



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade

Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelilla* e seu principal constituinte, 1-nitro-2-feniletano, em ratos espontaneamente hipertensos

Recife

2011

Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade

Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelilla* e seu principal constituinte, 1-nitro-2-feniletano, em ratos espontaneamente hipertensos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Glória Isolina B. P. Duarte

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

Recife

2011

Andrade, Leylliane de Fátima Leal Interaminense de

Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de Aniba canelilla e seu principal cosntituente, 1-nito-2-feniletano, em ratos espontaneamente hipertensos/ Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade. – Recife: O Autor, 2011.

188 folhas : il., fig., tab.

Orientadores: Glória Isolina B. P. Duarte

Mohammed Saad Lahlou

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2011

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais 2. Farmacologia Cardiovascular 3. Hipertensão vascular I. Título.

615.537

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-242

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: de ANDRADE, Leylliane de Fátima Leal Interaminense

Título: Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelêla* e seu principal constituinte, 1-nitro-2-feniletano, em ratos hipertensos

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 03/10/11

Banca Examinadora

Prof. Dr. Benedito Honório Machado

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Instituição: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dr^a. Maria Bernadete de Souza Maia

Instituição: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Instituição: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará

Assinatura: _____

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

Instituição: Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos amores da minha vida, **Gustavo e Fábio** pela compreensão nos momentos em que estive ausente realizando este trabalho e pela grande felicidade que vocês propiciam a minha vida, amo vocês.*

*A você **Pedro** que já traz tanta felicidade a nossas vidas, saiba que você já é muito amado.*

*Aos meus pais, **José Henrique e Conceição**, que sempre me proporcionaram plenas condições para atingir meus objetivos, obrigada por tudo meus amores.*

*Aos meus irmãos **Leonardo e Lívia** que amo tanto.*

*A minha segunda mãe **Luiza Regina da Silva**, que me propicia tanta tranquilidade pela sua presença constante em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr^a. Glória Isolina Boente Pinto Duarte e Prof. Dr. Saad Lahlou pela confiança depositada em mim nesses vários anos de convivência e pela grande contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia por ter cedido o óleo o que possibilitou a execução desse trabalho.

A minha amiga Fernanda Elizabeth que tanto me ajudou na construção desse trabalho.

As amigas Juliana Dantas e Luciana Veloso pela intensa felicidade e alegria fazendo com que os dias fossem sempre leves.

Ao meu amigo Odair Alves pela disponibilidade e amizade, sempre presente em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular e de Reatividade Vascular: Diego de Queiroz, Juliana Rocha, Manuela Millet, Raíza Landim, Thayane Rebeca, Thaíse Figueiredo, Thayanne Cavalcanti e Marcelo Rocha pelo carinho, amizade e incentivo.

Ao técnico de laboratório, José Antônio Albuquerque pela amizade.

A grande amiga Tereza Helena que me deu todo o suporte para que eu pudesse me ausentar várias vezes do meu ambiente de trabalho.

Aos professores do Departamento de Nutrição da UFPB pela flexibilidade que a mim foi fornecida para a execução deste trabalho.

A todos amigos e familiares que direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo desta caminhada.

Muito Obrigada,

Leylliane Leal

“Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

de ANDRADE, LFLI. Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelilla* e seu principal constituinte, 1-nitro-2-feniletano, em ratos espontaneamente hipertensos. 2011. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Este estudo investigou os possíveis mecanismos dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial da *Aniba canelilla* (OEAC) e seu principal constituinte o 1-nitro-2-feniletano (NF) em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs). Para tal, foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*. Ratos machos SHRs foram submetidos a cirurgia para implantação dos cateteres na artéria aorta e veia cava inferior. Para os estudos de reatividade vascular os animais foram sacrificados e a artéria mesentérica superior foi isolada. Os anéis foram mantidos em cubas com solução Krebs-Henseleit, (37°C) e gaseificada com carbogênio. Em ratos anestesiados, injeções intravenosas (i.v.) em bolus do OEAC (1-20 mg/kg) ou NF (1-10 mg/kg) induziram efeitos hipotensor e bradicardizante, dose-dependentes, que foram caracterizados em dois períodos (fase 1 e 2). O componente rápido (fase 1) da resposta hipotensora e bradicardizante induzido pelo OEAC e NF, ambos na dose de 10 mg/kg, foi ausente após a administração direta no ventrículo esquerdo. A fase 1 foi também abolida após a bivotomia ou pelo tratamento perineural dos nervos vagos com capsaicina (250 µg/mL). No entanto, a fase 1 permaneceu inalterada pelo pré-tratamento i.v. com capsazepina (1 mg/kg) ou ondasetron (30 µg/kg). Em ratos acordados, o NF (5 e 10 mg/kg) induziu efeitos hipotensor e bradicardizante rápidos (fase 1) que foram completamente abolidos pelo pré-tratamento com metilatropina (1 mg/kg, i.v.). Nas concentrações de 0,1-1000 µg/mL, o OEAC e o NF induziram um relaxamento reversível e concentração-dependente nas preparações isoladas de artéria mesentérica pré-contraídas com KCl (75 mM) com a IC₅₀ [média geométrica (95% de intervalo de confiança)] de 294,19 [158,20-94,64] e 501,27 [378,60-624,00] µg/mL, respectivamente, ou com fenilefrina (FEN; 1 µM) [IC₅₀ = 11,07 [6,40-15,68] e 7,91 [4,08-11,74] µg/mL, respectivamente]. O efeito vasorrelaxante do OEAC nas preparações pré-contraídas pela FEN não foi dependente da integridade do endotélio. OEAC e NF também inibiram a curva de concentração-resposta para a FEN (10⁻¹⁰- 3 x10⁻⁴ M) ou KCl (25-125 mM). Em meio isento de Ca²⁺, o OEAC (100 µg/mL) reduziu significativamente a contração induzida pela FEN (1 mM) sem alterar aquela induzida pela cafeína (20 mM). Em meio isento de Ca²⁺ contendo alta concentração de potássio (75 mM), as contrações induzidas por CaCl₂ e BaCl₂ foram reduzidas ou até completamente abolidas pelo OEAC nas concentrações de 100 e 600 µg/mL, respectivamente. Um efeito similar nas contrações induzidas por CaCl₂ foi também observado com o NF. O OEAC reduziu de maneira concentração-dependente (IC₅₀ = 52,66 [10,82-94,64]) a contração induzida pelo dibutirato de forbol (1 µM), um ativador da proteína kinase C. Em conclusão, o OEAC e o NF induzem um reflexo vago-vagal bradicardizante e hipotensor (fase 1) que aparentemente resultou da estimulação das fibras C aferentes vagais pulmonares mas não cardíacas. Este reflexo não parece envolver a ativação dos receptores vanilóides TPRV₁ nem dos receptores 5-HT₃ localizados nestas fibras sensoriais vagais. O componente tardio (fase 2) da resposta hipotensora do OEAC parece ser decorrente, pelo menos em parte, de um efeito vasorrelaxante principalmente através de um mecanismo miogênico independente da integridade do endotélio do que através de um mecanismo dependente de eventos na membrana celular,

