endotélio, na ausência e na presença de concentrações isoladas crescentes de BuOH (30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$). Somente a incubação prévia com 300 $\mu\text{g/mL}$ da fração BuOH interferiu significativamente no relaxamento induzido pelo SNAP, deslocando a curva do doador de NO para a esquerda. O mesmo efeito

pôde ser verificado nas CCR ao SIN-1, com a incubação prévia de 100µg/mL da fração butanólica.

5. Através de ensaios bioquímicos, foi também investigada a possível capacidade dos compostos fenólicos presentes no EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 seqüestrarem espécies reativas de oxigênio. Os ensaios bioquímicos desenvolvidos revelaram que todas as amostras testadas apresentam uma atividade seqüestradora das espécies reativas geradas (OH^\cdot e $\text{O}_2^{\cdot-}$). No entanto, todas as substâncias testadas promoveram uma atividade antioxidante (tanto em relação a inibição da enzima xantina oxidase quanto a inibição da redução do NBT) apenas na concentração de 100µg/mL. Da mesma maneira, no sistema fenazina-metasulfato (sistema não-enzimático), a capacidade seqüestradora das amostras foi verificada somente nas concentração de 100 µg/mL. Com relação a capacidade seqüestradora de radicais OH^\cdot foi constatada uma alta capacidade do EBHA, AcOEt, BuOH e FC01 em inibirem a degradação da desoxirribose, já a partir das menores concentrações (0,1µg/mL) testadas.

6. O presente estudo sugere que determinados polifenóis presentes na fração butanólica de *Cuphea carthagenensis* promovem o relaxamento da musculatura lisa vascular, atuando na via do NO/GMPc. Os efeitos verificados nos experimentos farmacológicos poderiam ser diretamente atribuídos à formação de NO (dissociação do complexo e-NOS/caveolina; translocação da e-NOS; aumento da ligação e-NOS/Hsp90, aumento da concentração de cálcio intracelular, na célula endotelial) o qual, uma vez liberado, atuaria nos sistemas de transdução intracelular, envolvidos no vasorelaxamento. Além disso, os polifenóis presentes na *Cuphea carthagenensis* poderiam, em maiores concentrações, contribuir com algum mecanismo clássico de transdução

(inibição de fosfodiesterases, PKC, fosfolipase C), e ainda promover o aumento simultâneo da atividade biológica do NO pelo seqüestro de espécies reativas de oxigênio.

7. Alterações na via NO/GMPc estão relacionadas com a maior incidência de problemas cardiovasculares, como a hipertensão e a aterosclerose. Os efeitos verificados a partir do uso popular de *Cuphea carthagenensis* podem estar relacionados com os componentes ativos presentes na planta. No entanto, mais estudos são necessários para o isolamento e a identificação destes componentes, presentes nas frações e, particularmente, na fração butanólica.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Cuphea carthagenensis (Lythraceae) is a native plant widely distributed in Brazil and several American countries. Infusion of the whole plant is used in folk medicine as an antihypertensive remedy.

The aim of the current study was to determine the possible role played by the L-arginine-nitric oxide pathway in the vasorelaxant action of the butanolic fraction of *C. carthagenensis* in rings of rat thoracic aorta, and to identify the underlying mechanism(s) of action. The pharmacological experiments developed with the *Cuphea carthagenensis*, EBHA, its fractions, subfractions and FC01 revealed that:

1. The cumulative addition of EBHA from *Cuphea carthagenensis* as well as its fractions (AcOEt and BuOH) and subfractions (SN-1 and PPT-1), to the bath preparation (0.1 - 3000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) caused a concentration-dependent vasorelaxation response in endothelial-intact thoracic aorta rings pre-contracted with phenylephrine. The cumulative addition of FC01 (0.01 - 300.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to the bath preparation caused lower concentration-dependent vasorelaxation response in endothelial-intact thoracic aorta rings than it did in other compounds. At a concentration lower than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, relaxations induced by EBHA, BuOH, SN-1 and PPT-1 were exclusively dependent on the presence of a functional endothelium. As shown in our results, BuOH produced a minor IC_{50} value in comparison with EBHA, AcOEt, SN-1 and PPT-1 and because of this it was chosen for the subsequently experiments.

