



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

ANTONIO JORGE DE VASCONCELOS FORTE

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE
DIFERENTES FRAÇÕES OBTIDAS DE UM EXTRATO AQUOSO DA PLANTA
Alpinia zerumbet NA AORTA ISOLADA DE RATO**

**FORTALEZA
2009**

ANTONIO JORGE DE VASCONCELOS FORTE

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE
DIFERENTES FRAÇÕES OBTIDAS DE UM EXTRATO AQUOSO DA PLANTA *Alpinia*
zerumbet NA AORTA ISOLADA DE RATO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Co-Orientadora: Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira.

FORTALEZA
2009

F841e Forte, Antonio Jorge de Vasconcelos

Estudo comparativo da atividade vasodilatadora de diferentes frações obtidas de um extrato aquoso da planta *alpinia zerumbet* na aorta isolada de rato/ Antonio Jorge de Vasconcelos Forte. – Fortaleza, 2009.

60 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

I. Alpinia 2. Endotélio 3. Vasodilatação 4. Óxido Nítrico I.
Moraes Filho, Manoel Odorico de (orient.) II. Título.

CDD 615.1

ANTONIO JORGE DE VASCONCELOS FORTE

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE DIFERENTES
FRAÇÕES OBTIDAS DE UM EXTRATO AQUOSO DA PLANTA *Alpinia zerumbet* NA
AORTA ISOLADA DE RATO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 9 de setembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho
Universidade Federal do Ceará

À minha amada esposa e aos meus queridos
pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de tudo. Nada é impossível quando se está de acordo com a Sua vontade.

À minha amada esposa, sem a qual seria impossível realizar os meus sonhos e finalizar esse projeto. Seu amor, inteligência e determinação me inspiram a vencer quaisquer desafios.

Aos meus pais, pelo incomparável apoio que eles me oferecem e pelo seu amor incondicional.

Aos meus irmãos, pela amizade fiel que compartilhamos.

Ao meu orientador Professor Doutor Manoel Odorico de Moraes Filho, cujo mérito acadêmico, intelecto ímpar e personalidade agradável servem de exemplo a centenas de orientandos, serei eternamente grato pelos sábios conselhos e oportunidades que me foram concedidas desde minha passagem pelo PET-Medicina - UFC.

À minha co-orientadora Doutora Socorro Vanesca Frota Madeira, modelo de pesquisadora de sucesso, sem a qual essa pesquisa não teria sido possível, agradeço pela disponibilidade, excelentes sugestões, correções precisas e infindável paciência.

Ao Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru, exemplo de médico-cientista e detentor de conhecimento inigualável, por seu importante auxílio com a análise estatística e correções da dissertação.

Ao Professor Doutor José Glauco Lobo Filho, meu primeiro orientador e modelo de cirurgião, por direcionar-me no caminho das publicações científicas e pelos conselhos imprescindíveis ao sucesso profissional.

Ao doutorando Hidemburgo Gonçalves Rocha, por sua ajuda na preparação dos experimentos.

À mestre Ana Paula Macedo Santana, por nos conceder o extrato e as frações utilizadas neste trabalho.

Às minhas tias Rita, Teresinha, Helena, pelas orações, ajuda e contínuos votos de sucesso.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em especial, Aura Rhanes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Claude Bernard (InCB), FINEP, MCT, MS e FUNCAP, pela colaboração financeira e incentivo no desenvolvimento da pesquisa nacional.

À Dra. Andréa Galvão Marinho Bonfim, por todo o seu imprescindível apoio na finalização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Nivaldo Alonso, pelo exemplo de excelência cirúrgica e acadêmica, além do apoio inigualável e notável influência em minha formação.

Ao Professor Doutor Renato da Silva Freitas, pelo seu exemplo de trabalho árduo e competência cirúrgica, além do apoio ímpar em momentos decisivos da minha trajetória profissional.

RESUMO

Estudos recentes, realizados no LFE da UFC, mostraram que o extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith (EaAz), conhecida popularmente como colônia, causa atividade vasodilatadora na aorta torácica isolada de rato. Objetivando encontrar o princípio ativo desta planta, o EaAz foi fracionado com diferentes solventes e a atividade vasodilatadora das frações foi avaliada em anéis da aorta torácica isolada de rato. Além disso, o mecanismo de ação da fração acetato de etila obtida a partir do EaAz foi caracterizado. Ratos machos Wistar (250 a 300 g), oriundos do biotério da UFC, foram sacrificados por deslocamento cervical e a aorta torácica removida e dissecada. Montaram-se os anéis da aorta (4 a 5 mm) em câmeras orgânicas, contendo solução de Krebs, aeradas com carbogênio e mantidas a 37°C, para a medida de variações na tensão isométrica. A integridade do endotélio foi avaliada utilizando-se a acetilcolina (ACh; 10⁻⁵ M) e, posteriormente, o EaAz e as frações obtidas do EaAz, hexânica (FHxAz), acetato de etila (FAMAz), diclorometano (FDmAz) (0,15; 0,5; 1,5; 5; 15 e 50 µg/mL) foram testados em preparações contraídas com fenilefrina (Phe; 10⁻⁸ – 3x10⁻⁸ M). A fração FAMAz, ACh e nitroprussiato de sódio foram testados em preparações desprovidas de endotélio e tratadas com L-NAME (100 µM), caribdotoxina (CTX; 100nM) mais apamina (100 nM), ODQ (30 µM), catalase (500 U/mL), superóxido dismutase (SOD; 500 U/mL) e PEG-catalase (500 U/mL). O EaAz e as frações FHxAz e FAMAz foram capazes de relaxar, significativamente, a aorta torácica isolada de rato, apresentando os respectivos EC₅₀ 19,73, 11,15 e 9,08 (n = 5, 5 e 7, respectivamente, para cada grupo). Contudo, a fração FDmAz não apresentou atividade vasodilatadora. Depois, caracterizou-se a resposta vasodilatadora da fração FamAz, resposta essa que foi abolida em preparações desprovidas de endotélio e tratadas com L-NAME (n = 5), ODQ (n = 6) e PEG-Catalase (n = 2). Contudo, o efeito vasodilatador da fração FAMAz permaneceu inalterado após tratamento com CTX mais apamina, catalase e SOD na aorta torácica de rato (n = 5, 6 e 6, respectivamente, para cada grupo). Segundo nossos resultados, as frações FAMAz e FHxAz apresentaram uma maior potência na sua atividade vasodilatadora comparada ao EaAz. Este dado sugere que estas frações, possivelmente, contêm os princípios ativos responsáveis pela atividade vasodilatadora do EaAZ. Além disso, concluiu-se que a atividade vasodilatadora produzida pela FAMAz na aorta torácica de rato é dependente do endotélio e via NO-GMPc, talvez contando com a participação das espécies reativas do oxigênio ao nível intracelular.

Palavras-chave: *Alpinia*. Endotélio vascular. Vasodilatação. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Recent studies conducted at the LFE showed that the aqueous extract from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith (EaAz), popularly known as Colônia, causes vasodilation on isolated rat aortic rings. In order to find the active compound, the EaAz was diluted with different solvents and the vasodilator effect from the different fractions was analyzed on isolated rings of rat aorta. Additionally, the mechanism of action of the ethyl acetate fraction obtained from EaAz was characterized. Male rats Wistar (250 to 300g), provided by the vivarium of UFC, were terminated by cervical dislocation and the thoracic aorta was removed and dissected. The aortic rings (4 to 5 mm) were placed in chambers, which contained Krebs solution and carbogen and were kept at 37° C, in order to measure isometric tension variation. The endothelium integrity was assessed with acetylcholine (ACh; 10⁻⁵ M). Afterwards, the EaAz and the other fractions obtained from EaAz, hexane (FHxAz), ethyl acetate (FAMAz), dichloromethane (FDmAz) (0,15; 0,5; 1,5; 5; 15 and 50 µg/mL) were tested in preparations that contained phenylephrine (Phe; 10⁻⁸ – 3x10⁻⁸ M). The FAMAz fraction, ACh and sodium nitroprussiate (SNP; 10⁻⁸ M) were tested in preparations without endothelium and treated with L-NAME (100 µM), charybdotoxin (CTX; 100nM) plus apamine (100 nM), ODQ (30 µM), catalase (500 U/mL), superoxide dismutase (SOD; 500 U/mL) and PEG-catalase (500 U/mL). The EaAz and the FHxAz and FAMAz fractions were able to relax significantly the isolated rat aortic rings, and EC₅₀ was respectively 19,73, 11,15 and 9,08 (n = 5, 5 and 7, respectively, for each group). However, the FDmAz fraction did not present vasodilator activity. The vasodilatory effect of the FAMAz fraction was characterized. The vasodilator activity of the FAMAz fraction was impaired in preparation without endothelium and previously treated with L-NAME (n = 5), ODQ (n = 6) and PEG-Catalase (n = 2). However, the vasodilator activity of the FAMAz fraction remained unchanged after treatment with CTX plus apamin, catalase and SOD on the isolated rat aortic rings (n = 5, 6 and 6, respectively, for each group). The FAMAz and FHxAz fractions presented higher potency in their activity when compared to EaAz. This phenomenon suggests that these fractions possibly contain the active compound responsible for the EaAZ vasodilator effect. In addition, it was concluded that the vasodilator effect caused by the FAMAz fraction on the isolated rat aortic ring is endothelium-dependent and via NO-cGMP. We also believe that the intracellular reactive oxygen species play an important role on the vasodilator mechanism.

Keywords: *Alpinia*. Vascular endothelium. Vasodilation. Nitric Oxide.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações do extrato aquoso e das frações acetato de etila, hexânica e diclorometano de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina	35
Gráfico 2 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e a ausência do endotélio vascular	36
Gráfico 2A - Efeito da remoção do endotélio vascular no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato	36
Gráfico 2B - Efeito da acetilcolina e SNP na musculatura lisa de aorta de rato após a remoção do endotélio	37
Gráfico 3 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de L-NAME	38
Gráfico 3A - Efeito de L-NAME no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato	38
Gráfico 4 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de caribdotoxina/apamina	
Gráfico 4A - Efeito de caribdotoxina/apamina no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato	40
Gráfico 5 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a ausência e presença de L-NAME ou caribdotoxina/apamina, assim como após a remoção do endotélio	41
Gráfico 6 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alpinia zerumbet</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de ODQ	42

Gráfico 6A - Efeito de ODQ no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato	42
Gráfico 7 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de Alpinia zerumbet em anéis de aorta de rato pré-contráidos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de catalase.....	44
Gráfico 7A - Efeito de superóxido dismutase e catalase no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
APA	Apamina
ATP	Adenosina trifosfato cíclico
°C	Graus celsius
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CTX	Caribdotoxina
cm	Centímetros
CO ₂	Molécula de gás carbônico
DDK	Dihidro-5,6-dehidrocavaina
EC ₅₀	Concentração da substância que provoca 50% do efeito máximo
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EaAz	Extrato aquoso da planta <i>Alpinia zerumbet</i>
E _{max}	Percentual máximo de relaxamento induzido pelas substâncias estudadas
FAmAz	Fração acetato de etila
FDmAz	Fração diclorometano
FHxAz	Fração hexânica
g	Gramas
GC	Enzima guanililciclase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
K	Potássio
K _{CA}	Canais de íon potássio da alta, média e baixa condutividade ativados pelo Cálcio
K _{Cl}	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
Kv	Canais retificadores de potássio
L	Litro

L-NAME	N ^w -nitro-L-arginina
L-NMME	N ^G -monometil-L-arginina
M	Molar
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	MiliLitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mN	Milnewton
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOR	Noradrenalina
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NOSe	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
NOSc	Enzima óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	Enzima óxido nítrico sintase induzível
O ₂	Molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-ona
PDE-5	Fosfodiesterase específica do GMPc
PGE-1	Prostaglandina E-1
PI3I	Inositol Tri-fosfato
PKG	Proteína quinase G
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações Gerais	15
1.2 A Planta <i>Alpinia zerumbet</i>	17
1.2.1 Uso popular	18
1.2.2 Atividades farmacológicas exibidas pela planta e seus constituintes químicos	18
1.3 Endotélio vascular	20
1.4 Fatores relaxantes derivados do endotélio	21
1.5 Óxido Nítrico	21
1.6 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	22
1.7 Espécies reativas do oxigênio	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Obtenção do extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i> e frações	26
3.3 Isolamento da aorta torácica de rato	27
3.4 Procedimento experimental	28
3.4.1 Avaliação do efeito dilatador	28
3.4.2 Caracterização do efeito vasodilatador usando-se a fração mais potente	28
3.5 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Avaliação do estudo comparativo das frações obtidas a partir do extrato aquoso	31
4.2 Avaliação da participação do endotélio no mecanismo da atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso	32
4.3 Avaliação da participação do óxido nítrico na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso	33
4.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ativados pelo cálcio na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso	35
4.5 Avaliação da participação da guanilato-ciclase solúvel na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso	37

4.6 Avaliação da participação das espécies reativas do oxigênio na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A fitoterapia é conhecida, popularmente, como o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças. Desde a antiguidade, até os dias atuais, as plantas vêm sendo exploradas pelas suas propriedades benéficas à saúde humana. Na China, surgiu por volta de 3.000 a.C. quando o imperador Cho-Chin-Kei descreveu as propriedades do Ginseng e da Cânfora.