envolvendo canais de cálcio dependentes de voltagem ou de receptor. Este efeito vasorrelaxante do OEAC, preferencialmente dependente do acoplamento farmacomecânico, foi principalmente atribuído à ação de seu maior constituinte, o NF.

Palavras-chave:

Aniba canelilla; Artéria mesentérica isolada; Efeito vasorrelaxante; 1-Nitro-2-feniletano; Óleo essencial; Ratos espontaneamente hipertensos; Reflexo vago-vagal.

ABSTRACT

de ANDRADE, LFLI. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* and its main constituent, of 1-nitro-2-phenylethane, in spontaneously hypertensive rats. 2011. Doctoral Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

This study investigated the mechanisms underlying the cardiovascular responses to the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) and its main constituent 1-nitro-2-phenylethane (NP) in spontaneously hypertensive rats (SHRs) by using a combined *in vivo* and *in vitro* approach. Rats were anesthetized, and catheters were implanted in the abdominal aorta and inferior vena cava. For vascular reactivity studies, rats were sacrificed and the superior mesenteric artery (SMA) was isolated. The rings were suspended in organ baths containing continuously aerated perfusion medium at 37°C. In anesthetized SHRs, intravenous (i.v.) bolus injections of EOAC (1-20 mg/kg) or NP (1-10 mg/kg) elicited dose-dependent hypotensive and bradycardiac effects, which were characterized in two periods (phases 1 and 2). The first rapid component (phase 1) evoked by EOAC and NP (both at 10 mg/kg) was absent after left ventricle injection, fully abolished by bilateral vagotomy or perineural treatment of both cervical vagus nerves with capsaicin (250 µg/mL) while remained unaltered by i.v. pretreatment with capsazepine (1 mg/kg) or ondansetron (30 µg/kg). In conscious SHRs, NP (5 and 10 mg/kg, i.v.) evoked rapid hypotensive and bradycardiac effects (phase 1) that were fully abolished by methylatropine (1 mg/kg, i.v.) pretreatment. At 0.1-1000 µg/mL, EOAC and NP relaxed SMA preparations pre-contracted with 75 mM KCl with IC₅₀ [geometric mean (95% confidence interval)] values of 294.19 [158.20-94.64] and 501.27 [378.60-624.00] µg/mL, respectively); or with phenylephrine (PHE) (IC₅₀= 11.07 [6.40-15.68] and 7.91 [4.08-11.74] µg/mL, respectively). Relaxant effects of EOAC on SMA pré-contracted with PHE remained unaltered by vascular endothelium removal. EOAC and NP also inhibited the concentration-response curves of KCl (25-125 mM) or PHE (10⁻¹⁰-3x10⁻⁴ M). In SMA preparations maintained under Ca²⁺-free conditions, EOAC (100 µg/mL) reduced the PHE, but not the caffeine-induced contraction. In Ca²⁺-free and high K⁺ (75 mM) medium, the contractions produced by CaCl₂ or BaCl₂ were reduced or even abolished by EOAC at 100 and 600 µg/mL, respectively. Similar effects were also observed with NP on the contractions induced by CaCl₂. EOAC also relaxed the contraction evoked by phorbol dibutyrate (IC₅₀ = 52.66 [10.82-94.64] µg/mL) in a concentration related manner. It is concluded that EOAC and NP induces a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1) that apparently results from the stimulation of vagal pulmonary rather than cardiac C-fiber afferents. This effect does not appear to involve activation of either vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors located on vagal sensory nerves. The second hypotensive response (phase 2) to i.v. EOAC seems to result, at least in part, from a myogenic endothelium-independent vasorelaxation through inhibitory actions on contractile events that include intracellular pathways, more than a superficial action restricted to the membrane environment such as a simple blocking activity on a given receptor or ion channel. This vasorelaxant effect of EOAC appears preferential to receptor-activated pathways and is mainly attributed to the action of its main constituent, NP.