2. The involvement of the endothelium and endothelial NO was investigated by use of the NO-synthase inhibitor L-NOARG. As NO induces vascular smooth-muscle relaxation through activation of guanylyl cyclase,

leading to accumulation of cyclic GMP (Moncada, *et al*, 1991), the involvement of this pathway was also studied. Pretreatment of the rings with L-NOARG (10 and 30 μM) caused powerful blockade of the BuOH-induced relaxation. However, L-arginine (1mM) partly reversed the inhibition by L-NOARG of the relaxation induced by the BuOH. Methylene blue (10 μM) and ODQ (1 μM) also had an inhibitory effect and both induced parallel rightward shifts of the BuOH-induced relaxation of approximately 30 times those the control values. Pretreatment of the rings with atropine (1 μM) did not significantly affect the BuOH-induced relaxation.

3. We also investigated whether BuOH of *Cuphea carthagenensis* interfere with calcium and phenylephrine-induced contractions in rat thoracic aorta rings. Pre-incubations of the rings with BuOH (10, 30 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) caused no significant blockade of calcium-induced contractions.

4. The effects of BuOH on the vasorelaxation induced by SIN-1 (which releases both NO and O_2^-) and SNAP (which releases NO) were also investigated (Feelisch *et al.*, 1989). The BuOH incubations (100 and 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) produced a leftward shift in the concentration-response curve for SNAP in endothelium denuded aorta. The pretreatment of the rings with BuOH (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) also produced a leftward shift in the concentration-response curve for SIN-1.

5. The ability of the phenolic compounds present in EBHA, BuOH, AcOEt and FC01 to scavenger active oxygens (superoxide anion and hydroxyl radical) was also investigated. Hydroxyl radical (OH^\cdot) was generated by the deoxyribose degradation induced by $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ reaction. Superoxide anion (O_2^-) was generated by the xanthine/xanthine oxidase system (XO/NBT) and

phenazine-metasulphate system. The biochemical experiments developed with the *Cuphea carthagenensis*, EBHA, AcOEt, BuOH and FC01, revealed that all compounds tested in our experiments were able to scavenge both $O_2^{\cdot-}$ and OH radicals. However, in xanthine/xanthine oxidase system, these compounds were only slightly effective (by both inhibition of uric acid formation and $O_2^{\cdot-}$ production) at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. In the phenazine-metasulphate system, the scavenging capacity of the compounds, was also only effective at concentration ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). It was shown that all compounds are also good hydroxyl radical scavengers, able to inhibit the deoxyribose degradation at lower concentrations ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

6. The present study demonstrates that the EBHA, fractions and subfractions of aerial parts from *Cuphea carthagenensis* can cause an endothelium-dependent increase in NO-content in the rat aorta. The strong relaxant effect demonstrated by BuOH could be due to the presence of polyphenols, as demonstrated by phytochemical analysis. These polyphenols from BuOH fraction can participate in the enhanced NO biological activity in two ways. First, vasorelaxant effects may result from the activation of the cGMP pathway. Second, the antioxidant properties of polyphenols (as observed in our biochemical assays) are likely to be involved, at minimum, in this effect.

7. Present evidence indicates that a defective NO/cyclic GMP pathway exists in cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension. Such results might account for the beneficial effects of *Cuphea carthagenensis* reported in traditional medicine in relation to the prevention of cardiovascular diseases. Studies are currently underway to isolate and identify the active compounds in the plant, as well as to determine its *in vivo* activity.

BIBLIOGRAFIA

- ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. The activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC. (*Compositae*) on soybean lipoxygenase prostaglandin synthetase. *Gen. Pharmacol.*, **26** (4): 815-819, 1995.
- AKERELE, O. WHO'S traditional medicine program progress and perspectives. *Who Chronid.*, **38**: 76-81, 1984.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras. São Paulo : Hemus Editora, p.318, 1993.
- ANDRIAMBELOSON, E.; KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Nitric Oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 1053-1058; 1997.
- AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signalling molecule. *Acta Histochem. Cytochem.*, **28** (2): 97-106, 1995.
- AUGUSTO, O.; GATTI, R.M.; RADI, R. Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and 3-morpholinopyrrolidine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biomed. Biophys.*, **310**: 118-125, 1994.

AVILA, M. A.; VELASCO, J. A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p-53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.*, **54**: 2424-2428, 1994.

BAGGIOLINI, M.; WYMAN, M.P. Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 69-72, 1990.