Segundo a legislação brasileira em vigor, RDC nº 48, de 16 de março de 2004, tem-se a seguinte definição do que seriam produtos fitoterápicos:

“Fitoterápico: medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”.

Nesta definição, pode-se notar a preocupação do legislador com a comprovação da segurança e da eficácia do medicamento fitoterápico. Tal cautela em parte surgiu como resposta às inseguranças demonstradas, pela classe médica e pelo público em geral, em relação ao uso de remédios fitoterápicos, que em momento nenhum devem ser considerados como terapia alternativa. Atualmente, encontram-se à disposição diversos medicamentos, de sucesso e de uso diário, produzidos através de plantas (TYLER *et al.*, 1998; GOLDMAN, 2001). Mas, em contrapartida, existe uma grande desconfiança e ceticismo por parte da classe médica em relação ao seu uso (MILLS; BONE, 2000). Tal fato é desencadeado pela escassez de informações precisas sobre a eficácia e qualidade desses medicamentos. Apesar da importância desses produtos, poucos foram minuciosamente estudados sob a ótica clínica e toxicológica e, durante muitos anos, foram comercializados sem normas precisas de registro por parte do governo brasileiro (PETROVICK *et al.*, 1997).

A idéia de que os remédios fitoterápicos são desprovidos de efeitos colaterais deve ser banida do imaginário popular. Vários estudos demonstram que as plantas contêm diversos componentes que são altamente tóxicos, como agentes antineoplásicos, glicosídeos cardioativos, alcalóides pirrolizidínicos, dentre vários (FARNSWORTH *et al.*, 1993; De SMET, 1995; DREW; MYERS, 1997; BRINKER, 1998; CUPP, 2000), muito embora os

efeitos colaterais do uso de fitoterápicos sejam menos freqüentes que os causados por drogas sintéticas (BROWN, 1992; D'ARCY, 1993).

Nos países em desenvolvimento, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajuda a reduzir a importação de drogas e acarreta também desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998). No desabrochar da industrialização brasileira, as empresas recém-criadas começaram a produzir fitomedicamentos baseadas nas informações e formulações tradicionais, o que se perpetuou até a década de quarenta, quando as empresas multinacionais se instalaram no Brasil e, a partir de então, se iniciou a comercialização de drogas sintéticas (PETROVICK, 1996), que passaram a dominar o mercado até os dias de hoje.

Como reflexo da globalização, revitalizou-se o interesse pela preservação das áreas verdes do planeta, mais precisamente a Amazônia, e, por conta disso, o consumidor brasileiro passou a procurar e investir mais em produtos naturais, aquecendo assim o interesse dos pesquisadores pelo conhecimento sobre plantas medicinais. Na região Amazônica, 260 plantas entre nativas e cultivadas foram catalogadas em duas comunidades que vivem nas margens da Baía de Marajó – PA; 1.200 são comercializadas no mercado Ver-o-peso, em Belém – PA; outras 242 espécies são cultivadas em quintais residenciais em Belém (AMOROZO; GELY, 1988; PRANCE, 1992).

Existem vários critérios que orientam a seleção de espécies vegetais destinadas ao estudo, tais como a abordagem etnofarmacológica, na qual a seleção e descrição da espécie é realizada de acordo com o seu uso terapêutico, evidenciado por um determinado grupo étnico. Isto favorece uma maior possibilidade de descoberta de novas substâncias bioativas. A descrição do histórico da planta, eficaz no tratamento e na cura de doenças, torna possível o seu estudo com uma considerável economia de tempo e de recursos.

As plantas medicinais para o Brasil são de extrema importância, considerando o grande número populacional espalhado pelo enorme território, no qual nem sempre medicamentos industrializados específicos são encontrados com facilidade, não existindo apenas esse empecilho, pois a grande parte da população de baixa renda não possui recursos suficientes para aquisição desses. Para os que residem em regiões mais distantes e pouco desenvolvidas, onde nem mesmo a luz elétrica existe, os fitoterápicos são bastante importantes, pois na flora pode-se encontrar a cura para seus males constituindo-se uma farmácia natural (LAINETTI; BRITO, 1980).

O uso das plantas medicinais, quando corretamente dosado, não traz praticamente nenhum efeito adverso. Portanto, desse fato se extrai a máxima, de que a avaliação das

propriedades atribuídas a uma planta é de vital importância para que se possa aferir a confirmação ou invalidação de seus efeitos.

1.2 A Planta *Alpinia zerumbet*

A família Zingiberaceae é a maior da ordem Zingiberales, constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e do sudeste da Ásia (CRONQUIST, 1981; KRESS *et al.*, 2002). Suas espécies, principalmente da floresta primária, crescem em habitats sombreados ou semi-sombreados, ricos em húmus. (DAHLGREN *et al.*, 1985).

A família possui bastantes espécies úteis ao consumo, fornecendo alimentos, perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel (TOMLINSON, 1969). O gengibre, *Zingiber officinale* Rosc., é usado para fins medicinais e como condimento (JOLY, 1993), os gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Nicolaia*, *Hedychium* e *Kaempferia* são bastante conhecidos no aspecto ornamental, pela beleza da folhagem e da inflorescência (WINTERS, 1995). *Alpinia* é o maior gênero da família, com mais de 200 espécies (CRONQUIST, 1981).

A espécie estudada, *Alpinia zerumbet*, é conhecida pelos nomes vulgares de colônia, paco-seroca, cuité-açu, pacova (ALMEIDA, 1993), gengibre concha (LORENZI; SOUZA, 1995), cardamomo-do-mato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-do-mato e paco-seroso (MACHADO, 1996).

Alpinia speciosa Schum ou *Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea aromática, perene, geralmente com rizoma do qual nasce o caule aéreo; este transporta folhas em geral disticamente dispostas, lanceoladas, pontudas, verdes-luzídias, de margens ciliadas de 50 a 70 cm de comprimento por 10 a 12 cm de largura, com larga bainha na base, que envolve o caule. No limite da folha com a bainha, se encontra uma lígula desenvolvida. As flores apresentam-se em grupos, protegidas por brácteas vistosas hermafroditas fortemente zigomorfas. O androceu é composto de um único estame fértil com grande antera e um número variável de estaminódios, em geral quatro, grandes petalóides, que desempenham a função de atração da flor. O fruto é uma cápsula subglobosa, com 2 cm de diâmetro, polispérmica.

A colônia chegou ao Brasil no século XIX para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro, recebendo o nome de flor-da-redenção e bastão-do-imperador, nomes advindos do fato de terem sido usadas as flores dessa planta para presentear a princesa Isabel, logo após assinatura da Lei Áurea (CORRÊA, 1975). Essa planta, ainda hoje, é bastante utilizada em

rituais de crenças afro-brasileiros, juntamente com a malva-branca, cipó-cabeludo e jurema, visando a indução ao transe.

1.2.1 Uso popular

Os autores se referem a vários fins aos quais se destinam as espécies do gênero *Alpinia* na cultura popular, dentre os quais: diurético, carminativo, estomáquico, anti-emético, espasmolítico, antiinflamatório, antiofídico, anti-histérico, vermífugo, no combate ao reumatismo e como tônico em geral (CRUZ, 1965; ALMEIDA, 1993).

Segundo Itokawa *et al.* (1981), na China, a droga “yakuchi”, derivada dos frutos da *Alpinia oxyphylla* Miguel, tem sido usada largamente na medicina oriental.

Os rizomas de *Alpinia officinarum* Hance têm sido usados na medicina oriental tradicional para tratar problemas estomáquicos e diarréias (KIUCHI *et al.*, 1992). Esses rizomas são usados como um componente de algumas fórmulas na medicina chinesa para aliviar desordens gastro-intestinais (ITOKAWA *et al.*, 1981).

A *Alpinia galanga* tem seus rizomas vendidos em mercados da Malásia para uso na preparação de condimento de carnes e de molhos (POOTER *et al.*, 1985).

No Japão, são comercializadas as sementes de *Alpinia japonica* (Thunb) Miq. como estomáquico e aromático (ITOKAWA *et al.*, 1980).

A *Alpinia speciosa* (Wendl.) Schum é usada no Amazonas como um agente cardiovascular e hipotensor (LUZ *et al.*, 1984). Também é utilizada no nordeste brasileiro, como agente hipotensor, vasodilatador e diurético, em forma de chá. O chá das folhas também atua como anti-hemorroidário (PRUDENTE *et al.*, 1992).

1.2.2 Atividades farmacológicas exibidas pela planta e seus constituintes químicos

Atualmente, todas as partes da planta vêm sendo objeto de pesquisas, não somente os rizomas e as folhas, mas também as flores e as sementes vêm recebendo atenção do meio científico.

Os pesquisadores já elencaram os principais constituintes do gênero *Alpinia* como sendo os compostos sesquiterpenos e flavonóides. Tal conhecimento adveio do estudo tanto do óleo extraído da planta, como também através de seu extrato aquoso e extrato hidroalcoólico. Os monoterpenos também são citados quando se fala do p-cimeno, usado em

preparações farmacêuticas, como estimulante da expectoração nos casos de bronquite e, localmente, como anestésico suave e antiséptico no tratamento de problemas estomacais.

As pironas 7,8-dihidro-5,6-desidrocaína e 5,6-desidrocaína parecem ser as responsáveis pela atividade antiúlcera das raízes da planta. A planta possui também atividades fungicida e bactericida presentes no óleo essencial das folhas.

Em pesquisas realizadas com o óleo essencial das flores e sementes da espécie em questão, foram relatados os seguintes componentes: Cardamonina e alpinetina nas sementes (KRISHNA; CHAGANTY, 1973).

Nos estudos realizados por Elzaawely *et al.* (2007), os resultados indicaram que o extrato hexano das flores continha uma maior quantidade de dihidro-5,6-dehidrocaína (DDK) que o das sementes. Descobriu-se também que o extrato etil-acetato das flores e sementes possuía uma alta atividade antioxidante e preventiva da oxidação do beta-caroteno, indicando-o como uma boa fonte de substâncias fenólicas promotoras de saúde, a ser empregado em preparações de chás ou de produtos alimentícios.

A propriedade farmacológica mais conhecida da espécie é seu efeito anti-hipertensivo. Mendonça *et al.* (1991) e Laranja *et al.* (1992) confirmaram seu efeito hipotensor através de estudos realizados com o chá das folhas da colônia.

Segundo Mpalantinos *et al.* (1998), no extrato aquoso de *Alpinia zerumbet*, flavonóides e cava pirones foram obtidos. Os flavonóides presentes eram rutina, caempferol-3-O-rutinosídeo, caempferol-3-O-glucoronídeo, (+)-catequina e (-)-epicatequina, todas substâncias conhecidas como contribuintes para ações hipotensivas, diuréticas e antiúlcero-gênicas. O dihidro-5,6-dehidrocaína e o 5,6-dehidrocaína foram descritos como antiúlcero-gênicos e antitrombóticos.

A ação antiinflamatória foi demonstrada por Santana *et al.* (1966) como sendo capaz de inibir processos edematosos, e Lima *et al.* (1993) demonstraram a atividade antifúngica do óleo essencial da *Alpinia speciosa*. A composição química dos óleos essenciais encontrados na folha e no rizoma da espécie foi estudada por Fujita e Yamashita (1973) e por De Pooter *et al.* (1995). De acordo com Pinho *et al.* (2005), o óleo essencial acima citado pode ser usado em aromaterapia como um antiespasmódico e como agente analgésico.

Bezerra *et al.* (2000) demonstraram que o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* é ativo no músculo liso intestinal, sendo este efeito independente da ação do sistema nervoso entérico. Este estudo oferece suporte para o seu emprego no tratamento contra diarreias como antiespasmódico.

Foi demonstrado que o extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* produz depressão do sistema nervoso central em ratos. Em ratos anestesiados, o extrato aquoso produziu também hipotensão dose-dependente quando administrado por via endovenosa e o efeito hipotensor não foi alterado pela atropina, propranolol ou hexametônio. Finalmente, em ratos não anestesiados, a administração oral crônica do extrato produziu hipotensão (VANDERLINDE, 1990).

O óleo essencial (5 e 10 µg/kg, via subcutânea), administrado em camundongos, potencializou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital e antagonizou as convulsões induzidas pelo cardiazol, indicativos de efeito central. O óleo essencial também apresentou efeito analgésico periférico (MENDONÇA, 1989).

Outro estudo, que busca descrever em parte o mecanismo de ação da atividade vasodilatadora do extrato hidroalcoólico de *Alpinia speciosa* Schum, demonstrou a participação do endotélio e a liberação de óxido nítrico (EMILIANO *et al.*, 2002).

Com relação aos possíveis efeitos toxicológicos, Mendonça *et al.* (1988) demonstraram que a administração de extrato alcoólico de *Alpinia speciosa* produziu excitação psicomotora, contorções, hipocinese, além de prolongar o tempo de sono.

