



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1107282-2 A2

(22) Data do Depósito: 20/05/2011

(43) Data da Publicação: 27/02/2018



(54) Título: USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE PEPEROMIA PELLUCIDA L. (H. B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE

(51) Int. Cl.: A61K 36/67; A61P 9/08

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

(72) Inventor(es): ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; JOSÉ GEORGE FERREIRA DE ALBUQUERQUE; SIMONE SETTE LOPES; ALMIR GONÇALVES WANDERLEY; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS; THAYS CRISTIANE BARBOSA DE LUCENA GOMES

(57) Resumo: USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE Peperomia pellucida L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE A presente patente de invenção refere-se ao uso de extratos etanólico e aquoso liofilizados de Peperomia pellucida (L.) H.B.K. como agentes vasorrelaxante. Foram realizadas análises sobre o sistema cardiovascular de animais, avaliando, in vitro, o efeito dos extratos etanólico e aquoso de P. pellucida em artéria mesentérica superior isolada através da medida de tensão isométrica. Foi demonstrado que os extratos etanólico e aquoso de P. pellucida apresentaram atividade vasorrelaxante sobre estes anéis mesentéricos.

USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE

A presente patente de invenção refere-se ao uso de extratos etanólico e aquoso liofilizados de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. como agente vasorrelaxante. Foram realizadas análises sobre o sistema cardiovascular de ratos, avaliando *in vitro*, o efeito dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em artéria mesentérica superior isolada de rato através da medida de tensão isométrica. Foi demonstrado que os extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* apresentaram atividade vasorrelaxante sobre estes anéis mesentéricos.

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-350 gramas, com idade entre 10 a 14 semanas e mantidos em caixas de plástico sob ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, tendo livre acesso à alimentação e água, conforme recomendações internacionais.

Foram testados os extratos etanólico e aquoso liofilizados de *P. pellucida* representados respectivamente pela siglas EEPP e EAPP.

Para o extrato aquoso, foi preparada uma infusão, conforme uso popular, adicionando 0,5 L de água quente sobre 300-500 g da planta inteira.

Para a obtenção do extrato etanólico seco da *P. pellucida*, o material vegetal fresco, após a limpeza foram deixadas 3-5 dias secando à temperatura ambiente e levadas, para finalização da secagem, em estufa de fluxo de ar contínuo (40-50°C). O material vegetal foi triturado e submerso em solvente etanol à 50-80%, seguindo-se a extração por maceração. A amostra foi filtrada em papel de filtro e armazenada em frasco de vidro.

Os extratos aquoso e etanólico foram liofilizados.

Durante a realização dos experimentos farmacológicos, foram utilizadas os fármacos tiopental sódico, sal sódico de heparina, nitroprussiato de sódio, cloridrato de L (-) fenilefrina e cloridrato de acetilcolina.

Os extratos etanólico e aquoso foram inicialmente pesados em balança analítica e, em seguida, foram triturados em cápsula de porcelana com ajuda de um pistilo e solubilizados em água destilada para obtenção de uma solução com aspecto homogêneo. A partir desta solução-mãe, foram obtidas outras soluções de concentrações menores por meio de diluições em água destilada.

Nos protocolos *in vitro*, foram utilizadas soluções nutritivas (pH=7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37°C.

Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizados solução de Tyrode (mM): NaCl 158,3; KCl 4,0; CaCl₂.2H₂O 2,0; MgCl₂.6H₂O 1,05; C₆H₁₂O₆ 5,6; NaHCO₃ 10,0; NaH₂PO₄.H₂O 0,42. Na preparação da solução despolarizante de Tyrode, o KCl foi elevado para 50-70 mM e o NaCl foi isosmoticamente alterado para 60-70 mM.

Para realização dos estudos farmacológicos *in vitro*, foi utilizado o modelo de banho de órgão isolado com artéria mesentérica superior isolada de rato para obtenção de medidas de tensão isométrica.

Para a realização dos experimentos, inicialmente os animais foram eutanasiados e, em seguida, foi realizada uma incisão em seu abdome para identificação e retirada do segmento de artéria mesentérica superior, posteriormente, foi retirado todo o tecido conectivo e adiposo e então seccionada em anéis com comprimento de 1 – 2 mm. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37°C e gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio) onde foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição, para o registro de tensões isométricas.

Antes da realização dos protocolos, as preparações foram mantidas a uma tensão de 0,70 – 0,80 g por um período de estabilização de 1 hora, sendo a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos para retirada de qualquer metabólito interferente.

A presença do endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de acetilcolina (ACh, 8-12 μM). Foram considerados com endotélio, os anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 8-12 μM) que apresentaram relaxamento com ACh (8-12 μM) superior a 90%. Já para realização dos experimentos na ausência do

endotélio funcional, os anéis foram submetidos a um leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal, e seus relaxamentos induzidos por ACh (8-12 μ M) em anéis pré-contraídos com FEN (8-12 μ M) deveriam ser inferiores a 10%. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% tiveram seu endotélio novamente removido e
5 confirmado como acima descrito.

Inicialmente, foi avaliada sua atividade vasorelaxante frente contrações induzidas por FEN. O experimento teve início após a estabilização das preparações por um período de 50 minutos. Concentrações crescentes dos extratos de *P. pellucida*, etanólico e aquoso, foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (8-12
10 μ M). O possível efeito vasorelaxante induzido pelos diferentes extratos foi avaliado em anéis com endotélio funcional intacto e em anéis com endotélio mecanicamente removido. Em ambas as preparações, a concentração de FEN (8-12 μ M) foi ajustada para obter contrações de magnitude semelhante.