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants. state of art. *Am. J. Med.*, **91**: 2S-12S, 1991.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq. Brasil. Cardiol.*, **68** (1): 1-16, 1997.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1624; 1990.

BERETZ, A.; BRIANÇON-SCHIED, F.; STIERLE, A.; CORRE, G.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. P. Inhibition of human platelets cAMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate. *Biochem. Pharmacol.*, **35**: 257-262, 1986.

BRITIGAN, B. E.; POU, S.; ROSEN, G. M.; LILLEG, D. M.; BUETTNER, G.R. Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J. Biol. Chem.*, **29**: 17533-17538, 1990.

- BRUNELLI, L.; CROW, J.P.; BECKMAN, J.S.; The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Erichiscea coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 327-334, 1995.
- CHIESI, M.; SCHWALLER, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.*, **49** (4): 495-501, 1995.
- CORRÊA, D. S.; RABETTI, A. C.; ERA, G. A. ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost. *Braz. J. Med. Res.*, **24**: 729-734, 1991.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Structure-activity relationships and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61**: 71-76, 1998.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HENICHART, J. P.; CATTEAU, J. P.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Rad. Biol. Med.* **13** (3): 211-219, 1992.
- CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E. D.; PRYOR, W. A.; AMES, B.N.; SAUL, R.L.; McCORD, J.M.; HARDMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, **107**: 526-545, 1987.

DARLEY-USMAR, V.M.; MASON, R. P.; CHAMULITRAT, W.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Immunopharmacology of Free Radical Species, in: Lipid peroxidation and Cardiovascular Disease. (BLAKE, D. and WINYARD, P.G. eds.) *Academic Press*, p.24, 1995.

DAROS, M.R.; FARIAS, M.R.; CARO, M.S.B.; SIMÕES, C.M.O. Caracterização de um Derivado de Quercetina em *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) McBride. XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Florianópolis, SC, 1996. *Resumo*.

DEBY, C.; GOUTIER, R.; New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.*, **39**: 399-405, 1990.

DEMIRYUREK, A.T.; ÇAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol. Toxicol.*, **82** (3): 113-117, 1998.

DOMINGUEZ, X.A. Metodos de investigacion fitoquímica. México: Limusa, 1973.

DRAGSTED, L.O.; STRUBE, M.; LARSEN, J.C. Cancer protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, **72** (Suppl. 1): 116-135, 1993.

- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; UTRILLA, P.; JIMENEZ, J.; TANARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.*, **24**: 857-862, 1993.
- DUBEY, R.K.; LÜSCHER, T.F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens.*, **22**: 412, 1993.
- DUTHIE, S.J.; DOBSON, V.L. Dietary protect human colonocyte from oxidative attack *in vitro*. *Z. Ernährungswiss.*, **38**: 28-34, 1999.
- ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; WAEG, G.; STREIGL, G.; JURGENS, G. Biochemical, structural and functional properties of oxidised low density lipoproteins. *Chem. Res. Tox.*, **3**: 77-91, 1990.
- FALCONE, J.C. Endothelial cell calcium and vascular control. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **27** (8): 1165-1169, 1995.
- FARBER, J.L.; KYLE, M.E.; COLEMAN, J.B. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* **62**: 670-679, 1990.
- FEELISCH, M.; OSTROWSKI, J.; NOACK, E. On the mechanism of NO release from sydnomies. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **14** (Suppl. 11), 13-22, 1989.
- FERNANDES, P. D.; ASSREUY, J. Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular. *Revista Ciência Hoje*, vol. 18 (103): 8-10, 1995.

FERON, O. Intracellular localization and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **8 (1)**: 55-59, 1999.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES, S.L.M.; QUEIROZ, S.R.R.; HELUY NETO, N.E.; COROZZA, R.; FARIAS, R.C. Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais no Brasil, em: Indústria Farmacêutica e de Fitoterápicos, Acad. Bras. Ciências., p.14, 1998.

FERRIOLA, P.C.; CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr. Protein kinase inhibition by flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*, **38**: 1617-1624, 1989.

FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1, 1-dimethylethyl thionitrite. *J. Chem. Soc. Comm.*: 249-250, 1978.

FITZPATRICK D.F.; STEVEN, L.; HIRSCHFIELD, S. L.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.*, **265**: H774-H778, 1993.

FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S. L.; RICCI, T.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: 90-95; 1995.