1.3 Endotélio vascular

O endotélio vascular é um revestimento da superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Apresenta-se como uma camada monocelular de interface ativa, localizado entre a corrente circulatória e o músculo liso vascular. O seu funcionamento está intrinsecamente ligado à regulação do tono muscular liso vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular, atuando ainda na proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (VANE Jr *et al.*, 1990; VRINTS; HERMAN, 1991; BASSENGE; HUCKSTORF, 1991; MOLHO-SABATIER, 1987).

Furchgott e Zawadzki (1980) concluíram que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era totalmente dependente da existência do endotélio intacto e envolvia ainda a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual denominaram de endothelial-derived relaxing factor (EDRF), traduzido como fator de relaxamento derivado do endotélio. Tais conclusões incentivaram as pesquisas de investigação do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo.

O endotélio é responsável pela produção de óxido nítrico, de fator hiperpolarizante, de prostaciclina, de bradicidina, de endotelinas, de endoperóxidos, de

prostaglandinas, de tromboxano, de leucotrienos, de angiotensina II e de espécies reativas do oxigênio (BATLOUNI, 2001). A produção e a liberação desses fatores derivados do endotélio ocorrem sempre como resposta a substâncias neurohumorais (acetilcolina, adenosina trifosfato-ATP, bradicidina, trombina, entre outros) e a estímulos físicos (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Devido a essa função reguladora ambivalente do endotélio, qualquer disfunção no mesmo pode levar a alterações fisiopatológicas importantes no funcionamento dos vasos (VANHOUTTE; LÜSCHER, 1987; VANHOUTTE, 1997).

1.4 Fatores relaxantes derivados do endotélio

Os fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (nitric oxide – NO), a prostaciclina (MONCADA; VANE, 1979; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987,1988) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, cuja origem não se encontra bem elucidada (endothelium-derived hyperpolarizing factor - EDHF) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; KOMORI; VANHOUTTE, 1990; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1997).

1.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (também conhecido por monóxido de nitrogênio e monóxido de azoto), de fórmula química NO, é um gás solúvel, popularmente conhecido como um gás poluidor do ar e potencialmente tóxico. É altamente lipofílico e sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e certo grupo de neurônios do cérebro. É um importante sinalizador intracelular e extracelular e atua induzindo a guanil ciclase (GC), que produz guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que, dentre outros efeitos, induz o relaxamento do músculo liso, o que provoca ações biológicas, como a vaso e a broncodilatação.

A síntese de NO se realiza por ação de uma enzima, a óxido nítrico sintetase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina, que tem por produtos NO e L-citrulina, necessitando da presença de dois cofatores para esta reação, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH). O NO é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias, nos sistemas nervoso, imune e cardiovascular. Existem três formas de NOS, duas sendo denominadas constitutivas e dependentes de cálcio/calmodulina (cNOS), que são a endotelial e a neuronal, as quais sintetizam NO em condições normais, e a outra forma sendo

denominada induzida, que independe do cálcio (iNOS). O mecanismo de ação da cNOS é ativado por diversos agonistas, como acetilcolina, catecolaminas, angiotensinas e estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento, os quais, via trifosfato de inositol (IP3), causam liberação de Ca^{2+} intracelular que se une à calmodulina (BUSSE, 1990; LOSCALZO, 1995). A inibição da enzima NOS pode ser realizada com a administração aguda de análogos da arginina, tais como N^{G} -monometil-L-arginina (L-NMMA) e N^{W} -nitro-L-arginina (L-NAME). Ambos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (MOCADA *et al.*, 1991; REES *et al.*, 1990).

No sistema vascular, o NO produzido pelas células endoteliais é um determinante primário do tônus vascular em repouso, devido a sua liberação basal. Ele determina a vasodilatação quando sintetizado em resposta ao estresse de cisalhamento e a uma variedade de vasodilatadores. A produção ineficaz de NO foi constatada em certas doenças como aterosclerose, hipertensão, vasoespasma coronariano e cerebral e lesão de isquemia-reperfusão (MONCADA; PALMER, 1991; NATHAN, 1992; IGNARRO *et al.*, 1999).

O mecanismo de vasodilatação desencadeado pelo NO tem início na sua difusão pelas células do músculo liso vascular, relaxando-as pelo estímulo da enzima guanilil ciclase (GC), aumentando a produção de 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (RAPOPORT; MURAD, 1983) e gerando o estímulo da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG pode vir a ativar os canais de K^+ , induzindo hiperpolarização, ou estimular a saída de cálcio do citoplasma da célula, o que a leva a vasodilatação, podendo, ainda, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio, diminuindo o processo de contração muscular (RAPOPORT; MURAD, 1983).

Em suma, a ação hipotensora desse gás pode ser descrita no seguinte esquema: o endotélio usa o óxido nítrico para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, fazendo com que esse dilate, aumentando assim o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial. Isto explica o uso da nitroglicerina e outros derivados no tratamento da doença coronária, visto que esses compostos são convertidos em óxido nítrico, que, por sua vez, dilata as artérias coronárias, aumentando assim a sua irrigação.

1.6 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

A identidade química do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e seu mecanismo de hiperpolarização em células de músculo liso ainda não foram totalmente

desvendados, tendo em vista ser essa uma substância de curta duração (EDWARDS; WESTON, 1998).

Em algumas preparações vasculares, o desencadeamento da hiperpolarização, correlato ao relaxamento, se deve à ativação da bomba Na^+/K^+ , ou de canais de potássio ATP-sensitivos ou ativados por Ca^{2+} na membrana das células musculares lisas vasculares (CHEN, 1989).

O relaxamento provocado por esse fator ocorre sem que haja a elevação dos níveis intracelulares de GMPc e de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) nas células musculares lisas e também não sofre bloqueio pela ação de inibidores do NO (MOMBOULI *et al.*, 1997).

No intuito de investigar a natureza e a atuação desse fator, os pesquisadores se utilizaram de várias combinações de bloqueadores dos canais de potássio. A caribdotoxina (bloqueador dos canais de BK_{Ca} , IK_{Ca} e alguns Kv) e a apamina (bloqueador dos canais SK_{Ca}), quando utilizados em combinação, foram capazes de abolir a resposta à hiperpolarização resistente a inibidores da NOS e da ciclooxygenase, o mesmo não ocorrendo quando esses bloqueadores eram utilizados separadamente (ZYGMUNT; HÖGESTÄTT, 1996; PETERSSON *et al.*, 1997).

Existem ainda substâncias às quais são atribuídas a capacidade de causar hiperpolarização e conseqüente relaxamento no músculo liso vascular, como os ácidos epoxieicosatrienóicos, os metabólitos do ácido araquidônico derivados do citocromo P450 monooxigenase (CORRIU *et al.*, 1966a), a anandamida, um derivado do ácido araquidônico (RANDALL *et al.*, 1996), a adenosina (OLANREWAJU *et al.*, 1995), o monóxido de carbono (FURCHGOTT *et al.*, 1991), assim como os radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio (BÉNY *et al.*, 1991).

1.7 Espécies reativas do oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) mais conhecidas são o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito, devido a sua produção celular estar intimamente ligada ao metabolismo oxidativo. As enzimas antioxidantes envolvidas nesse processo incluem a superóxido dismutase (atua convertendo ânion superóxido em peróxido de hidrogênio) e a catalase (atua convertendo peróxido de hidrogênio em água). A catalase é uma enzima que contém heme e que é usualmente achada nos peroxissomos. A SOD corresponde a uma família de enzimas que são responsáveis pela quebra do peróxido. Existem 3 SODs mais

conhecidas: a CuZnSOD citosólica, a MnSOD mitocondrial e a EC-SOD extracelular (SZASZ *et al.*, 2007).

Inicialmente, os estudos que tentaram estabelecer o papel da ROS na vasodilatação demonstraram que o peróxido de hidrogênio, e não o ânion superóxido ou o radical hidroxila, foi capaz de causar o relaxamento de artérias coronárias caninas (NEEDLEMAN *et al.*, 1973; RUBANYI *et al.*, 1988). Em artérias coronárias de porcos, o peróxido de hidrogênio se mostrou capaz de gerar a hiperpolarização do tecido musculo liso vascular, independentemente do EDHF (BÉNY; VON DER WEID, 1991).

Na última década, diversos estudos relataram que a via PI3-quinase participa do aumento da ativação da NOS endotelial em resposta a vários estímulos, incluindo H₂O₂, estresse de cisalhamento, estrogênios e fator de crescimento endotelial vascular, por meio da fosforilação da NOS endotelial dependente de Akt ao nível Ser1177 e desfosforilação ao nível da Thr495 (FULTON *et al.*, 1999; MICHELL *et al.*, 1999; DIMMELER *et al.*, 1999; HAYNES *et al.*, 2000; FLEMING *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2002). Concomitantemente, demonstrou-se que as ROS constituem ativadoras potentes da via PI3-quinase/Akt em células endoteliais (THOMAS *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2003).

Ndiaye *et al.* (2005) mostraram que o uso de compostos polifenólicos do vinho tinto induz, por meio da fosforilação da NOS endotelial, via PI3-quinase/Akt em células endoteliais, a produção das espécies reativas de oxigênio, mediadoras intracelulares fundamentais na produção rápida e continuada de NO. Por sua vez, Madeira *et al.* (2009) demonstraram a formação de NO, induzido pelo uso do extrato da casca da uva, o qual é rico em polifenóis. Essa produção de NO ocorreu devido à ativação da NOS endotelial, pela via redox-sensível Src-quinase/PI3-quinase/Akt. O estudo sugere que a Src-quinase é um mediador anterior a via PI3-quinase/Akt, uma vez que a inibição da Src-quinase reduziu a fosforilação do Akt e da NOS endotelial, bem como o relaxamento. Além disso, o extrato da casca da uva causou fosforilação da Src-quinase e tal efeito foi impedido pelo uso de um análogo da SOD permeável à membrana, o que sugere que o evento inicial que leva a produção do NO em resposta ao extrato da casca da uva é a formação intracelular de ROS. No mesmo ano, Anselm *et al.* (2009) publicaram que o extrato WS1442 da *Crataegus sp.*, também rico em polifenóis, causa o relaxamento de anéis de artérias coronarianas mediado por NO por meio da fosforilação da NOS endotelial consequente da ativação redox-sensível da via Src/PI3-kinase/Akt. Assim, as espécies reativas de oxigênio participam da produção do NO via fosforilação da Akt e da NOS endotelial, sendo esse o mecanismo responsável pela vasodilatação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar o efeito vasodilatador de diferentes frações obtidas de um extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* e caracterizar o mecanismo de ação da fração que apresentar maior atividade vasodilatadora.

2.2 Objetivos específicos

1- Comprovar o efeito vasodilatador do extrato aquoso obtido do chá das folhas da *Alpinia zerumbet* em anel aórtico isolado de ratos.

2 - Comparar o efeito vasodilatador do extrato total e frações acetato de etila, diclorometano e lavada com hexano em anel aórtico isolado de ratos.

3 - Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com L-NAME em anel aórtico isolado de rato.

4 - Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com ODQ em anel aórtico isolado de rato.

5- Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com caribdotoxina e apamina em anel aórtico isolado de rato.

6 - Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com catalase em anel aórtico isolado de rato.

7 - Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com superóxido dismutase em anel aórtico isolado de rato.

8 - Avaliar o efeito vasodilatador da fração acetato de etila após tratamento com PEG-catalase em anel aórtico isolado de rato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 260 e 350g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Permaneceram em um ambiente climatizado, com condições adequadas de temperatura e umidade, com iluminação apropriada, observando-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Ofereceram-se água e alimento *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), projeto de Lei 1153-95, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Ceará sob número de registro 21/08.

3.2 Obtenção do extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* e frações

Folhas frescas de *Alpinia zerumbet* foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no município de Maranguape. A identificação botânica da planta encontra-se no Herbário Prisco Bezerra-EAC da Universidade Federal do Ceará sob o número 41.041.

O chá da *Alpinia zerumbet* foi inicialmente obtido misturado-se 4L de água a 30g de folhas pulverizadas. Depois de 3 horas, o chá foi filtrado, colocado em frasco âmbar e guardado em geladeira. Posteriormente, 3750mL do chá foram submetidos a um processo de liofilização, resultando em 3,721g de extrato liofilizado.

Para a partição do extrato, utilizou-se 3,5g do extrato liofilizado, inicialmente solubilizado em metanol/água (56mL de metanol mais 24mL de água). O extrato solubilizado foi então transferido para um funil de separação.

O primeiro solvente utilizado foi o hexano. O extrato hidrometanólico foi separado da fração com hexano, a qual foi reservada em um erlenmeyer e foi submetida a um total de 4 passagens de 100mL cada, permanecendo 15 minutos para a extração em cada passagem. Em seguida, a fração com hexano foi submetida a destilação com pressão reduzida, resultando em 44,4mg da fração.