Keywords:

Aniba canelilla; Essential oil; Isolated mesenteric preparation; 1-Nitro-2-phenylethane; Spontaneously hypertensive rats; Vago-vagal reflex; Vasorelaxant effect.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Folhas e flores da Aniba canelilla..... | 48 |
| Figura 2. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (OGER et al., 1994)..... | 50 |
| Figura 3. Arco barorreflexo..... | 52 |
| Figura 4. Mecanismo de ação de determinado agonista no acoplamento farmacomecânico. (Adaptado Benjamin Cummings, na imprint of Addison Wesley Longman)...... | 65 |
| Figura 5. Regulação da contração do músculo liso. Vários agonistas atuam em receptores específicos ocasionando a contração do músculo liso. Subseqüente a ligação, ocorre aumento da atividade da PLC. A PLC produz a partir do PIP ₂ o DAG e o IP ₃ . O IP ₃ se liga aos receptores específicos no RS, liberando Ca ²⁺ . O DAG junto com o Ca ²⁺ ativa a PKC, que fosforila proteínas específicas. O Ca ²⁺ ativado liga-se a calmodulina, promovendo a ativação da miosina quinase de cadeia leve (MCL quinase) (Adaptado de WEBB, 2003). | 67 |
| Figura 6. A ativação do trocador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX) pelo GMPc. GC, guanilato ciclase; NO óxido nítrico; PKG, GMPc dependente (Adaptado de NISHIMURA, 2006)..... | 69 |
| Figura 7. A ativação do trocador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX) pelo AMPc. AC, adenilato ciclase; Gs, proteína G ligado ao GTP; PKA, proteína quinase dependente-AMPc (Adaptado de NISHIMURA, 2006). | 71 |
| Figura 8. Relaxamento do músculo liso. O processo de relaxamento requer uma concentração intracelular diminuída de Ca ²⁺ e uma atividade aumentada da miosina fosfatase de cadeia leve de miosina (MLC fosfatase). O retículo sarcoplasmático (RS) e a membrana plasmática contém a Ca,Mg-ATPase que remove o Ca ²⁺ do citosol. O trocador Na ⁺ /Ca ²⁺ localizado na membrana plasmática também reduz a [Ca ²⁺] _i . Durante o relaxamento, os canais de Ca ²⁺ operados por voltagem ou por receptor presente na membrana plasmática permanecem fechados resultando na diminuição da entrada de Ca ²⁺ para a célula (Adaptado de WEBB, 2003)..... | 72 |

Figura 9. Substâncias secretadas pelo endotélio. O papel do aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} na liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE). A ativação de receptores endoteliais induz um influxo de Ca^{2+} no citoplasma da célula endotelial. Após a interação do Ca^{2+} com a calmodulina, ativa a NO-sintase e as cicloxigenases, e leva a liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE). O ON causa relaxamento pela ativação e formação de GMP cíclico (GMPc) a partir do GTP. FHDE causa hiperpolarização e relaxamento pela abertura dos canais de K^+ . As prostaciclina (PGI_2) causam relaxamento pela ativação da AC que conduz a formação de AMP cíclico (AMPc). Quando os agonistas ativam as células endoteliais, o aumento do IP_3 pode contribuir para o aumento de Ca^{2+} citoplasmático liberado pelo RS (Adaptado de VANHOUTTE, 2003).73

Figura 10. Rato SHR oriundo do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco..81

Figura 11. Fotografia do procedimento cirúrgico realizado para implantação dos catéteres na artéria e veia femoral.82

Figura 12. Fotografia do sistema utilizado para registro de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos.83

Figura 13. Esquema simplificado do set up utilizado nos experimentos de reatividade vascular; 1.Transdutor de tensão isométrica (LETICA Scientific Instruments, TRI-210); 2. Fonte de carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2); 3. Sistema de Aquisição de Dados (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Austrália); 4. Software PowerLab 7.1; 5. Banho de circulação Haake FJ; 6. Cuba de 5 mL; 7.Haste Fixa; 8. Coletor.....88

Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo de viabilidade da preparação e o teste do endotélio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.889

Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito do OEAC sobre o tônus basal em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.889

- Figura 16.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do OEAC ou NF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídas com FEN (1 μ M) com e sem endotélio ou KCl (75 mM). Em um grupo foi incubado o TEA (5 mM).....90
- Figura 17.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de uma determinada concentração do OEAC sobre a contração induzida pela curva de FEN (10^{-10} – 10^{-4} M) ou curva ao KCl (25 – 150 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....91
- Figura 18.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC ou NF sobre a curva ao CaCl_2 previamente despolarizada com KCL 75 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.8892
- Figura 19.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC ou nifedifipá sobre a curva ao Ba^{2+} previamente despolarizada com KCL 75 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.93
- Figura 20.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do OEAC sobre a contração induzida pelo PDB em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.93
- Figura 21.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC sobre a contração induzida pela cafeína em meio sem Ca^{2+} de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....88
- Figura 22.** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC sobre a contração induzida pela FEN em meio sem Ca^{2+} de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....885
- Figura 23.** Esquema demonstrando os principais componentes da preparação para o estudo de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977). (a) Leito mesentérico e seus ramos, (b) diagrama mostrando como a parte terminal da artéria é montada entre dois fios de tungstênio de 32 μ m de diâmetro cada, (c) diagrama mostrando as placas de aço, entre as quais está montada uma artéria de até 2 mm de comprimento e uma das placas está conectada a um

transdutor de força de alta sensibilidade enquanto a segunda está conectada a um micrômetro.96

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação da hipertensão (III Consenso Brasileiro HAS)..... | 75 |
| Tabela 2. Composição química e índice de retenção dos constituintes do óleo essencial da <i>Aniba canelilla</i> | 79 |