- FLEMING, W. W.; WESTPHALL, D. P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLET, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues . *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **181**: 339 - 345; 1972.
- FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.*, **62**: 347-504, 1982.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* **33** (12): 1061-1080, 1995.
- FREMONT, L.; GOZZELINO, M. T.; FRANCHI, M.P.; LINARD, A. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rat fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *J. Nutr.*, **128**: 1495-1502, 1998.
- FREW, J. D.; PAISLEY, K.; MARTIN, W. Selective inhibition of basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by NG-monomethyl-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* **110**: (3): 1003-1008, 1993.
- FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**: 175-197, 1984.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376, 1980.

- GARCIA-CARDENA, G.; FAN, R.; SHAH, V.; SORRENTINO, R.; CIRINO, G.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392** (6678): 821-824, 1998.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, **48** (2): 184-188; 1995.
- GARTNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the *E. coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.*, **266**: 1478-1483, 1991.
- GIBSON, A.; LILLEY, E. Superoxide anions, free radical scavengers and nitrenergic neurotransmission. *Gen. Pharmacol.*, **28** (4): 489-493, 1997.
- GODFRAIND, T. EDRF and cyclic GMP control gating of receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **126**: 341-343, 1986.
- GONZALEZ, A.G.; VALENCIA, E.; EXPÓSITO, T.S.; BARRERA, J.B.; GUPTA, M.P. Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: a new triterpene from *C. carthagenensis*. *Planta Médica* **60** (6): 592-593, 1994.
- GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées Traditionnelles en Guyane. Paris; Orstom, 1987.

GRIENDLING, K.K.; ALEXANDER, W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* **10**: 283-292, 1996.

GRISHAM, M. B. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine, in: Reactive oxygen metabolism. (M. B. Grisham ed.) *Landes Co.*, p.10, 1992.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of the endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**: 454-456; 1986.

HALLIWELL, B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs*, **42**: 569-605, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FESB. Letters*, **128**: 347-352, 1981.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad. Res.*, **16** (6): 845-850, 1994.

HANSEN K.; ADESERSEN, A.; SMITT, U.W.; NYMAN, U.; CHRISTENSEN, S.B.; SCHWARTNER, C.; WAGNER, H. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*, *Phytomedicine*, **2** (4): 313-317, 1996.

- HARRISON, D. G.; KURZ, M. A.; QUILLEN, J. E.; SELLKE, F. W.; MUGGE, A. Normal and pathophysiologic considerations of endothelial regulation of vascular tone and their relevance to nitrate therapy. *Am. J. Cardiol.*, **70** (8): 11B-17B, 1992.
- HERRERA, M. D.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; MARHUENDA, E.; DUARTE, J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility. *Gen. Pharmacol.*, **27** (2): 273-277, 1996.
- HOEHNE, F.C. Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais. São Paulo: Novos Horizontes, LXXI: 206-208, 1939-1978.
- HOLM, P.; KANKAANRANTA, H.; METSÄ-KETELÄ, T.; MOILANEN, E. Radical releasing properties of nitric oxide donors GEA 3162, SIN-1 and S-nitroso-N-acetylpenicillamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **346**: 97-102, 1998.
- HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxy-radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**: 2489-2492, 1987.
- IGNARRO, L. J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol.*, **67** (1): 1-7, 1990.
- ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Letters*. **364**: 279-282, 1995.

- JAFFE, E. A. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 454: 279-291, 1985.
- JORQUERA, C. S.; LAPA, A.J.; VIANA, G.S.B. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento, em: Validação de Plantas Medicinais, p. 30, 1993.
- KANEKO, T.; BABA, N. Protective effect of flavonoids on endothelial cells againsts linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**: 323-328, 1999.
- KELM, M.; FEELISCH, M.; DEUSSEN, A.; SCHRADER, J.; STRAUER, B.E. The role of nitric oxide in the control of coronary vascular tone in relation to partial oxygen pressure and flow. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (13): S95-S99, 1991.
- KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T.M. Phosphorylation of the inositol-1,4,5-triphosphate by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 8701-8707, 1994.
- KLUG, D.; RABANI, J.; FRIDOVICH, I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.*, **247**: 4839-4842, 1972.
- KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.*, **312**: 478-481, 1996.