O segundo solvente utilizado foi o diclorometano. O extrato hidrometanólico foi separado da fração com diclorometano, a qual foi reservada em um erlenmeyer e foi submetida a um total de 3 passagens de 50mL cada, permanecendo 15 minutos para a

extração em cada passagem. Em seguida, a fração com diclorometano foi submetida a destilação com pressão reduzida, resultando em 430,4mg da fração.

O terceiro solvente utilizado foi o acetato de etila. O extrato hidrometanólico foi separado da fração com acetato de etila, a qual foi reservada em um erlenmeyer e foi submetida a um total de 2 passagens de 50mL cada, permanecendo 15 minutos para a extração em cada passagem. Em seguida, a fração com acetato de etila foi submetida a destilação com pressão reduzida, resultando em 141,7mg da fração.

Em seguida, as frações foram diluídas, misturando-se 50mg das frações com 500 μ L de água destilada, resultando em soluções de 100mg/mL cada. Estas soluções foram então diluídas sequencialmente adicionando-se água destilada, de forma que, ao final, fossem obtidas soluções de 10mg/mL, 1mg/mL e 0,1mg/mL.

3.3 Isolamento da aorta torácica de rato

O animal foi sacrificado utilizando a técnica de deslocamento cervical. Posteriormente, foi disposto em decúbito dorsal e suas patas foram imobilizadas, de forma a expor toda a extensão do tórax e do abdômen. Com uma tesoura, foram separados os planos dérmicos e musculares a partir do nível da porção distal do esterno até o segundo espaço intercostal. Fez-se então uma incisão no gradil costal direito e esquerdo em toda a sua extensão, na face anterior do tórax, do nível do diafragma até o segundo espaço intercostal, de forma a rebater o tórax na direção cefálica. Uma vez expostos os órgãos torácicos, a aorta foi visualizada no lado esquerdo a partir do rebatimento contralateral do pulmão esquerdo e do coração. A aorta foi então pinçada delicadamente na região imediatamente superior ao diafragma, seccionada com uma tesoura, e dissecada em toda a sua extensão até a crossa aórtica. Durante todo o processo, extremo cuidado foi tomado para que não houvesse estiramento ou tração da aorta, o que poderia lesar o endotélio. Em seguida, a aorta foi disposta em uma placa de Petri com 20mL de solução de Krebs (composição: NaCl, 120; NaHCO₃, 25; KCl, 4,8; NaH₂PO₄, 1,2; MgSO₄, 1,2; Glicose, 11; CaCl₂, 1,8), sendo limpa e seccionada em vários anéis de 4 a 5 milímetros de comprimento, descartando-se os anéis oriundos das extremidades do vaso. Finalmente, os anéis foram montados em cubas orgânicas contendo solução de Krebs, aerados com carbogênio e mantidos a 37 °C para avaliação das modificações na tensão isométrica.

3.4 Procedimento experimental

O aparelho do banho de órgãos consiste em quatro cubas de 10mL, imersas em água destilada mantida continuamente a 37 °C. As cubas foram preenchidas com a solução de Krebs (composição em mM: NaCl, 120; NaHCO₃, 25; KCl, 4,8; NaH₂PO₄, 1,2; MgSO₄, 1,2; Glicose, 11; CaCl₂, 1,8) e a solução foi equilibrada com uma mistura de oxigênio e gás carbônico (95%O₂/5%CO₂). O tecido foi posicionado nas cubas e estirado de maneira que houvesse a manutenção de uma tensão basal de 1 grama. O anel de aorta era mantido estirado por dois micro-ganchos, dos quais um era fixo e o outro era móvel e conectado a um transdutor de força (PowerLab[®] Data Acquisition System Series, ADInstruments, Colorado Springs, CO, U.S.A.). Os dados foram gravados por um computador e analisados utilizando o programa LabChart versão 5.4.2 (ADInstruments, Colorado Springs, CO, U.S.A.).

3.4.1 Avaliação do efeito dilatador

Durante os primeiros 30 a 40 minutos, o tecido foi continuamente lavado nas cubas a cada 5 minutos, ajustando-se a tensão para 1 grama sempre que necessário, até que ele estivesse adequadamente estabilizado. Os tecidos foram então contraídos com uma solução de cloreto de potássio (composição em mM: NaCl 73,7; KCl 80; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 7H₂O 1,17; CaCl₂ 1,25) para testar a responsividade de cada preparação.

Após aproximadamente 15 a 20 minutos, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (iniciando-se com 1 microlitro de fenilefrina a 10⁻⁴M) até obterem entre 0,7 a 1,2 grama de contração acima do tônus basal. Após estabilização da contração induzida pela fenilefrina, foi adicionada acetilcolina (5 a 10 microlitros a 10⁻²M) no banho para testar a integridade do endotélio. As preparações cujo endotélio encontrava-se íntegro, contendo 80 a 100% de relaxamento, foram utilizadas nos experimentos.

Após a avaliação da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução de Krebs e estabilizadas por mais 20 minutos aproximadamente.

3.4.2 Caracterização do efeito vasodilatador usando-se a fração mais potente

Tendo verificado que, dentre as frações avaliadas, a fração acetato de etila foi a que apresentou maior atividade vasodilatadora, procedeu-se então à caracterização de seu mecanismo de ação.

Dessa forma, a fração acetato de etila foi testada em preparações desprovidas de endotélio e em preparações tratadas com L-NAME (100 μ M), caribdotoxina (CTX; 100nM) mais apamina (100 nM), ODQ (30 μ M), catalase (500 U/mL), superóxido dismutase (SOD; 500 U/mL) e PEG-catalase (500 U/mL). A presença e integridade do endotélio foi avaliada com acetilcolina e a integridade do músculo liso, com nitroprussiato de sódio.

3.5 Análise estatística

O efeito relaxante (R) das substâncias ou associações foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pela fenilefrina, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme a seguinte expressão:

$$R = \frac{T_F - T_S}{T_F} \cdot 100$$

Nela, TF e TS são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação da fenilefrina e de uma dada substância.

Em seguida, realizou-se a transformação logarítmica (base 10) das concentrações, molar ou mg/L. Os gráficos foram então elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador (após normalização) calculados para cada concentração da substância (após transformação logarítmica). Tais dados foram usados para construir as curvas concentração-resposta mediante o uso de análise de regressão não linear. Para tanto, tomou-se como base o modelo que utiliza uma função sigmóide do tipo:

$$y = a + \frac{b - a}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \cdot s}}$$

Nela, y corresponde à medida da resposta (efeito relaxante), x ao logaritmo decimal da concentração, a à resposta mínima e b à resposta máxima. A constante s é denominada fator de angulação (slope factor) e determina a angulação da curva. Em todas as análises, o valor de s foi fixado em 1, o que denota uma curva dose-resposta padrão. A EC_{50} (effective concentration), por sua vez, é definida como a concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou da resposta semimáxima; ou, mais precisamente, é o valor da concentração que corresponde ao ponto médio entre a resposta mínima e a máxima. A EC_{50} foi usada para quantificar a potência das substâncias, tendo em vista que constitui um parâmetro ordinariamente utilizado para tal finalidade, uma vez que define um ponto na curva dose-resposta peculiar a um dado fármaco. Os valores da EC_{50} , juntamente com os respectivos

intervalos de confiança de 95% (IC95%), foram calculados a partir das curvas de regressão (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003).

O efeito máximo (Emax) foi definido como a máxima resposta relaxante proporcionada por uma dada substância ou associação de compostos.

A estatística descritiva envolveu o cálculo da média e erro padrão da média (EPM). Comparações entre o efeito relaxante de duas substâncias ou associações foram efetuadas mediante o uso do teste *t* para variáveis independentes ou do teste *t* para dados emparelhados. Tratando-se de três ou mais substâncias ou associações, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) baseada em um fator (one-way analysis of variance), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os compostos dois a dois. A estatística F, por sua vez, foi usada para comparar a EC₅₀ entre as diversas substâncias ou associações (ARMITAGE; BERRY, 1994).

Em todas as análises, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), considerando como estatisticamente significativo um valor P bicaudal menor do que 0,05.

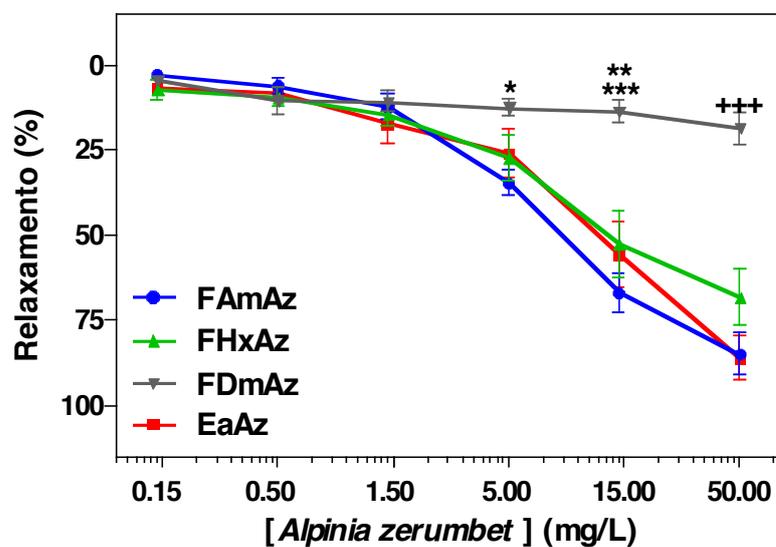
O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do estudo comparativo das frações obtidas a partir do extrato aquoso

O extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* apresentou atividade vasodilatadora dependente da concentração, com valor de EC_{50} 19,73 $\mu\text{g/mL}$. Dentre as frações avaliadas, obtidas do extrato aquoso total da planta *Alpinia zerumbet*, as frações acetato de etila e hexânica foram capazes de relaxar, significativamente, a aorta torácica isolada de rato, apresentando os respectivos EC_{50} 9,08 $\mu\text{g/mL}$ e 11,15 $\mu\text{g/mL}$, em relação a fração diclorometano. A fração diclorometano não apresentou atividade vasodilatadora (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações do extrato aquoso (EaAz) e das frações acetato de etila (FAMAz), hexânica (FHxAz) e diclorometano (FDmAz) de *Alpinia zerumbet* em anéis de aorta de rato pré-contráidos com fenilefrina.



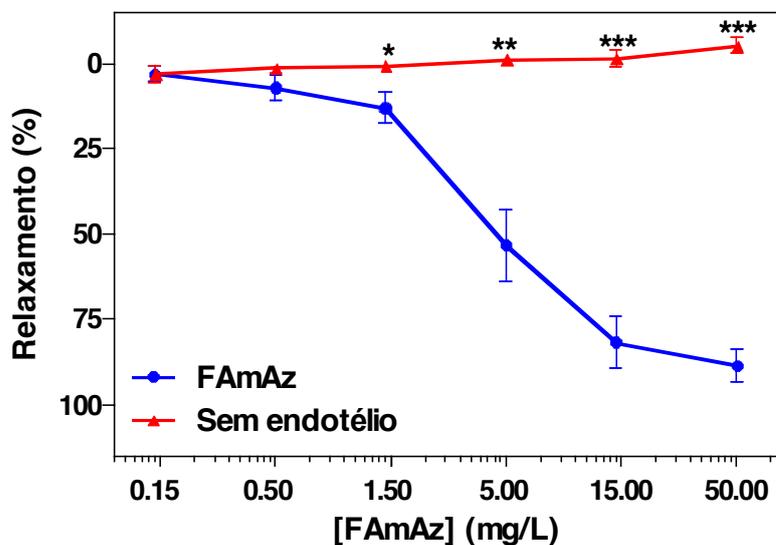
Fonte: Elaborado pelo autor.

*P < 0,05: FDmAz menor que FamAz; **P < 0,01: FDmAz menor que EaAz e FhxAz; ***P < 0,001: FDmAz menor que FamAz; +++P < 0,001: FDmAz menor que EaAz, FAMAz e FHxAz

4.2 Avaliação da participação do endotélio no mecanismo da atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso

Na preparação sem endotélio, não houve atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet*. Considerando o efeito relaxante, comparações entre os experimentos com a fração acetato de etila na presença e ausência de endotélio foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, o que evidenciou diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 1,50 ($P = 0,0323$); 5,00 ($P = 0,0021$); 15,00 ($P < 0,0001$) e 50,00 ($P < 0,0001$) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2).