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AC | Adenilato ciclase |
| Ach | Acetilcolina |
| AMPC | 3' 5' - adenosina monofosfato cíclico |
| AR | Adrenorreceptores ou receptores adrenérgicos ou |
| α_1 -AR | Adrenorreceptores alfa-1 |
| β -AR | Adrenorreceptores beta |
| Ca ²⁺ | Cálcio |
| CAP | Capsaicina |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CVLM | Região caudal do bulbo ventro lateral |
| DAG | Diacilglicerol |
| EAZ | Extrato de <i>Alpinia zerumbet</i> |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| Em | Potencial de membrana |
| E.P.M. | Erro padrão da média |
| EUG | Eugenol |
| FC | Frequência cardíaca |
| FEN | Fenilefrina |
| FHDE | Fator hiperpolarizante derivado do endotélio |
| FRDE | Fator relaxante derivado do endotélio |
| GABA | Aminoácido gama-aminobutírico |
| GC | Guanilato ciclase |
| GDP | Difosfato guanosina |

| | |
|------------------|---|
| GMPC | 3'5'-guanosina monofosfato cíclico |
| Gs | Proteína G estimulatória |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IC ₅₀ | Concentração que reduz em 50 % o efeito máximo |
| i. v. | Intravenosa |
| i. p. | Intraperitoneal |
| IP ₃ | 1,4,5-trifosfato de inositol |
| ISO | Organização de padronização internacional |
| KCl | Cloreto de potássio |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| ME | Metileugenol |
| min | Minutos |
| MLCK | Quinase da cadeia leve de miosina |
| MLV | Músculo liso vascular |
| NA | Noradrenalina |
| NANC | Neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica |
| NCX | Atividade trocadora Na ⁺ /Ca ²⁺ |
| NF | 1-Nitro-2-feniletano |
| Nm | Receptores nicotínicos musculares e ganglionares |
| Nn | Receptores nicotínicos neuronais |
| NOS | Óxido nítrico síntase |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| NTS | Núcleo do trato solitário |

| | |
|------------------|--|
| OEAC | Óleo essencial da <i>Aniba canelilla</i> |
| OEAZ | Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> |
| OECN | Óleo essencial do <i>Croton nepetaefolius</i> |
| OECZ | Óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> |
| OEMV | Óleo essencial da <i>Mentha villosa</i> |
| OEOG | Óleo essencial do <i>Ocimum gratissimum</i> |
| OEs | Óleos essenciais |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ON | Óxido nítrico |
| OP | Óxido de piperitenona |
| PA | Pressão arterial |
| PAM | Pressão arterial média |
| PGI ₂ | Prostaciclina |
| PIP ₂ | Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato |
| PKA | Proteína quinase dependente de AMPc |
| PKC | Proteína quinase C |
| PKG | Proteína quinase dependente de GMPc |
| PLC | Fosfolipase C |
| RBJ | Reflexo cardiopulmonar de Bezold-Jarisch |
| ROCCs | Canais para Ca ²⁺ operados por receptor |
| RS | Retículo sarcoplasmático |
| RVLM | Região rostral do bulbo ventro lateral |
| RVP | Resistência vascular periférica |
| SHR | Ratos espontaneamente hipertensos |
| SNA | Sistema nervoso autônomo |

| | |
|-------------------|---|
| SNC | Sistema nervoso central |
| SP | Substância P |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TEA | Tetralamônio |
| Trp-4-ol | Terpinen-4-ol |
| TRPV1 | Receptores vanilóides tipo 1 |
| VIP | Peptídeo vasoativo intestinal |
| VOCCs | Canais para Ca^{2+} operados por voltagem |
| VSPA | Neurônio aferente primário sensível a vanilóide |
| 5-HT ₃ | Receptor serotoninérgico |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 2. OBJETIVOS..... | 29 |
| 2.1. GERAL..... | 29 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 31 |
| 3.1. ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 31 |
| 3.1.1. EFEITOS CARDIOVASCULARES OËS E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES | 37 |
| 3.2. ANIBA CANELILLA | 48 |
| 3.3. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL..... | 51 |
| 3.3.1. Sistema nervoso autônomo..... | 54 |
| 3.3.2. Neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica..... | 58 |
| 3.4. MECANISMOS VASCULARES | 61 |
| 3.4.1. Íons de cálcio e seus canais | 62 |
| 3.4.2. Contração Muscular | 65 |
| 3.4.3. Relaxamento muscular..... | 67 |
| 3.5. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA HIPERTENSÃO | 74 |
| 4. METODOLOGIA | 78 |
| 4.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA..... | 78 |
| 4.2. SOLUÇÕES E DROGAS | 80 |
| 4.3. MATERIAL | 80 |
| 4.4. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS “ <i>IN VIVO</i> ”..... | 81 |
| 4.4.1. Cateterização dos animais | 81 |
| 4.4.2. Sistema de registro | 83 |
| 4.4.3. Protocolos experimentais “ <i>in vivo</i> ”..... | 83 |
| 4.5. EXPERIMENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”..... | 87 |
| 4.5.1. Estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas superiores..... | 87 |
| 4.5.1.1. Protocolos experimentais para as preparações “ <i>in vitro</i> ” | 88 |
| 4.5.2. Estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência | 95 |
| 4.5.2.1. Protocolo experimental em artérias de resistência..... | 97 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 97 |
| 5. RESULTADOS..... | 98 |
| 6. DISCUSSÃO | 150 |
| 7. CONCLUSÃO | 160 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 161 |

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos.

O item metodologia descreve em detalhes todo procedimento metodológico. Com relação aos itens, discussão e conclusões encontradas no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos gerados durante esta tese.

As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica, metodologia e discussão.

1. INTRODUÇÃO

Existe um interesse crescente nos estudos sobre plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos. Essa veemência também é clara nas políticas e programas do governo que tem demonstrado interesse em programas de fitoterapia, fazendo surgir uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional, além de promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Ministério da Saúde, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial faz uso de medicamentos obtidos a partir das plantas medicinais. No Brasil, as pesquisas indicam que 90% da população já fizeram uso de alguma planta medicinal (CORRÊA; ALVES, 2008).

Nas regiões mais pobres do Brasil e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). Durante a última década, o consumo de ervas tem aumentado consideravelmente em países da América do Norte e da Europa, particularmente na Alemanha e na França (CAPASSO et al., 2003). Ernest e colaboradores em 2004 mostraram que dois terços das mulheres usam ervas para sintomas da pré-menopausa, 45% dos pais tratam as crianças com ervas e 45% das gestantes utilizam as ervas como remédio. Mas, a maioria dos produtos utilizados não é licenciada e não possui uma demonstração de eficácia, segurança ou qualidade (DE SMET et al., 2002). Embora, as ervas sejam frequentemente

promovidas como natural, elas não são desprovidas de efeitos adversos (PALMER, et al., 2003).

As plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas doenças, desde transtornos leves como desordens do trato gastrointestinal, inflamações dermatológicas, tratamento da tosse, dores musculares, gripe e insônia, até enfermidades mais graves como desordens cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer (SILANO et al., 2004; FOGLIO et al., 2006, AHMAD et al., 2010, BEN-ARYE et al. 2010; REUTER et al. 2010; BALÁZ, 2010).

Planta medicinal pode ser considerada aquela que contém substâncias bioativas, possuindo um ou mais princípios ativos com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas (VALE, 2002). Enquanto que os fitoterápicos são definidos como medicamentos produzidos a partir de material botânico integral ou seus extratos com o propósito de tratamento médico (FRANÇA et al., 2008).

O uso da fitoterapia, para o tratamento e prevenção de doenças, se deve a presença de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas. Vários medicamentos foram e vem sendo desenvolvidos, direta ou indiretamente a partir de plantas, podendo ser citados como exemplo a digoxina, a morfina, a rutina, a pilocarpina, a atropina, a escopolamina, a tubocurarina, a hipericina, a artemisinina, a vimblastina, a vincristina, o etoposídeo, o teniposídeo, o taxol, a camptotecina, dentre outros (CALIXTO, 2001; BOLDI, 2004; VIEGAS et al., 2006; FOGLIO et al., 2006). A utilização de plantas para a obtenção de fármacos é tão intensa que de 1940 até 2007 das 155 moléculas utilizadas para o tratamento do câncer 47% eram provenientes ou derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Em

2005, cerca de 25 - 30% de todas as drogas disponíveis como terapêutica eram derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005).

Esses dados justificam o grande interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, principalmente em países de clima tropical, como o Brasil, que possui uma enorme biodiversidade. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detém cerca de 20-22% das plantas e micro-organismos do planeta (CALIXTO, 2005).

Neste contexto, os óleos essenciais (OEs), que são produtos obtidos de partes das plantas aromáticas, vêm sendo muito estudados pelas suas diversas ações farmacológicas, no entanto ainda são escassos os trabalhos que investigam os efeitos cardiovasculares principalmente quando se destina a descrever o mecanismo de ação. Diante desta lacuna, a nossa equipe tem pesquisado os efeitos cardiovasculares de vários OEs com largo uso na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Sabemos que é de interesse nacional o estudo de plantas medicinais, sinalizado desde 1998 através de diversas conferências e seminários que forneceram subsídios para a normatização das ações governamentais para plantas medicinais e fitoterápicos. Essas ações se concretizaram em várias políticas subsequentes culminando com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) que tem dentre seus objetivos a pesquisa, o desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em 2009 o Ministério da Saúde divulgou uma lista com 71 plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A necessidade de estudos que validem o uso das plantas na medicina popular, estimulou a adequação das linhas de pesquisas desenvolvidas no nosso laboratório com o intuito de atender as demandas das Políticas Nacionais nesta área, visando contribuir nos estudos de plantas com potencial farmacológico sobre o sistema cardiovascular.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Estudar o mecanismo de ação envolvido nos efeitos cardiovasculares induzido pelo óleo essencial da *Aniba canelilla* (OEAC) e pelo 1-nitro-2-feniletano (NF) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2. Objetivos específicos

In vivo

- Estudar os efeitos do OEAC e do NF sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em SHR anestesiados ou acordados;
- Estudar os efeitos cardiovasculares do OEAC e do NF;
- Caracterizar a participação de fibras sensoriais nos efeitos causados pelo OEAC e NF;
- Estudar a participação colinérgica nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo OEAC e NF.

In vitro

- Estudar a ação vascular do OEAC e do NF em preparações de artéria mesentérica superior isolada;

- Estudar a ação vascular do OEAC em preparações de artéria mesentérica de resistência;
- Verificar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante induzido pelo OEAC e NF;
- Estudar a participação dos canais para cálcio (Ca^{2+}) sobre o efeito vasorrelaxante do OEAC e NF;
- Investigar se o OEAC atua por vias intracelulares para produzir efeitos vasculares.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Óleos essenciais

Os OEs são definidos como os produtos obtidos de partes de plantas, onde de forma geral são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Do ponto de vista químico, os OEs das plantas são constituídos principalmente de uma mistura de lipídeos chamados terpenos. Os terpenos são hidrocarbonetos e aqueles que são oxigenados são denominados terpenóides. Os OEs são encontrados em várias plantas, mas são especialmente abundantes nas mirtáceas, coníferas, labiadas, rutáceas, lauráceas e umbelíferas (MATOS; FERNANDES, 1975-1978; CRAVEIRO et al., 1976).

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Os métodos mais comuns de extração são: enfloração, destilação por arraste de vapor d'água, extração com solvente orgânico de forma contínua e descontínua, prensagem e extração por CO₂ supercrítico. O método mais empregado para a obtenção dos OEs é a destilação pelo vapor onde o OE é evaporado e condensado por resfriamento (CRAVEIRO et al., 1976, 1981).

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae).

Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares nas Lamiaceae, células parenquimáticas diferenciadas nas Lauraceae, Piperaceae e Peaceae, nos canais oleíferos nas Apiaceae ou em bolsas lisígenas ou esquizomógenas nas Pinaceae e Rutaceae. Os óleos têm a função de proteger as plantas de doenças e parasitas, além de atrair insetos que auxiliam na polinização. Adicionalmente, catalisam reações bioquímicas, agindo como hormônios ou reguladores, e dessa forma desempenham um importante papel na bioquímica da planta (LAVABRE, 1993).