KRIEGER, J.M.; KRIEGER, E. M. Hipertensão Arterial. *Revista Ciência Hoje*, vol. 18 (103): 76-79, 1995.

KYO, R.; NAKAHATA, N.; SAKAKIBARA, I.; KUBO, M.; OHIZUMI, Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca^{2+} elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. *J Pharm. Pharmacol.* **50** (10): 1179 - 1182, 1998.

LEE, T.P.; MATTELLIANO, M.L.; MIDDLETON, E. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci.*, **31**: 2765-2774, 1982.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Selective inhibition of groups II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation* **17** (5): 573-582, 1993.

LIU, G. T.; ZHANG, T. M.; WANG, B. E.; WANG, Y. W. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.*, **43** (2): 147-152, 1992.

LOPEZ, J.A.; ARMSTRONG, M.L.; PIEGORS, D.J.; HEISTAD, D.D. Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, tromboxane A2 and ADP. *Circulation*, **79**: 698-705, 1989.

LOURTEIG, A. Litráceas. *Flora Ilustrada Catarinense*, LITR: 1-80, 1969.

LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens.*, **8**: 344-348, 1986.

LÜSCHER, T.F. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur. Heart J.*, **12** (Suppl E): 2-11, 1991.

LÜSCHER, T.F.; BOULANGER, C.M.; DOHY, I.; YANG, Z. Endothelium-derived contracting factors [brief review]. *Hypertens.*, **19**: 117-130, 1992.

LÜSCHER, T.F. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J. Hypertens.*, **12** (Suppl 10): S105-S116, 1994.

MALINSKI, T.; BAILEY, F.; ZHANG, Z.G.; CHOPP, M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 355-358, 1993.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, M. A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.* **15**: 279-307; 1995.

MARINI-BETTOLO, G. B. Preliminary Chemical Screening of Medicinal Plants in Field Conditions, in: Old Health Organization. WHO, DPM/80.5, 1980.

MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*, **344**: 193-194, 1994.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055, 1969.

MENCONI, M. J.; UNNO, N.; SMITH, M.; AGUIRRE, D. E.; FINK, M. P.

Nitric oxide donor-induced hypermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical and peroxynitrite.

Biochem. Biophys. Acta, **1425** (1): 189-203, 1998.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Plant flavonoid modulation of

immune and inflammatory cell function, in: Human Nutrition A Comprehensive Treatise, Nutrition and Immunology. (D. M. ed.) **8**: 239-266, 1993.

MILBOURNE, E. A.; BYGRAVE, F. L. Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling? *Cell Calcium.*, **18** (3): 207-213, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol. Reviews*, **43** (2): 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, **329**: 2002-2012, 1993.

MONCADA, S. Nitric oxide. *J. Hypertens. Suppl.*, **12**: S35-39, 1994.

MONTEIRO, H. P.; WINTERBOURN, C. C. Release of iron from ferritin by divicine isouramil, acid-hydrolyzed vicine and dialuric acid and initiation of lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **271** (2): 536-545, 1989.

MOORE, P.K.; al-SWAYEH, O. A.; CHONG, N. W.; EVANS, A.; GIBSON, A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 408-412, 1990.

MURPHY, M.P.; PACKER, M. A.; SCARLETT, J.L.; MARTIN, S.W. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.* **31**(2): 179-186, 1998.

NAVA, E.; LUSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypertens. Suppl.*, **13** (2): S39-S48, 1995.

NEGRE-SALVAGYRE, A. SALVAGYRE, R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. *Free Rad. Biol. Med.*, **12**: 101-106, 1992.

NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chem. Letters.*, 1521-1524, 1991.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 281-285, 1989.

PALINSKI, W.; ROSENFELD, M.E.; YLA-HERTTUALA, S. GURTNER, G.C.; SOCHER, S. S.; BUTLER, S. W.; PARTHASARANTHY, S.; CAREW, T.E. STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1372-1376, 1989.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**: 664-666, 1988.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526, 1987.

PIO-CORREA. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.116-117, 1926-1979.

POLETTE, A.; DOMINIQUE, L.; LAGARDE, M.; VÉRICEL, E. N-3 Fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *F. K. Schat. Verlags.*, **75** (6): 945-949, 1996.

PRUIJN, F.B.; van GELDEREN, J.G.; BAST, A. The effects of radical stress and N-ethylmaleimide on rat hepatic alpha 1-adrenergic receptors. *Toxicol. Letters.*, **45**: 73-82, 1989.