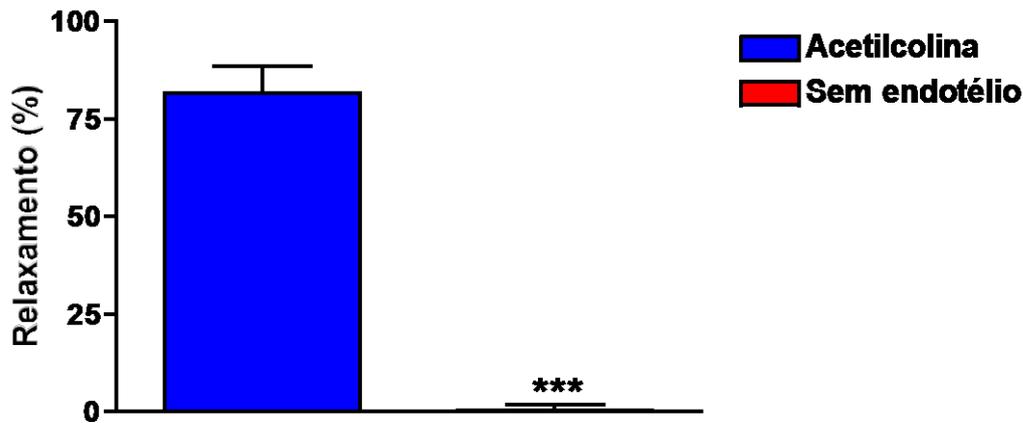
Gráfico 2 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e a ausência do endotélio vascular (sem endotélio).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos. Considerando o efeito relaxante, comparações entre os experimentos com FAmAz com e sem endotélio foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, o que evidenciou diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 1,50 (* $P = 0,0323$); 5,00 (** $P = 0,0021$); 15,00 (** $P < 0,0001$) e 50,00 (** $P < 0,0001$).

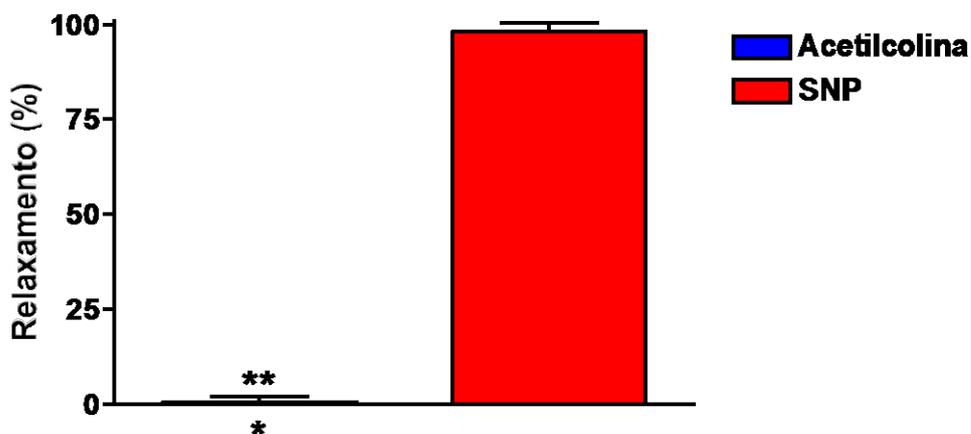
Gráfico 2A - Efeito da remoção do endotélio vascular no relaxamento induzido pela acetilcolina (10⁻⁵ M) em anel de aorta de rato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos. Houve diferença estatisticamente significativa (***) $P < 0,0001$.

Gráfico 2B - Efeito da acetilcolina e SNP na musculatura lisa de aorta de rato após a remoção do endotélio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

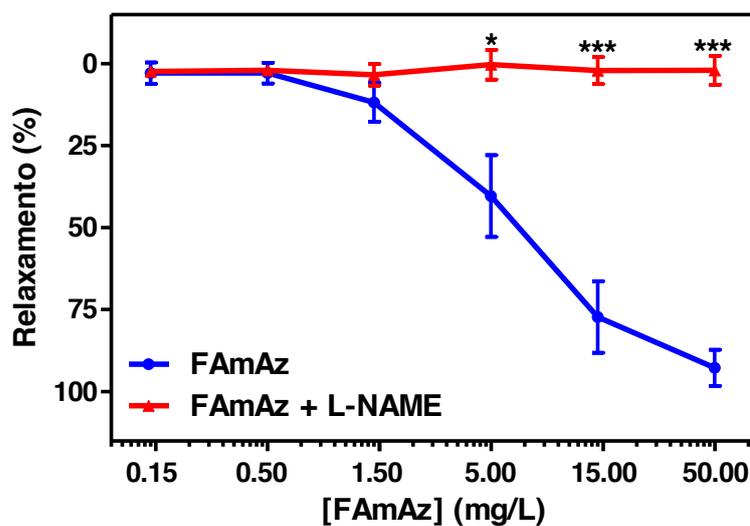
Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos. Evidenciou-se uma diferença estatisticamente significativa (***) $P < 0,0001$.

4.3 Avaliação da participação do óxido nítrico na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso

Tendo verificado que, dentre as frações avaliadas, a fração acetato de etila foi a que apresentou maior atividade vasodilatadora, procedeu-se então à caracterização de seu mecanismo de ação. A atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do

extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* foi reduzida significativamente após tratamento com L-NAME, um inibidor da eNOS. Estes resultados sugerem a participação do óxido nítrico na sua atividade vasodilatadora (Gráfico 3).

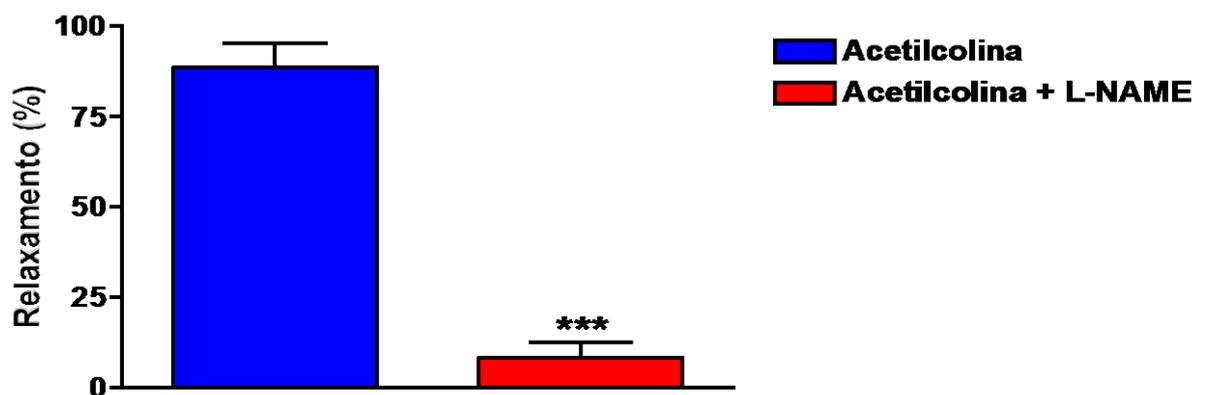
Gráfico 3 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de L-NAME (FAmAz+L-NAME).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos. Foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações: 5,0 (*P = 0,0166), 15,0 (**P = 0,0002) e 50,0 (**P < 0,0001).

Gráfico 3A - Efeito de L-NAME no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato.



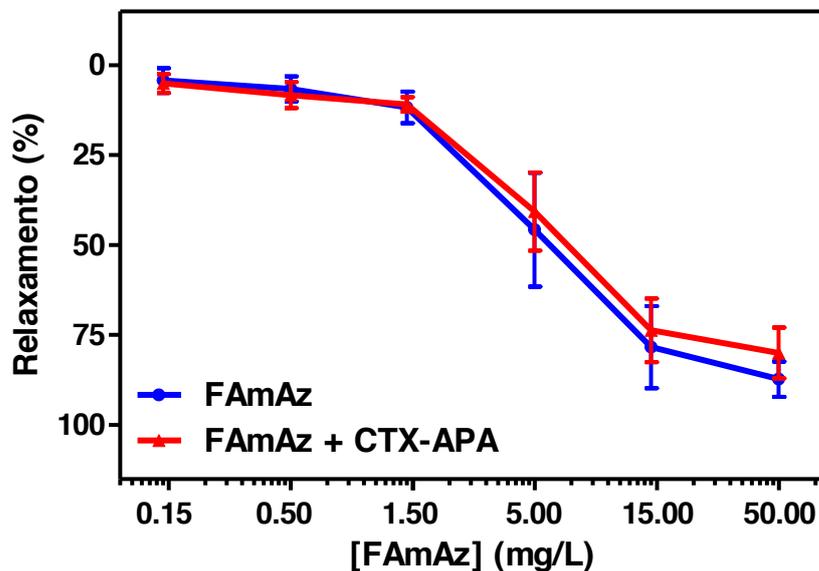
Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos. Houve uma diferença estatisticamente significante (**P < 0,0001).

4.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ativados pelo cálcio na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso

A atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* não foi alterada com o uso de caribdotoxina mais apamina. A EC_{50} referente a fração acetato de etila (6,024 $\mu\text{g/mL}$; $IC_{95\%}$: 2,283 a 15,900) foi comparada com a relativa a fração acetato de etila mais caribdotoxina e apamina (6,377 $\mu\text{g/mL}$; $IC_{95\%}$: 2,714 a 14,980), não sendo constatada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,9196$). Considerando o efeito relaxante, comparações foram realizadas mediante o uso do teste t para variáveis não emparelhadas, o que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações (Gráfico 4).

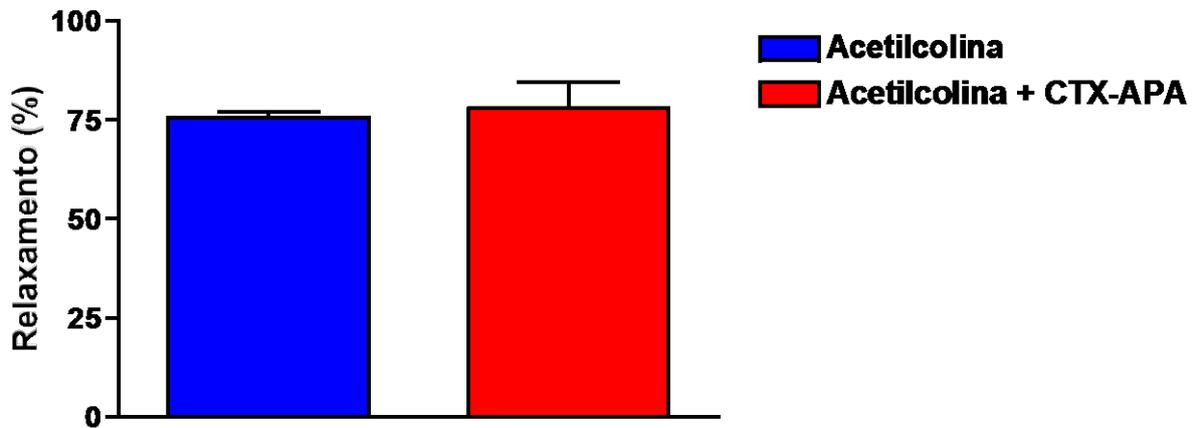
Gráfico 4 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de CTX-APA (FAmAz + CTX-APA).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos.

Gráfico 4A - Efeito de CTX-APA no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato.

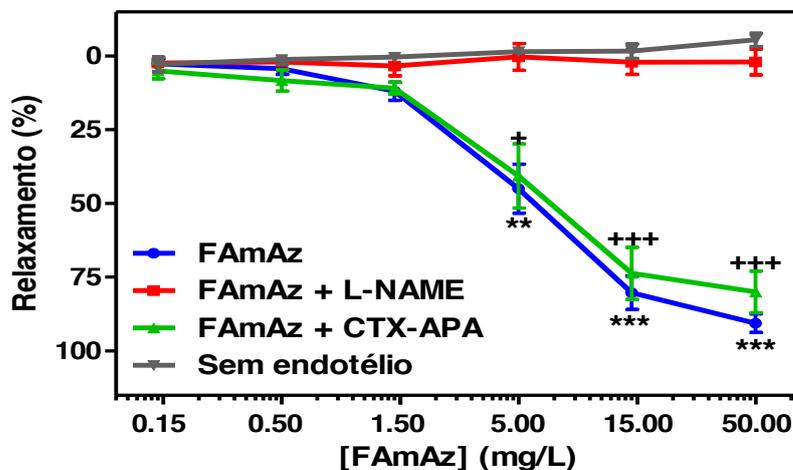


Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,7400$).

O gráfico 5 compara a atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* com a atividade vasodilatadora apresentada pela uso da mesma fração na presença de caribdotoxina mais apamina ou L-NAME, assim como após a remoção do endotélio.

Gráfico 5 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a ausência e presença de L-NAME (FAmAz + L-NAME) ou CTX-APA (FAmAz + CTX-APA), assim como após a remoção do endotélio.



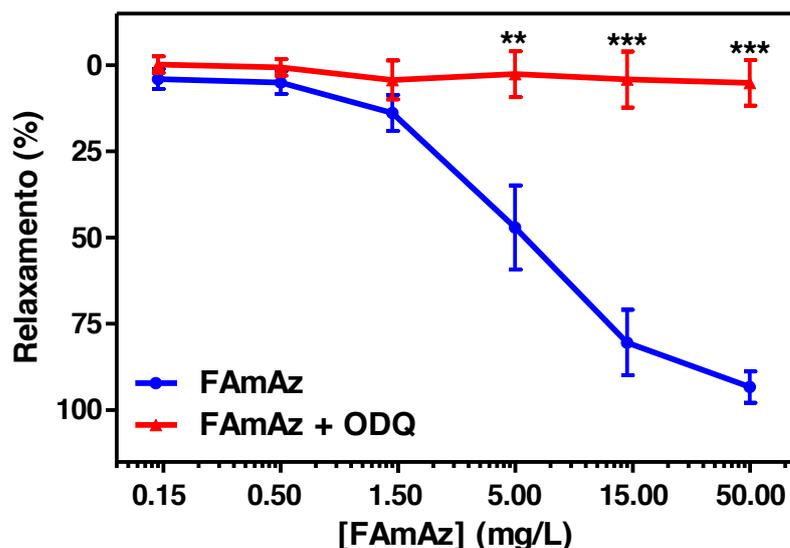
Fonte: Elaborado pelo autor.