Estudos mostram que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes, como por exemplo, o mentol e mentona que são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas (SIMÕES; SPITZER, 1999). O OE de *Clausena excavata* e seus constituintes são um potencial larvicida natural que age inibindo o crescimento de larvas do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (CHENG et al., 2009). As plantas do gênero *Cymbopogon*, bem como o extrato do óleo do gênero *Ocimum* ssp são utilizados tradicionalmente como repelente (PADILHA DE PAULA et al., 2003; NERIO et al., 2010).

Os vapores de certas substâncias como o citronelal e α -pineno podem causar irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de um ataque. Certos himenópteros, por exemplo, sequestram (sem alteração química) α - e β - pineno, entre outros componentes, do *Pinus sylvestris* L. (uma conífera européia), dessa forma, as larvas desses insetos se defendem de predadores como as formigas (HARBORNE, 1993).

Na União Européia, o maior uso de OEs nas indústrias é como flavorizante, em fragrâncias de perfumes e loções pós-barba e por suas propriedades funcionais (FROSCH et al., 2002). A indústria utiliza amplamente os OEs, como aromatizantes para preparação de perfumes, sabões, desinfetantes e cosméticos, e na preparação de alimentos como doces caseiros, licores, bebidas aromáticas, refrescos e aguardentes de cana (JACOBS, 1948; LE BOURHIS, 1968, 1970; LE MOAN, 1973; CRAVEIRO et al., 1977; ITOKAWA et al., 1981). Ademais, são empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumo em diversos produtos das indústrias de plástico, tintas, borrachas, inseticidas e outras (CRAVEIRO, 1981; PADILHA DE PAULA et al., 2003; CAPUTI; APREA, 2011). Entretanto, a utilização dos OEs deve ser cautelosa, pois são crescentes os relatos clínicos sobre a toxicidade associada ao consumo de medicamentos fitoterápicos (ZHOU et al., 2004). Alguns OEs podem ser convertidos em substâncias tóxicas ou metabólitos carcinogênicos e mutagênicos (ZHOU et al., 2007), portanto é importante avaliar a sensibilidade dos indivíduos aos inúmeros componentes químicos de um óleo volátil e a ingestão concomitante de certos medicamentos, que podem provocar o aparecimento de reações adversas e/ou tóxicas (ZHOU et al., 2007). Geralmente a toxicidade dos óleos voláteis é dose dependente, entretanto, em alguns casos a utilização de doses baixas pode provocar reações adversas, principalmente nos casos de alergias de contato (sensibilização cutânea) (SEN et al., 2010). O grau de toxicidade também depende da via de administração, sendo a ingestão oral àquela que apresenta maiores riscos, especialmente se os óleos voláteis forem ingeridos concentrados.

Esta é a via mais estudada sob o aspecto da toxicidade dos óleos voláteis (SIMÕES; SPTIZER, 1999).

A maioria dos OEs possui índice de refração e são opticamente ativos, sendo essas propriedades utilizadas na sua identificação e no controle de qualidade. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos sulfurados (MATOS; FERNANDES, 1975-1978; LAVABRE, 1993). Esses constituintes podem ser ativos ou inativos do ponto de vista farmacológico ocasionando distintas ações decorrentes da interação dos constituintes presentes nos OEs, podendo atuar de forma sinérgica ou não. Um exemplo desse efeito sinérgico encontra-se nos constituintes da papoula (*Papaver somniferum*), onde a morfina apresenta ação analgésica e a papaverina possui efeito relaxante na musculatura lisa. A associação desses dois componentes intensifica seus efeitos (VEIGA et al., 2005). Na composição química dos OEs, os constituintes estão presentes em diferentes concentrações, e normalmente, um deles é o composto majoritário. Esta composição pode variar durante o dia e ao longo do ano, como também por diversos outros motivos como: clima, solo, variedade e parte da planta onde é extraído (folha, casca, caule ou raiz). Devido a complexa composição química, postula-se que os OEs apresentam também uma diversidade de ações farmacológicas, sendo fontes potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (CRAVEIRO et al., 1978, 1980; ALBUQUERQUE, 1982; MAGALHÃES, 1997).

Os terpenóides possuem uma importante participação nas indústrias de aromas e fragrâncias, por possuírem uma variedade de aromas agradáveis de

florido para frutado, com notas amadeiradas e balsâmicas. A expectativa é que em 2012 a venda desses produtos demande por volta dos US\$ 5,3 bilhões apenas nos Estados Unidos (CAPUTI; APREA, 2011).

Os OEs, assim como as plantas aromáticas, são empregados na medicina popular na forma de chás e infusatos para o tratamento da rinite alérgica (BEZERRA, 1994), da cólica menstrual, da diarreia sanguinolenta, da amebíase e giardíase, e como sedativos, estomáquicos (FREISE, 1935; ITOKAWA et al., 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994), antimicrobianos, analgésicos, diuréticos (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e anti-hipertensivos (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989).