QUINLAN, G.J.; EVANS, T.W.; GUTTERIDGE, J.M.C. Linoleic acid and protein thiol changes suggestive of oxidative damage in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome. *Free Rad. Res. Commun.* **20**: 299-306, 1994.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**: 481-487, 1991a.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. *J. Biol. Chem.*, **266**: 4244-4250, 1991b.

RADI, R.; COSGROVE, T.P.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A.; Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J.* **290**: 51-57, 1993.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. an L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates agregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5193-5197, 1990.

RAGAZZI, E.; CHINELLATO, A.; PANDOLFO, L.; FROLDI, G.; CAPARROTTA, L.; ALIEV, G.; PROSDOCIMI, M.; FASSINA, G. Endothelial nucleotide-mediated aorta relaxation in aged Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26** (1): 119-126, 1995.

- RAMOS, C. L. SOVITJ, P.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.E.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 8307-8312, 1992.
- REED, D. Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 603-631, 1990.
- RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**: 1523-1526, 1992.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **20** (7): 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Elsev. Sci.*, **2** (4): 152-159, 1997.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 837-841, 1988.
- ROGGENSACK, A.M.; ZHANG, Y.; DAVIDGE, S.T. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertens.*, **33**: 83-89, 1999.
- ROHNERT, U.; SCHNEIDER, W.; ELSTNER, E.F. Superoxide-dependent and independent nitrite formation from hydroxylamine : inhibition by plants extracts. *Z. Naturforsch.* **53**: 241-249, 1998.

- RUBANYI, G. M.; Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, **4**: 107-120, 1988.
- RUBANYI, G. M.; VANHOUTE, P.M. Superoxide anion and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol*, **250**: H822-H827, 1986.
- RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMANN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, **269** (42): 26066-26075, 1994.
- RUSSELL, J. A.; ROHRBACH, M. S. Tannin induces endothelium-dependent contraction and relaxation of rabbit pulmonary artery. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **139**: 498-503, 1989.
- SALONEN, J.K.; YLA-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; BUTLER, S.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYSSONEN, K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J.L. Antibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, **339**: 883-887, 1992.
- SANTOS, S. E. Atividades Farmacológicas da *Cuphea aperta* Koehne (sete-sangrias). Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, 1987.
- SAPONARA, R.; BOSISIO, E. Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue. *J. Natl. Prod.*, **61** (11): 1386-1387, 1998.

SAUBERMAN, N.; FORTIER, N.L.; JOSHI, W.; PITROWSKI, J.; SNYDER, L.M. Spectrin-haemoglobin crosslinkages associated with in vitro oxidant hypersensitivity in pathologic and artificially dehydrated red cells. *Br. J. Haematol.*, **54**: 15, 1983.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15** (7): 255-259, 1994.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N.; WANG, J.; HINTZE, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.*, **74**: 349-353, 1994.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10771-10778, 1994.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219, 1993.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Statistical methods, Ames, Iowa State University Press, 1967.

SNYDER, S.H., BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, **28**: 35, 1992.

SOEZIMA, R.A.; GODINHO, R.O.; SOUCCAR, C. LAPA, A.J. Dissociação das atividades hipotensora e anticolinesterásica da *Cuphea aperta* KOEHNE (Sete-Sangrias). XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. UFPR. *Resumo*, 34, 1992.

SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A.. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25** (4-5): 392-403; 1998.

STEINBRECHER, U. P.; ZANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, **9**: 155-168, 1990.

SUN, A. Y.; CHEN, Y. M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J. Biomed. Sci.*, **5** (6): 401-414, 1998.

TAKAHAMA, U. Hydrogen peroxide-dependent generation of singlet molecular oxygen by human saliva: its detection by chemiluminescence from cypridina luciferin analog. *Photochem. Photobiol.*, **57** (2): 376-379, 1993.

THOMAS, C. E.; JACKSON, R.L. Lipid hydroperoxide involvement in copper dependent and independent oxidation of low density lipoproteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 1182-1188, 1991.

TORRIELLI, M. V.; DIANZANI, M.U. Free radicals in molecular biology, aging and disease. (ARMSTRONG, D.; SOHAL, R. S.; CUTLER, R.G.; SLATER, T.F. eds.) vol. 27, pp 355-379. *Raven Press*, New York, 1984.