** $P < 0,01$: FAmAz maior que FAmAz+L-NAME e sem endotélio; *** $P < 0,001$: FAmAz maior que FAmAz+L-NAME e sem endotélio; +++ $P < 0,001$: FAmAz+CTX-APA maior que FAmAz+L-NAME e sem endotélio.

4.5 Avaliação da participação da guanilato-ciclase solúvel na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso

A atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* foi reduzida significativamente após tratamento com ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel. Considerando o efeito relaxante, comparações foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, sendo verificadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 5,00 ($P = 0,0094$); 15,00 ($P = 0,0001$) e 50,00 ($P < 0,0001$) $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6).

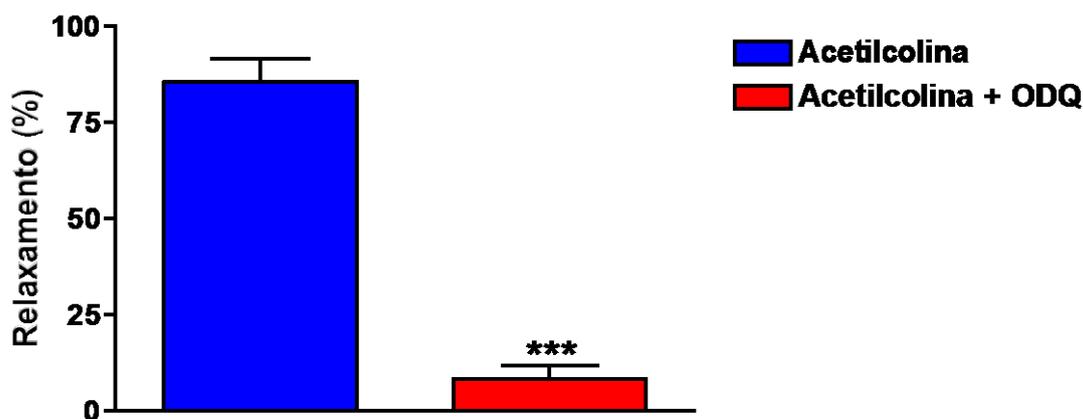
Gráfico 6 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de ODQ (FAmAz + ODQ).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Considerando o efeito relaxante, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 5,00 (** $P = 0,0094$); 15,00 (***) ($P = 0,0001$) e 50,00 (***) ($P < 0,0001$).

Gráfico 6A - Efeito de ODQ no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato.



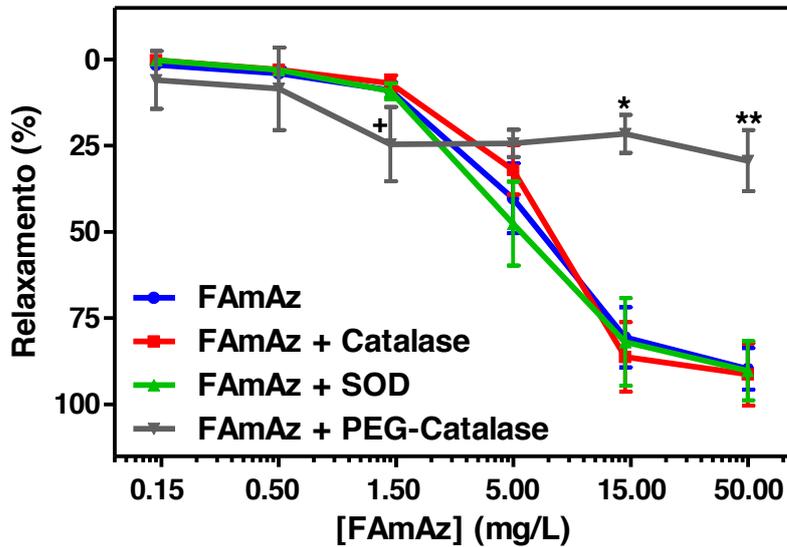
Fonte: Elaborado pelo autor.

Efeito de ODQ no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Houve uma diferença estatisticamente significativa (***) $P < 0,0001$.

4.6 Avaliação da participação das espécies reativas do oxigênio na atividade vasodilatadora produzida pelo extrato aquoso

A atividade vasodilatadora apresentada pela fração acetato de etila do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* não foi alterada com o uso da catalase ou da superóxido dismutase, mas foi inibida pelo uso da PEG-Catalase, um neutralizador intracelular das espécies reativas de oxigênio. As EC_{50} referentes à fração acetato de etila, à fração acetato de etila mais catalase, à fração acetato de etila mais superóxido dismutase e à fração acetato de etila mais PEG-Catalase foram, respectivamente, iguais a: 6,957 (IC95%: 3,583 a 13,500); 8,129 (IC95%: 3,976 a 16,620), 5,558 (IC95%: 2,415 a 12,790) e 0,509 (IC95%: 0,018 a 14,070). Comparando-se os valores da EC_{50} das quatro preparações, diferenças estatisticamente significativas não foram constatadas ($P = 0,6952$). Houve diferença estatisticamente significativa ao comparar a intensidade do relaxamento induzido pela fração acetato de etila com a preparação contendo PEG-catalase mais a fração acetato de etila nas concentrações 15 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$) (Gráfico 7).

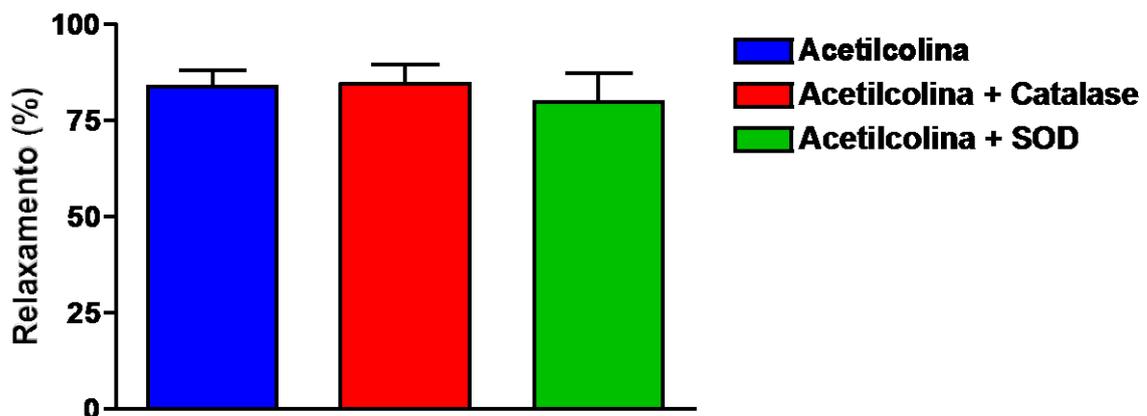
Gráfico 7 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, considerando a presença e ausência de catalase (FAmAz + Catalase), SOD (FAmAz + SOD) ou PEG-Catalase (FAmAz + PEG-catalase).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 (FAmAz), 6 (FAmAz + Catalase e FAmAz + SOD) e 2 (FAmAz + PEG-catalase) experimentos. +P < 0,05: FAmAz + PEG-Catalase maior que FAmAz, FAmAz + Catalase e FAmAz + SOD; **P < 0,01: FAmAz + PEG-Catalase menor que FAmAz, FAmAz + Catalase e FAmAz + SOD.

Gráfico 7A - Efeito de SOD e catalase no relaxamento induzido pela acetilcolina em anel de aorta de rato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

O presente projeto realizou a avaliação da atividade vasodilatadora de diferentes frações obtidas a partir do extrato aquoso de *Alpinia* em aorta isolada de rato.

Os resultados apresentados demonstraram que o extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet* apresentou atividade vasodilatadora dependente da concentração em aorta isolada de rato, com valor de $EC_{50} = 19,73 \mu\text{g/mL}$. De maneira semelhante, Moura *et al.* (2005) mostraram que um extrato hidroalcoólico da folha de *Alpinia zerumbet* apresentava atividade vasodilatadora em leito vascular mesentérico de rato, confirmando, assim, os dados do presente estudo. Esses pesquisadores demonstraram ainda que o extrato hidroalcoólico apresentou atividade anti-hipertensiva em ratos hipertensos tratados com acetato de desoxicorticosterona.

O efeito hipotensor do extrato hidroalcoólico da folha de *Alpinia zerumbet* foi demonstrado por Mendonça (1989). Nesse trabalho, o extrato foi capaz de induzir no rato uma queda de pressão sanguínea de maneira dose dependente, com doses variando de 10 a 30 mg/Kg.

Deve-se ressaltar que os métodos químicos de extração de compostos auxiliam na determinação das substâncias farmacologicamente ativas. O solvente hexano serve para separar os esteróides, os terpenos e as acetofenonas, enquanto o solvente diclorometano contém as lignanas, os flavonóides metoxilados, os sesquiterpenos, as lactonas, os triterpenos e as cumarinas. Finalmente, o solvente acetato de etila é utilizado para obter flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral (CECHINEL FILHO, 1998).

Dentre as frações avaliadas, obtidas do extrato aquoso total da planta *Alpinia zerumbet*, as frações acetato de etila e hexânica foram capazes de relaxar, significativamente, a aorta torácica isolada de rato, apresentando os respectivos EC_{50} 9,08 $\mu\text{g/mL}$ e 11,15 $\mu\text{g/mL}$, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as duas. A fração diclorometano não apresentou atividade vasodilatadora. Tendo em vista que as frações acetato de etila e hexânica apresentaram uma maior potência, deduziu-se que as mesmas contenham a maior parte dos compostos responsáveis pela atividade vasodilatadora do extrato aquoso total. No nosso estudo, escolhemos a fração acetato de etila para caracterização do mecanismo de ação da atividade vasodilatadora do extrato aquoso da planta *Alpinia zerumbet*. Estudos demonstram que a mesma contém elevadas quantidades de polifenóis, e acredita-se que seu efeito vasodilador seja devido pelo menos à presença desses compostos.

Compostos fenólicos são bem conhecidos como agentes antioxidantes (PROESTOS *et al.*, 2006) e são abundantemente encontrados em frutas e legumes, contribuindo para o seu sabor e coloração (PENNYCOOKE *et al.*, 2005). Elzaawely *et al.* (2007) identificaram seis compostos fenólicos nas flores e sementes da *Alpinia zerumbet* e atribuíram a atividade antioxidante das flores e das sementes aos compostos fenólicos. Em outro artigo, Elzaawely *et al.* (2007) demonstraram o aumento na quantidade de compostos fenólicos na fração acetato de etila do extrato obtido das folhas de *Alpinia zerumbet* expostas ao sulfato de cobre. Constatou-se ainda, nesse experimento, um aumento na atividade bactericida e antioxidante da planta, fenômeno que os autores atribuíram ao aumento dos compostos fenólicos. Ainda em 2007, os mesmos autores descreveram a composição da fração acetato de etila obtida do chá de folhas e rizomas da *Alpinia zerumbet* por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa: ácido p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, vanilina, ácido p-cumarínico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido benzoico, 2,3-dihidrobenzofurano, ácido benzenopropanóico, p-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, siringaldeído, ácido isoferúlico, dihidro-5,6-dihidrocavaina, 5,6-dihidrocavaina. Também foi descrito que o extrato de acetato de etila obtido do chá de folhas frescas apresentou menor atividade antioxidante que o extrato de acetato de etila obtido do chá de folhas das quais o óleo foi extraído, o qual contém a maior quantidade de compostos fenólicos.

Numerosos estudos demonstram que os polifenóis apresentam atividade vasodilatadora. Fitzpatrick *et al.* (1993) disseram que o extrato da casa de uvas vermelhas causou relaxamento de anéis aórticos intactos de ratos contraídos com fenilefrina. Tal relaxamento foi dependente da presença de endotélio e de óxido nítrico. Moura *et al.* (2002) demonstraram que administração oral de extrato de casca de uva, o qual é rico em polifenóis, reduziu significativamente a pressão arterial sistólica e diastólica em ratos Wistar com hipertensão induzida experimentalmente. Ndiaye *et al.* (2003, 2004) relataram que polifenóis do vinho tinto causaram dilatação, dependente de fator hiperpolarizante derivado do endotélio, em artéria coronariana de porcos. Posteriormente, Ndiaye *et al.* (2005) apresentaram que os compostos polifenólicos em vinho tinto induziram a ativação de via redox-sensível PI3-quinase/Akt em células endoteliais, causando fosforilação da NOS endotelial, o que resulta no aumento de produção de NO. Madeira *et al.* (2005) demonstraram que o extrato da casca de uva induziu vasodilatação em leito vascular mesentérico do rato, e este efeito vasodilatador dependente do endotélio está ligado a liberação de óxido nítrico e hiperpolarização da musculatura lisa vascular mesentérica. Por sua vez, Madeira *et al.* (2009) relataram que o extrato rico em polifenóis da casca da uva *V. labrusca* induziu potente

relaxamento de artéria coronariana de porco, por meio do incremento da formação do NO e também, de certa forma, do EDHF.