Foi desenvolvido um protocolo para avaliar os efeitos induzidos, tanto pelo
15 extrato etanólico quanto pelo extrato aquoso de *P. pellucida*, em anéis mesentéricos pré-contraídos com um agente contraturante diferente cujo mecanismo de ação para gerar aumento de tensão difere do induzido por fenilefrina. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os diferentes extratos foram adicionados cumulativamente, em experimentos separados, aos anéis pré-contraídos
20 com solução de Tyrode KCl 50-70 mM. A percentagem de relaxamento induzida pelos extratos foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição dos extratos.

Os valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Foram utilizados, quando necessário, os testes *t* de Student e análise de variância "one way" (ANOVA) seguida de Bonferroni, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados
25 significantes. Para estudar os efeitos vasorelaxante induzidos pelos extratos de *P. pellucida*, o parâmetro farmacológico $E_{m\acute{a}x}$ (resposta máxima induzida pela substância) foi analisado. A análise dos dados foi realizada através de um programa computacional.

O extrato aquoso de *P. pellucida* (EAPP), nas concentrações entre entre 1 e 500 μ g/mL, induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria
30 mesentérica superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina 8-12 μ M. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ obtidos a partir das curvas concentração-

resposta de EAPP em anéis com e sem endotélio, não apresentaram diferença estatisticamente significativa (n=5).

O extrato etanólico de *P. pellucida* (EEPP), nas concentrações entre 1 e 500 ug/mL), induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina 8-12 μ M. A curva concentração-resposta para EEPP em anéis com endotélio funcional, não apresentou alterações nos valores de $E_{max} = 38 \pm 6,9$ (n=5) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN $E_{max} = 20,3 \pm 13,7$ (n=6).

Os extratos aquoso (EAPP) e etanólico (EEPP) de *P. pellucida*, nas concentrações entre 1 e 500 ug/mL, induziram vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio, pré-contraídos com KCl 50-70 mM. A curva concentração-resposta em anéis sem endotélio funcional apresentou maior efeito máximo ($E_{max} = 60,8 \pm 6,4$ - n=6) para EEPP quando comparado ao efeito máximo obtido na presença do EAPP ($E_{max} = 25 \pm 6,4$ - n=6).

Nos experimentos de reatividade vascular, foi observado efeito vasorrelaxante tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com Fenilefrina. Este protocolo foi realizado em anéis com e sem endotélio vascular e não houve alteração significativa do vasorrelaxamento observado para ambos os extratos. Assim, os resultados indicam que o endotélio vascular exerce pouca influência na atividade vasorrelaxante induzida pelos extratos.

Com o objetivo de estudar os efeitos vasorrelaxantes frente a um outro modelo de indução de contração vascular, foi utilizado o agente despolarizante KCl (50-70 mM). Esses experimentos foram realizados na ausência de endotélio vascular, pois sua participação não foi significativamente importante para a promoção de relaxamento, como demonstrado no protocolo experimental anterior.

Foi observado em anéis de artéria mesentérica superior um efeito vasorrelaxante com eficácia muito superior, comprovada pelos valores de E_{max} , quando comparados com os resultados obtidos nos experimentos com FEN, mais especificamente o efeito

relaxante induzido pelo extrato etanólico (cerca de 60% de relaxamento) que foi significativamente maior do que o efeito relaxante induzido pelo extrato aquoso.

Contrações induzidas por altas concentrações de K^+ , nas células de músculo liso, são mediadas por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio voltagem dependentes (Ca_v). No entanto, a geração da contração por agonista de receptores acoplados a proteína Gq/11 (ex. FEN), em células de músculo liso, é resultado da mobilização de Ca^{2+} de ambos os espaços intracelular e extracelular. Esse tônus induzido por solução despolarizante com alta concentração de K^+ é mediado inteiramente pelos canais Ca_v . Os canais Ca_v desempenham papel central na regulação do tônus vascular. A hiperpolarização promove fechamento destes canais, levando à vasodilatação, já a despolarização induz a abertura dos mesmos, resultando em vasoconstrição. Baseados nesses dados, a maior eficácia do extrato etanólico em relaxar os anéis de artéria pré-contraídos com KCl, quando comparada à eficácia do extrato aquoso, sugere uma maior capacidade em diminuir a concentração intracelular de Ca^{2+} possivelmente por inibir a abertura dos Ca_v .

REIVINDICAÇÕES**USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE**

- 5 1. **USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE**, caracterizado pelos efeitos vasorelaxantes destes extratos, em anéis de artéria mesentérica superior isolada.
- 10 2. **USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar efeito vasorrelaxante tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato aquoso em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com Fenilefrina. Este protocolo foi realizado em anéis com e sem endotélio vascular e não houve alteração significativa do vasorrelaxamento observado para ambos os extratos.
- 15 3. **USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por apresentar maior eficácia do extrato etanólico em relaxar os anéis de artéria pré-contraídos com KCl, quando comparada à eficácia do extrato aquoso, sugerindo uma maior capacidade do extrato etanólico em diminuir a concentração intracelular de Ca^{2+} possivelmente
20 por inibir a abertura dos C_{av} .

RESUMO**Patente de invenção: USO DE EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.) COMO AGENTE VASORRELAXANTE**

A presente patente de invenção refere-se ao uso de extratos etanólico e aquoso
5 liofilizados de *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. como agentes vasorrelaxante. Foram
realizadas análises sobre o sistema cardiovascular de animais, avaliando, *in vitro*, o
efeito dos extratos etanólico e aquoso de *P. pellucida* em artéria mesentérica superior
isolada através da medida de tensão isométrica. Foi demonstrado que os extratos etanólico
e aquoso de *P. pellucida* apresentaram atividade vasorrelaxante sobre estes anéis
10 mesentéricos.