- TSCHUDI, M.R.; CRISCIONE, L.; LÜSCHER, T.F. Effect of aging and hypertension on endothelial function of rat coronary arteries. *Hypertens.*, **9**: 164-165, 1991.
- TSCHUDI, M.R. LÜSCHER, T.F. Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin and angiotensins. *Circulation.*, **91** (9): 2415-2422, 1995.
- TSUJIMOTO, Y.; HASHIZUME, H.; YAMAZAKI, M. Superoxide radical activity of phenolic compounds. *Int. J. Biochem.*, **25** (4): 491-494, 1993.
- VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, ii: 997-1000, 1989.
- VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.*, **323** (1): 27-36, 1990.
- VANHOUTTE, P.M.; LÜSCHER, T.F. Peripheral mechanisms in cardiovascular regulation: transmitters, receptors and the endothelium, in: Handbook of Hypertension, vol. 8 (ZANCHETTI, A.; TARAZZI, R.C. eds). *Elsevier*, 96-123, 1986.
- WARD, P.A. Mechanisms of endothelial killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils. *Am. J. Med.*, **91**: S89-S94, 1991.

- WAZLAWIK, E.; SILVA, M. A.; PETERS, R. R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J.Pharm. Pharmacol.*, **49**: 433-437, 1997.
- WEI, E. P.; KONTOS, H. A.; CHRISTMAN, C.W.; DE WITT, D.S.; POVLISHOCK, J.T. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ. Res.*, **57**: 781-787, 1985.
- WHITE, C.R.; BROCK, T. A.; CHANG, L.Y.; CRAPO, J.; BRISCOE, P.; KU, D.; BRADLEY, W. A.; GIANTURCO, S.A.; GORE, J.; FREEMAN, B. A.; TARPEY, M. M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 1044-1048, 1994.
- WITZTUM, J.L. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart. J.*, **69**: S12-S18, 1993.
- YLA-HERTTUALA, S.; ROSENFELD, M. E.; PARTHASARANTHY, S.; GLASS, C.K.; SIGAL, E.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Localization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidised low density lipoprotein in macrophage rich areas of artherosclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6959-6963, 1990.
- ZHU, L.; GUNN, C.; BECKMAN, J. S.; Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**: 452-457, 1992.

QUINLAN, G.J.; EVANS, T.W.; GUTTERIDGE, J.M.C. Linoleic acid and protein thiol changes suggestive of oxidative damage in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome. *Free Rad. Res. Commun.* **20**: 299-306, 1994.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**: 481-487, 1991a.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. *J. Biol. Chem.*, **266**: 4244-4250, 1991b.

RADI, R.; COSGROVE, T.P.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A.; Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J.* **290**: 51-57, 1993.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. an L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5193-5197, 1990.

RAGAZZI, E.; CHINELLATO, A.; PANDOLFO, L.; FROLDI, G.; CAPARROTTA, L.; ALIEV, G.; PROSDOCIMI, M.; FASSINA, G. Endothelial nucleotide-mediated aorta relaxation in aged Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26** (1): 119-126, 1995.

- RAMOS, C. L. SOVITJ, P.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.E.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 8307-8312, 1992.
- REED, D. Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 603-631, 1990.
- RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**: 1523-1526, 1992.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **20** (7): 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Elsev. Sci.*, **2** (4): 152-159, 1997.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 837-841, 1988.
- ROGGENSACK, A.M.; ZHANG, Y.; DAVIDGE, S.T. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertens.*, **33**: 83-89, 1999.
- ROHNERT, U.; SCHNEIDER, W.; ELSTNER, E.F. Superoxide-dependent and independent nitrite formation from hydroxylamine : inhibition by plants extracts. *Z. Naturforsch.* **53**: 241-249, 1998.

RUBANYI, G. M.; Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, **4**: 107-120, 1988.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTE, P.M. Superoxide anion and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol*, **250**: H822-H827, 1986.

RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMANN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, **269** (42): 26066-26075, 1994.

RUSSELL, J. A.; ROHRBACH, M. S. Tannin induces endothelium-dependent contraction and relaxation of rabbit pulmonary artery. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **139**: 498-503, 1989.

SALONEN, J.K.; YLA-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; BUTLER, S.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYSSONEN, K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J.L. Antibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, **339**: 883-887, 1992.