No presente projeto, procurou-se avaliar o mecanismo de ação da atividade vasodilatadora da fração acetato de etila, iniciando-se com a verificação da participação do endotélio no seu efeito vasodilatador. O endotélio exerce um papel determinante na regulação do tônus vascular, obtido pela ação de vasodilatadores (fator de hiperpolarização dependente do endotélio, óxido nítrico e prostaciclina) e de vasoconstritores, logo, em primeiro lugar, avaliou-se o papel do endotélio na atividade vasodilatadora produzida pela fração acetato de etila. De acordo com os resultados obtidos, a atividade vasodilatadora foi abolida após remoção do endotélio, o que sugere que o endotélio tem papel primordial na atividade vasodilatadora dessa fração. Utilizou-se como controle a acetilcolina para verificar a integridade do endotélio, e o SNP para verificar a integridade do músculo liso. Isto porque, na presença de acetilcolina, o endotélio produz NO, causando vasodilatação. Já o SNP libera NO independente da presença de endotélio, causando vasodilatação. De acordo com o nosso controle, o uso da acetilcolina comprovou que a preparação estava isenta de endotélio e o uso do SNP demonstrou que músculo liso permaneceu intacto, conforme observado no gráfico 2B.

A produção de óxido nítrico é de fundamental importância no relaxamento arterial dependente do endotélio. Procurando avaliar o seu papel na atividade vasodilatadora da fração acetato de etila, as preparações foram pré-tratadas com o L-NAME (N^G -nitro-L-arginina-metil-éster). Esta substância é um inibidor competitivo da enzima óxido nítrico sintase, impedindo assim a formação de óxido nítrico. Em preparações tratadas com L-NAME, a atividade vasodilatadora foi reduzida significativamente, o que sugere a participação do óxido nítrico na atividade vasodilatadora da fração acetato de etila. Moura *et al.* (2005) sugeriram que o extrato hidroalcoólico da folha de *Alpinia zerumbet* induziu vasodilatação dependente do endotélio e que essa não envolveu liberação de prostaciclina, ativação de receptor pela ACh, histamina ou epinefrina ou abertura de canais de potássio K_{ATP} , K_v ou K_{Ca} . O efeito dilatador foi provavelmente dependente da ativação da via NO-GMP cíclico.

Garthwaite *et al.* (1995) descreveram o composto ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-ona) como um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, enzima responsável pela formação do GMPc. Foi proposto que o ODQ atua ligando-se na porção heme da enzima (SCHRAMMEL *et al.*, 1996), o que foi confirmado posteriormente (ZHAO *et al.*, 2000). A inibição da atividade da guanilato ciclase solúvel dá-se devido à oxidação da forma ferrosa do sítio heme em espécies férricas, que são menos

sensíveis ao NO. O ODQ também oxida a hemoglobina, o que mostra que a reação não é específica à guanilato ciclase solúvel (ZHAO *et al.*, 2000). O efeito vasodilatador da fração acetato de etila foi inibido depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com ODQ, demonstrando que o mecanismo de ação depende do funcionamento adequado da enzima guanilato ciclase.

Em resposta a estímulos hormonais e físicos que acionam o influxo de cálcio, as células endoteliais modulam o tônus da musculatura lisa vascular, liberando fator de hiperpolarização dependente do endotélio, óxido nítrico e prostaciclina. A identidade química e o mecanismo de ação do fator de hiperpolarização dependente do endotélio ainda não foram esclarecidos. Uma teoria surge que o fator de hiperpolarização dependente do endotélio representa a hiperpolarização endotelial gerada pela ativação dos canais de potássio ativados por cálcio. Com isso, os canais endoteliais de potássio influenciariam na contração da musculatura lisa por reduzir o influxo de cálcio, via canais de cálcio operados por voltagem. Outra sugestão é que o fator de hiperpolarização dependente do endotélio é o produto da via do citocromo P450 que pode ativar canais de potássio ativados pelo cálcio de alta condutância na musculatura lisa vascular. A terceira teoria descreve a saída do potássio celular endotelial via canais de potássio ativados pelo cálcio de média e baixa condutância (COLEMAN *et al.*, 2004). Algumas substâncias são capazes de bloquear os canais de potássio ativados por cálcio. A apamina é uma neurotoxina que foi originalmente isolada da *Apis mellifera*. A apamina liga-se ao canal de baixa condutância de potássio ativado pelo cálcio e o inibe (HABERMANN, 1984). A caribdotoxina é uma toxina composta por 37 aminoácidos obtida do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* que bloqueia os canais de alta e intermediária condutância de potássio ativados por cálcio (LAURENT *et al.*, 1993).

Durante o experimento, depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com caribdotoxina e apamina, o efeito vasodilatador da fração acetato de etila permaneceu inalterado; o que sugere que o mecanismo de ação não está diretamente ligado a participação dos canais de potássio de alta, intermediária e baixa condutância ativados pelo cálcio, ou que a concentração de caribdotoxina e apamina usada não foi capaz de evitar a hiperpolarização causada pela acetilcolina.

Em nosso experimento, depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com a catalase e com a superóxido dismutase, enzimas que interferem na produção basal de ROS extracelular, o efeito vasodilatador da fração acetato de etila permaneceu inalterado, o que demonstra que o mecanismo de ação não é diretamente relacionado a participação de espécies reativas de oxigênio em nível extracelular. Entretanto, o efeito vasodilatador da fração acetato

de etila foi significativamente reduzido pela PEG-catalase, um inibidor das espécies reativas de oxigênio em nível intracelular, sugerindo a participação intracelular das espécies reativas de oxigênio no mecanismo de ação vasodilatador.

Em suma, a atividade vasodilatadora produzida pela fração acetato de etila do extrato aquoso da *Alpinia zerumbet* na aorta torácica de rato é dependente do endotélio e via NO-GMPc, possivelmente contando com a participação das espécies reativas do oxigênio ao nível intracelular. Tais achados sugerem o potencial uso clínico do extrato aquoso no combate à hipertensão arterial.

6 CONCLUSÃO

O extrato total obtido do chá das folhas da *Alpinia zerumbet* em anel aórtico isolado de ratos causa vasodilatação.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila e hexânica é superior ao efeito do extrato total e ao efeito da fração dicloro em anel aórtico isolado de ratos, sugerindo que os princípios ativos responsáveis pela atividade vasodilatadora estejam possivelmente nestas frações.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila e da acetilcolina foram inibidos pela remoção do endotélio, ao passo que o nitroprussiato de sódio causou vasodilatação mesmo depois da remoção do endotélio do anel aórtico isolado de rato, o que sugere que o efeito da fração acetato de etila seja dependente da existência de um endotélio intacto.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila foi inibido depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com L-NAME, demonstrando que o mecanismo de ação depende do funcionamento adequado da enzima óxido nítrico sintase endotelial.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila foi inibido depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com ODQ, demonstrando que o mecanismo de ação depende do funcionamento adequado da guanilato ciclase.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila permaneceu inalterado depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com caribdotoxina e apamina, o que sugere que o mecanismo de ação não está diretamente ligado a participação dos canais de potássio de condução intermediária e baixa ativados pelo cálcio.

O efeito vasodilatador da fração acetato de etila permaneceu inalterado depois do anel aórtico isolado de rato ter sido tratado com catalase e com superóxido dismutase. Entretanto, o efeito vasodilatador da fração acetato de etila foi significativamente reduzido pela PEG-catalase.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora, 1993.
- AMOROZO, M. C. M.; GELY, A. **Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas**. Barcarena: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1988, p. 47.
- ANSELM, E.; SOCORRO, V. F.; DAL-ROS, S.; SCHOTT, C.; BRONNER, C.; SCHINKERTH, V. B. *Crataegus* special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 53, n. 3, p. 253-260, 2009.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3rd ed. Oxford: Blackwell, 1994.
- BASSENGE, E.; HUCKSTORF, C.H. Endothelium-mediated control of coronary circulation. **Acta Cardiol.**, v. 46, p. 419-424, 1991.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 328-338, 2001.
- BÉNY, J. L.; VON DER WEID, P.Y. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, n. 1, p. 378-384, 1991.
- BEZERRA, M. A. C. **Alpinia speciosa Schum**: estudo das frações fixas e do óleo essencial. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.
- BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M. C. Myorelaxant and antipasmotic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Pytother. Res.**, v. 14, n. 7, p. 549-551, 2000.
- BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 23 abr. 2009.
- BRINKER, F. **Herb contraindications and drug interactions**. 2nd ed. Sandy, OR: Eclectic Medical Publications, 1998.
- BROWN, R.G. Toxicity of Chinese herbal remedies. **Lancet**, v. 340, p. 673, 1992.
- BUSSE, R.; MULSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokine in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett.**, v. 275, p. 87- 90, 1990.
- CAI, H.; LI, Z.; DAVIS, M.E.; KANNER, W.; HARRISON, D.G.; DUDLEY JR, S.C. Akt-dependent phosphorylation of serine1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the

endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. **Mol. Pharmacol.**, v. 63, p. 325–331, 2003.

CECHINEL, FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quím. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, G.; SUZUKI, H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization in arterial smooth muscle cells of the rat. **J. Physiol.** (London), v. 421, p. 521-534, 1989.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, p. 641–649, 2004.

CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e IBDF, 1975.

CORRIU, C.; FÉLÉTOU, M.; CANET, E.; VANHOUTTE, P.M. Inhibitors of the cytochrome P-450-monooxygenase and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig isolated carotid artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, p. 607-610, 1996.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: Veloso, 1965.

CUPP, M. J. **Toxicology and clinical pharmacology of herbal products**. Totowa: Humana Press, 2000.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the Monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2. Drug interactions. **Adverse Drug React. Toxicol. Rev.**, v. 12, p. 147-162, 1993.

DE POOTER, H. L.; ABOUTABL, E. A.; EL-SHABRAWY, A. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa* (J. C. Wendl.) K. Schum, grown in Egypt. **Flavour Fragrance J.**, v. 10, n. 2, p. 63-67, 1995.

DE SMET, P.A. Health risks of herbal remedies. **Drug Saf.**, v. 13, p. 81-93, 1995.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, p. 601–605, 1999.

DREW, A.; MYERS, S.P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **Med. J. Aust.**, v. 166, p. 538-541, 1997.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; KOYAMA, H.; TAWATA, S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. **Food Chem.**, v. 104, p. 1648–1653, 2007.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. leaves exposed to copper sulphate. **Environ. Exp. Bot.**, v. 59, p. 347–353, 2007.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 103, p. 486–494, 2007.

EMILIANO, A. F.; CARVALHO, L. C. R. M.; RESENDE, A. C.; SOUZA, M. A. V.; RUBENICH, L. M. S.; PIMENTEL, A. M. L.; BELARMINO, R. S.; MOURA, R. S. Endothelium Dependent Vasodilator Effect of Hidroalcoholic Extracts of *Alpinia zerumbet* (Colônia). *In: Latinamerican Congress of Pharmacology*, 16., 2000, Aguas de Lindoia. **From new molecules to new methods for health and knowledge in the beginning of a new millennium**. Aguas de Lindoia, 2000. v. 1. p. 220-222.

FARNSWORTH, N. R. Relative safety of herbal medicines. **Herbal Gram.**, v. 29, p. 36A-36H, 1993.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

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

FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B. E.; BUSSE, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ. Res.**, v. 88, p. E68–E75, 2001.

FUJITA, H.; YAMASHITA, M. The constituents of the essential oil from *Alpinia speciosa* K. **Schum.Yakugakuzasshi**, v. 93, n. 12, p. 1635-1638, 1973.

FULTON, D.; GRATTON, J. P.; MCCABE, T. J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T. F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, p. 597–601, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; JOTHIANANDAN, D. Endothelium-dependent and –independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. **J. Vasc. Res.**, v. 28, n. 1/3, p. 52-61, 1991.

FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

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

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAY, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive 2⁺⁺guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, v. 48, p.184-188, 1995.

GOLDMAN, P. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. **Ann. Intern. Med.**, v. 135, p. 594-600, 2001.

HABERMANN, E. Apamin. **Pharmacol. Therap.**, v. 25, n. 2, p. 255-270, 1984.

HAYNES, M. P.; SINHA, D.; RUSSELL, K. S.; COLLINGE, M.; FULTON, D.; MORALES-RUIZ, M.; SESSA, W.C.; BENDER, J. R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 87, p. 677-682, 2000.

ITOKAWA, H.; WATANABLE, K.; MIHASHI, S.; ITAKA, Y. Isolation of agarofuran-type sesquiterpenes from *Alpinia japonica* (Thunb). **Miq. Chem. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 2, p. 681-682, 1980.