Algumas propriedades farmacológicas dos OEs estão relativamente bem estabelecidas: i) ação carminativa – promove uma redução dos gases intestinais através de uma leve anestesia sobre a cárdia, permitindo seu relaxamento e consequente expulsão do ar do trato gastrintestinal. São propriedades encontradas no *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Matricaria recutita*, *Mentha piperita*, *Aniba canelilla*, *Lavandula angustifolia*; *Bunium persicum*; ii) ação antiespasmódica - alguns óleos relaxam a musculatura lisa intestinal, diminuindo ou mesmo suprimindo espasmos, por exemplo à *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Matricaria recutita*, *Achyrocline satureioides*, *Allium sativum*, *Salvia officinalis*, *Aniba canelilla*, *Tripleurospermum disciforme*, *Bunium persicum*, *Origanum acutidens*; iii) ação estimulante sobre secreções do aparelho digestivo, justificando a propriedade estimulante do apetite, cita-se como exemplo plantas como o *Zingiber spectabile*, *Gentiana Lutea*, *Juniperus communis*; iv) ação irritante tópica ou repulsiva (uso

externo) - alguns produtos, tais como a essência de terebintina, provocam um aumento da microcirculação local com conseqüente efeito rubefaciente (sensação de calor) e, em certos casos, uma ação anestésica local; v) ação secretolítica - a ação irritante tópica pode provocar a atividade secretora do epitélio respiratório, facilitando a fluidificação e a expulsão do muco, benéfica a em alguns problemas respiratórios são exemplos, o *Eucalyptus robusta* e *Illicium verum*; vi) ações sobre o sistema nervoso central (SNC) - estimulante (*Aniba canelilla*), depressora (*Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*) ou mesmo provocando convulsões em doses elevadas (*Artemisia absinthium*, *Chenopodium ambrosioides*, *Salvia officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum*); vii) ação anestésica local - óleo volátil do *Caryophyllus aromaticus*, pelo seu alto teor em Eugenol (EUG), que também tem atividade anti-séptica; viii) ação anti-séptica (uso externo) - alguns óleos voláteis inibem o crescimento de várias bactérias e fungos devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis; ix) ação anti-obesidade – alguns óleos como o *Citrus aurantifolia* e *Bunium persicum* vem demonstrando reduzir o peso corporal (SIMÕES; SPTIZER,1999; LIS-BALCHIN; HART, 1999; de LIMA et al., 2009; CHEHREGANI et al., 2010; SHARIFIFAR et al., 2010; GOZE et al., 2010; ASNAASHARI et al., 2010).

Dos OEs investigados por nossa equipe, seis tiveram interesse especial, são os provenientes do *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) conhecido como marmeleiro vermelho, *Mentha villosa* Huds. (Labiatae) denominada popularmente como menta rasteira, *Alpinia zerumbet* ou *speciosa* K. Schum (Zingiberaceae) vulgarmente chamada de colônia, do *Croton zehntneri* Pax. (Euphorbiaceae) ou canela de cunhã, da *Aniba canelilla* Mez. (Lauraceae) mais conhecida como casca preciosa e do *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) (alfavaca). Essas plantas

medicinais aromáticas têm grande uso na medicina popular, particularmente devido ao seu efeito antiespasmódico. O *Ocimum gratissimum* é utilizado como calmante e a *Alpinia zerumbet* como anti-hipertensivo. No Nordeste do Brasil, fitoterápicos da *Mentha villosa* são comercializados industrialmente para o tratamento de giardíase e amebíase.

Estudos realizados em roedores mostraram que os OEs supramencionados, assim como seus principais constituintes, apresentam grande eficácia farmacológica em tecidos excitáveis. E, em preparações de músculo liso possuem um efeito em comum: são depressores da contratilidade (miorrelaxantes e antiespasmódicos) (MAGALHÃES, 1997; COELHO-DE-SOUZA, 1997; MAGALHÃES et al., 1998a; COELHO-DE-SOUZA et al., 1998; SOUSA, 1999; LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; BEZERRA et al., 2000; MAGALHÃES, 2002; MAGALHÃES et al., 2003, 2004). Um conjunto de argumentos sugere que eles agem diretamente sobre a célula muscular lisa, atuando provavelmente a nível intracelular, independentemente dos mecanismos situados na membrana plasmática (MAGALHÃES, 1997; COELHO-DE-SOUZA, 1997; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997, 1998; MAGALHÃES et al., 1998a; SOUSA, 1999; MAGALHÃES, 2002, MAGALHÃES et al., 2003, 2004). Porém, os efeitos sobre o músculo liso não são idênticos, possuindo aspectos que sugerem mecanismos de ação diferenciados.

No item abaixo (3.1.1) estão descritas plantas que foram objeto de estudo do nosso laboratório nos últimos anos, suas características e efeitos cardiovasculares.

3.1.1. Efeitos cardiovasculares de alguns OEs e de seus principais constituintes

Croton nepetaefolius

O *C. nepetaefolius* é utilizado na medicina popular como antiespasmódico. Seu OE possui como principais constituintes o 1,8-cineol e o metileugenol (ME), tendo sido mostrado por nossa equipe que a administração intravenosa (i.v.) do OE do *C. nepetaefolius* (OECN) induz quedas dose-dependentes da PAM e da FC em ratos normotensos anestesiados ou acordados (LAHLOU et al., 1996; LAHLOU et al., 1999), e que a hipotensão e bradicardia são independentes. A bradicardia é de origem vagal, uma vez que foi bloqueada pelo pré-tratamento com metilatropina ou por bivaotomia, e reduzida pelo pré-tratamento com hexametônio, enquanto a hipotensão parece não ser de origem pré-juncional, visto que continua ocorrendo mesmo quando a transmissão autonômica central para o sistema vascular foi bloqueada pelo hexametônio (LAHLOU et al., 1999). Essas observações levaram a sugerir que a atividade hipotensora do OECN poderia resultar de efeitos vasodilatadores diretos sobre o músculo liso vascular (MLV) (LAHLOU et al., 1999), e que a estimulação dos receptores muscarínicos vasculares, que normalmente induz uma hipotensão, não estaria envolvida neste processo, uma vez que o pré-tratamento com metilatropina não afetou a hipotensão induzida pelo OECN.