SANTOS, S. E. Atividades Farmacológicas da *Cuphea aperta* Koehne (sete-sangrias). Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, 1987.

SAPONARA, R.; BOSISIO, E. Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue. *J. Natl. Prod.*, **61** (11): 1386-1387, 1998.

SAUBERMAN, N.; FORTIER, N.L.; JOSHI, W.; PITROWSKI, J.; SNYDER, L.M. Spectrin-haemoglobin crosslinkages associated with in vitro oxidant hypersensitivity in pathologic and artificially dehydrated red cells. *Br. J. Haematol.*, **54**: 15, 1983.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15** (7): 255-259, 1994.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N.; WANG, J.; HINTZE, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.*, **74**: 349-353, 1994.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10771-10778, 1994.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219, 1993.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Statistical methods, Ames, Iowa State University Press, 1967.

SNYDER, S.H., BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, **28**: 35, 1992.

SOEZIMA, R.A.; GODINHO, R.O.; SOUCCAR, C. LAPA, A.J. Dissociação das atividades hipotensora e anticolinesterásica da *Cuphea aperta* KOEHNE (Sete-Sangrias). XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. UFPR. *Resumo*, 34, 1992.

SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A.. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25** (4-5): 392-403; 1998.

STEINBRECHER, U. P.; ZANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, **9**: 155-168, 1990.

SUN, A. Y.; CHEN, Y. M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J. Biomed. Sci.*, **5** (6): 401-414, 1998.

TAKAHAMA, U. Hydrogen peroxide-dependent generation of singlet molecular oxygen by human saliva: its detection by chemiluminescence from cypridina luciferin analog. *Photochem. Photobiol.*, **57** (2): 376-379, 1993.

THOMAS, C. E.; JACKSON, R.L. Lipid hydroperoxide involvement in copper dependent and independent oxidation of low density lipoproteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 1182-1188, 1991.

TORRIELLI, M. V.; DIANZANI, M.U. Free radicals in molecular biology, aging and disease. (ARMSTRONG, D.; SOHAL, R. S.; CUTLER, R.G.; SLATER, T.F. eds.) vol. 27, pp 355-379. *Raven Press*, New York, 1984.

TSCHUDI, M.R.; CRISCIONE, L.; LÜSCHER, T.F. Effect of aging and hypertension on endothelial function of rat coronary arteries. *Hypertens.*, **9**: 164-165, 1991.

TSCHUDI, M.R. LÜSCHER, T.F. Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin and angiotensins. *Circulation.*, **91** (9): 2415-2422, 1995.

TSUJIMOTO, Y.; HASHIZUME, H.; YAMAZAKI, M. Superoxide radical activity of phenolic compounds. *Int. J. Biochem.*, **25** (4): 491-494, 1993.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, ii: 997-1000, 1989.

VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.*, **323** (1): 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P.M.; LÜSCHER, T.F. Peripheral mechanisms in cardiovascular regulation: transmitters, receptors and the endothelium, in: Handbook of Hypertension, vol. 8 (ZANCHETTI, A.; TARAZZI, R.C. eds). *Elsevier*, 96-123, 1986.

WARD, P.A. Mechanisms of endothelial killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils. *Am. J. Med.*, **91**: S89-S94, 1991.

- WAZLAWIK, E.; SILVA, M. A.; PETERS, R. R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J.Pharm. Pharmacol.*, **49**: 433-437, 1997.
- WEI, E. P.; KONTOS, H. A.; CHRISTMAN, C.W.; DE WITT, D.S.; POVLISHOCK, J.T. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ. Res.*, **57**: 781-787, 1985.
- WHITE, C.R.; BROCK, T. A.; CHANG, L.Y.; CRAPO, J.; BRISCOE, P.; KU, D.; BRADLEY, W. A.; GIANTURCO, S.A.; GORE, J.; FREEMAN, B. A.; TARPEY, M. M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 1044-1048, 1994.
- WITZTUM, J.L. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart. J.*, **69**: S12-S18, 1993.
- YLA-HERTTUALA, S.; ROSENFELD, M. E.; PARTHASARANTHY, S.; GLASS, C.K.; SIGAL, E.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Localization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidised low density lipoprotein in macrophage rich areas of artherosclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6959-6963, 1990.
- ZHU, L.; GUNN, C.; BECKMAN, J. S.; Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**: 452-457, 1992.