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A pungent diarylheptanoid from *Alpinia oxyphylla*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 769-711, 1981.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHIBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 2, p. 387-391, 1992.

KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **Am. J. Bot.**, v. 89, n. 10, p. 1682-1696, 2002.

KRISHNA, B. M.; CHAGANTY, R. B. Cardamonin and alpinetin from the seeds of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 238, 1973.

LAINETTI, R.; BRITO, N. R. S. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1980.

LARANJA, S. M. R.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Avaliação de três plantas com potencial efeito diurético. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 38, n. 1, p. 13-16, 1992.

LAURENT, F.; MICHEL, A.; BONNET, P.A.; CHAPAT, J.P.; BOUCARD, M. Evaluation of the relaxant effects of SCA40, a novel charybdotoxin-sensitive potassium channel opener, in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, n. 3, p. 622-626, 1993.

LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M., PAULO, M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, p. 333-336, 1993.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. São Paulo: Plantarum, 1995.

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 87-104, 1995.

LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. Essential oils of some Amazonian zingiberaceae, 3 genera alpinia and rengalmia. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 5, p. 907-908, 1984.

MACHADO, L. D. Alpinia. **Revista Natureza**, v. 101, n. 5, p. 39-42, 1996.

MADEIRA, S.V.F.; RESENDE, A.C.; OGNIBENE, D.T.; SOUSA, M.A.V.; MOURA, R.S. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. **Pharmacol. Res.**, v. 52, p. 321–327, 2005.

MADEIRA, S.V.F.; AUGER, C.; ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M.; CHATAIGNEAU, T.; MOURA, R.S.; SCHINI-KERTH, V.B. eNOS Activation Induced by a Polyphenol-Rich Grape Skin Extract in Porcine Coronary Arteries. **J. Vasc. Res.**, v. 46, p. 406–416, 2009.

MENDONÇA, V. L. M. **Estudo farmacológico e toxicológico de Alpinia speciosa Schum.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1989.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTELES, M. C. L. Pharmacological and toxicological evaluation of Alpinia speciosa. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, supl. 2, p. 93-97, 1991.

MICHELL, B. J.; GRIFFITHS, J. E.; MITCHELHILL, K. I.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; TIGANIS, T.; BOZINOVSKI, S.; DE MONTELLANO, P. R.; KEMP, B. E.; PEARSON, R. B. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 845–848, 1999.

MILLS, S.; BONE, K. **Principles and practice of phytotherapy**: modern herbal medicine. Toronto: Churchill Livingstone, 2000.

MOLHO-SABATIER, P. Endothelium et thrombose. **Rev. Méd. Intern.**, v. 8, p. 389-394, 1987.

MOMBOULI, J. M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 252-256, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression**: a practical guide to curve fitting. San Diego: Graphpad Software, 2003.

MOURA, R.S.; COSTA VIEIRA, F.S.; SOUZA, M.A.V.; KOVARY, K.; GUEDES, D.C.; OLIVEIRA, E.P.B.; RUBENICH, L.M.S.; CARVALHO, L.C.R.M.; TANO, T.; CORREIA,

M.L.G. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, p. 1515–1520, 2002.

MOURA, R.S.; EMILIANO, A.F.; DE CARVALHO, L.C.; SOUZA, M.A.; GUEDES, D.C.; TANO, T.; RESENDE, A.C. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 288-294, 2005.

MPALANTINOS, M. A.; DE MOURA, R. S.; PARENTE, J. P.; KUSTER, R. M. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 442–444, 1998.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J. C.; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 310, p. 371–377, 2003.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH VB: Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 1131–1136, 2004.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, M.; LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V.B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **FASEB J.**, v. 19, p. 455–457, 2005.

NEEDLEMAN, P.; JAKSCHIK, B.; JOHNSON, E.M.JR. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 187, n. 2, p. 324-331, 1973.

OLANREWAJU, H. A.; HARGITTAI, P. T.; LIEBERMAN, E. A.; MUSTAFA, S. J. Role of endothelium in hyperpolarization of coronary smooth muscle by adenosine and its analogues. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, n. 2, p. 234-239, 1995.

PENNYCOOKE, J. C.; COX, S.; STUSHNOFF, C. Relationship of cold acclimation total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). **Environ. Exp. Bot.**, v. 53, p. 225–232, 2005.

PETERSSON, J.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, n. 7, p. 1344-1350, 1997.

PETROVICK, P. R. Normatização da Indústria Fitofarmacêutica. *In*: REUNIÓN DE COORDINACIÓN INTERNACIONAL, 1., 1996, Antigua-Guatemala. **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)**. Antigua-Guatemala: Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO), 1996. p. 91-93.

PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Cienc. Cult.**, v. 49, p. 364-369, 1997.

PINHO, F. V. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F., LEAL-CARDOSO, J. H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, p. 482-486, 2005.

POOTER, H. L.; OMAR, M. N.; COOLSAET, B. A.; SCHAMP, N. M. The essential oil of greater galanga (*Alpinia galanga*) from Malaysia. **Phytochemistry**, v. 24, p. 93-96, 1985.

PRANCE, G.T. **Out of the Amazon**. London: HMSO, 1992.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I.S.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chem.**, v. 95, p. 664-671, 2006.

PRUDENTE, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; MICHEL, G.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atouman from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum). **J. Essent. Oil Res.**, v. 5, n. 3, p. 255-264, 1993.

RANDALL, M. D.; ALEXANDER, S. P.; BENNETT, T.; BOYD, E. A.; FRY, J. R.; GARDINER, S. M.; KEMP, P. A.; MCCULLOCH, A. I.; KENDALL, D. A. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 229, n. 1, p. 114-120, 1996.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 746-752, 1990.

RUBANYI, M.; VANHOUTTE, P. M. *In: VANHOUTTE, P. M. (Ed.). Relaxing and contracting factors: biological and clinical research*. Clifton: The Humana Press, 1988. p. 91-105.

SANTANA, C. F.; PINTO, K. V.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Estudos farmacológicos de antiinflamatórios de alguns vegetais. **Rev. Inst. Antibióticos**, v. 6, n. ½, p. 75-89, 1996.

SCHRAMMEL, A.; BEHRENDTS, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, v. 50, p. 1-5, 1996.

SZASZ, T.; THAKALI, K.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, p. 27-37, 2007.

THOMAS, S.R.; CHEN, K.; KEANEY JR, J.F. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 6017-6024, 2002.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. (Ed.). **Pharmacognosy**. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998.

TOMLINSON, P. B. Commelinales - Zingiberales. *In*: METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1969. p. 341-359.

VANDERLINDE, F. A. **Ação hipotensora e outras atividades farmacológicas do extrato aquoso da *Alpinia speciosa* Schum (colônia)**. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, 1990.

VANE, J. R.; ANGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P. M. The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. **N. Engl. J. Med.**, v. 319, p. 512-513, 1988.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Eur. Heart J.**, v. 18, p. E19-E29, 1997.

VRINTS, G.; HERMAN, A.G. Role of the endothelium in the regulation of coronary artery tone. **Acta Cardiol.**, v. 46, p. 399-418, 1991.

WINTERS, G. Jardinagem - Zingiberáceas. **Rev. Natureza**, v. 91, n. 7, p. 14-23, 1995.

ZHAO, Y.; BRANDISH, P. E.; DIVALENTIN, M.; SCHELVIS, J. P.; BABCOCK, G. T. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, p. 10848-10854, 2000.

ZYGMUNT, P. M.; HOGESTATT, E. D. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 7, p. 1600-1606, 1996.

APÊNDICE A

TABELA 1 – Efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso (EaAz) e das frações acetato de etila (FAMAz), hexânica (FHxAz) e diclorometano (FDmAz) de *Alpinia zerumbet* em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento.

[mg/L]	EaAz (n=5)		FAMAz (n=7)		FHxAz (n=5)		FDmAz (n=6)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0,15	6,568	1,209	2,823	0,724	7,128	2,954	4,323	1,451
0,50	7,684	1,685	6,066	2,278	9,318	2,693	10,383	3,834
1,50	17,196	5,805	12,103	3,912	14,528	3,282	10,532	3,059
5,00	26,006	6,997	34,567	3,732	27,366	6,740	12,260	2,736
15,00	55,616	9,758	66,691	5,818	52,578	9,718	13,553	3,590
50,00	85,974	6,518	84,800	6,044	68,036	8,205	18,668	4,831

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 2 – Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e a ausência do endotélio vascular (Sem endotélio). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos. Para cada concentração, comparações entre as preparações com a fração FAmAz com e sem endotélio foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		Sem endotélio		Significância (valor P)
	Média	EPM	Média	EPM	
0,15	3,010	2,281	2,880	2,502	0,9706
0,50	6,978	3,675	1,233	1,641	0,2034
1,50	12,980	4,549	0,323	0,386	0,0323
5,00	53,225	10,508	-1,425	0,999	0,0021
15,00	81,530	7,675	-1,613	2,418	P<0,0001
50,00	88,358	4,631	-5,468	2,273	P<0,0001

Fonte: Elaborado pelo autor..

TABELA 3 – Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência de L-NAME (FAmAz + L-NAME). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos. Para cada concentração, comparações entre FAmAz e FAmAz + L-NAME foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		FAmAz + L-NAME		Significância (valor P)
	Média	EPM	Média	EPM	
0,15	2,886	3,275	2,398	1,433	0,8948
0,50	2,886	3,183	2,054	1,356	0,8160
1,50	11,802	5,886	3,358	3,299	0,2461
5,00	40,354	12,470	0,304	4,529	0,0166
15,00	77,250	10,956	2,130	4,129	0,0002
50,00	92,736	5,532	2,014	4,423	P<0,0001

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 4 – Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência de CTX-APA (FAmAz + CTX-APA). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 5 experimentos. Para cada concentração, comparações entre FAmAz e FAmAz + CTX-APA foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		FAmAz + CTX-APA		Significância (valor P)
	Média	EPM	Média	EPM	
0,15	4,248	3,434	5,062	2,599	0,8548
0,50	6,608	3,476	8,328	3,636	0,7412
1,50	11,762	4,425	10,950	2,029	0,8717
5,00	45,714	15,850	40,668	10,861	0,7995
15,00	78,362	11,421	73,702	8,871	0,7555
50,00	87,274	4,885	79,982	7,041	0,4195

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 5 – Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a ausência e presença de L-NAME (FAmAz + L-NAME) ou CTX-APA (FAmAz + CTX-APA), assim como após a remoção do endotélio vascular. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 11 (FAmAz), 5 (FAmAz + L-NAME e FAmAz + CTX-APA) e 4 (Sem endotélio) experimentos. Para cada concentração, comparações entre os tratamentos foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey para verificar diferenças entre os compostos dois a dois.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		FAmAz + L-NAME		FAmAz + CTX-APA		Sem endotélio	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0,15	2,647	1,609	2,398	1,433	5,062	2,599	2,880	2,502
0,50	4,302	1,931	2,054	1,356	8,328	3,636	1,233	1,641
1,50	11,956	3,078	3,358	3,299	10,950	2,029	0,323	0,386
5,00	44,995	8,279	0,304	4,529	40,668	10,861	-1,425	0,999
15,00	80,308	5,680	2,130	4,129	73,702	8,871	-1,613	2,418
50,00	90,615	3,192	2,014	4,423	79,982	7,041	-5,468	2,273

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 6 – Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência de ODQ (FAmAz + ODQ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Para cada concentração, comparações entre FAmAz e FAmAz + ODQ foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		FAmAz + ODQ		Significância (valor P)
	Média	EPM	Média	EPM	
0,15	4,012	2,901	-0,153	2,379	0,2929
0,50	5,015	3,360	0,653	2,379	0,3143
1,50	13,852	5,225	4,273	5,645	0,2414
5,00	47,082	12,204	2,598	6,627	0,0094
15,00	80,440	9,497	4,158	8,144	0,0001
50,00	93,345	4,558	5,122	6,614	P<0,0001

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 7 - Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alpinia zerumbet* (FAmAz) em anel de aorta de rato submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a ausência e presença de catalase (FAmAz + Catalase), SOD (FAmAz + SOD) ou PEG-catalase (FAmAz + PEG-catalase). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 (FAmAz), 6 (FAmAz + Catalase e FAmAz + SOD) e 2 (FAmAz + PEG-catalase) experimentos.

[FAmAz] (mg/L)	FAmAz		FAmAz+Catalase		FAmAz+SOD		FAmAz+PEG-Catalase	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0,15	1,563	0,933	0,198	0,198	0,170	0,170	5,930	5,930
0,50	3,995	1,595	2,890	0,615	3,048	0,585	8,475	8,475
1,50	8,860	2,298	6,857	2,237	9,167	2,332	24,560	7,640
5,00	40,235	10,161	31,980	7,166	47,575	12,170	24,330	2,790
15,00	80,550	8,689	86,200	10,088	81,915	12,711	21,555	3,865
50,00	89,703	6,010	91,322	9,043	90,247	8,577	29,335	6,255

Fonte: Elaborado pelo autor.