A hipótese de uma ação direta do OECN sobre o MLV para induzir o efeito hipotensor foi corroborada pelos achados obtidos em estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando ratos hipertensos (LAHLOU et al., 2000). Experimentos *in vivo* mostraram que a administração i.v. do OECN em ratos DOCA-sal, acordados, também induzia quedas dose-dependentes da PAM e da FC, mas os efeitos hipotensores eram significativamente amplificados, tanto na magnitude (absoluta ou relativa) quanto na duração, quando comparados aos ratos controles (uninefrectomizados),

normotensos (LAHLOU et al., 1999, 2000). Em ratos hipertensos, o pré-tratamento com hexametônio (i.v.) reduziu a magnitude da bradicardia sem alterar a hipotensão. Utilizando preparações de aorta isolada, observou-se que os efeitos inibitórios do OECN na contração induzida pela fenilefrina (FEN) foram significativamente maiores em ratos hipertensos DOCA-sal quando comparada aos controles uninefrectomizados (MAGALHÃES et al., 1998b; LAHLOU et al., 2000; MAGALHÃES, 2002). O conjunto desses resultados sugere que a amplificação do efeito hipotensor induzido pelo OECN em ratos hipertensos DOCA-sal é devido principalmente ao aumento da resposta vascular ao óleo do que ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático, neste modelo de hipertensão (LAHLOU et al., 2000). Ainda, o efeito hipotensor do OECN é independente do sistema nervoso autônomo (SNA) e parece ser consequente da ação vasodilatadora direta do OE sobre o MLV.

Em 2004 Lahlou e colaboradores, demonstraram que a hipotensão induzida pelo ME (10 mg/kg) tanto em ratos anestesiados como acordados, era associada a uma bradicardia que parecia ser de origem vagal, uma vez que foi reduzida pela bivagotomia ou por metilatropina (i.v.), como demonstrado para as respostas bradicardizantes ao OECN (LAHLOU et al., 1999). Tais achados sugeriram mecanismos independentes para a hipotensão e bradicardia induzida pelo ME, excluindo a possibilidade da hipotensão ser devido a uma bradicardia concomitante. A combinação de experimentos *in vivo* e *in vitro* mostraram pela primeira vez que o tratamento i.v. com ME, em ratos anestesiados e acordados, reduzia a pressão arterial (PA) e que isto era provavelmente devido a um relaxamento vascular e, não a inibição do tônus simpático. Este mesmo efeito foi observado, tanto em ratos

acordados como anestesiados, com o uso do 1,8-cineol (LAHLOU et al., 2002d), sugerindo que tanto o ME quanto o 1,8-cineol contribuem na mediação dos efeitos hipotensores do OE de algumas plantas aromáticas usadas popularmente para o tratamento da hipertensão.

Mentha x villosa

Mentha x villosa Huds. (Labiatae) é uma planta rasteira aromática, comumente encontrada em jardins de casas no nordeste do Brasil (MATOS, 1994). Ela recebe vários nomes populares como hortelã-rasteira, hortelã-comum ou hortelã-da-folha-miúda (MATOS, 1994). Infusões e decocções das folhas de *Mentha x villosa* são geralmente usadas como estomáquico, ansiolítico, e também para o tratamento de cólicas menstruais e diarreia sanguinolenta (MATOS, 1994). O OE de *Mentha villosa* (OEMV), e o seu principal constituinte, o óxido de piperitenona (OP) foi reportado por possuir efeito miorrelaxante intestinal e antiespasmódico em animais de laboratório (SOUSA et al., 1997; SOUSA et al., 2009).

Lahlou e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento i.v. com o OEMV, em ratos anestesiados, induzia hipotensão e bradicardia que foram atribuídas às ações do principal constituinte desse óleo, o OP. Estes efeitos cardiovasculares são independentes, verificando-se que a bradicardia, mas não a hipotensão, necessita da presença de um fluxo neural simpático funcional e operacional para o coração. Neste caso, a atividade hipotensora do OEMV poderia ser consequente a um efeito vasodilatador direto sobre o MLV. Esta hipótese foi corroborada por algumas evidências: i) o OEMV reduziu a contração induzida pelo cloreto de potássio (KCl, 60 mM) em preparações de anéis de aorta. A contração foi significativamente reduzida

quando os anéis com endotélio intacto foram incubados na presença de L-NAME, ou quando ocorreu remoção do endotélio (LAHLOU et al., 2002b), o que sugere que o ON liberado das células endoteliais vasculares estaria envolvido, pelo menos parcialmente, no efeito vasorrelaxante induzido pelo OEMV, e conseqüentemente na mediação da hipotensão. ii) a resposta hipotensora para o OEMV foi maior em ratos hipertensos DOCA-sal, acordados, do que nos animais uninefrectomizados controles (LAHLOU et al., 2002b). Ademais, o aumento da hipotensão não foi afetado pelo pré-tratamento com hexametônio (i.v.), sugerindo que esse efeito estaria relacionado principalmente ao aumento da resposta vascular para o OEMV (LAHLOU et al., 2002b).

Outros dados encontrados na literatura, também mostram que o efeito hipotensor do OEMV (GUEDES et al., 2004a) e do OP (GUEDES et al., 2002, 2004b), é devido a uma ação vasodilatadora, atribuída a mecanismos que tanto são dependentes do endotélio (via ON e prostaciclina) quanto independentes (bloqueio dos canais para Ca^{2+}). Nas ações de bloqueio de canais para Ca^{2+} , o OP inibiu a contração induzida pela FEN, mas não aquelas induzidas por cafeína. Isto sugere que o efeito inibitório do OP não pode ser atribuído à inibição direta da maquinaria contrátil do MLV.

A liberação de Ca^{2+} induzida pela FEN é atribuída à formação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3), enquanto a liberação de Ca^{2+} induzida pela cafeína é devido a um mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzido pelo Ca^{2+} (KARAKI; WEISS, 1988). Assim, o OP poderia inibir de uma maneira relativamente seletiva a liberação do Ca^{2+} mediada pelo IP_3 dos estoques intracelulares em preparações de aorta de ratos (GUEDES et al., 2004a).

Alpinia zerumbet

A *Alpinia zerumbet*, uma planta aromática originada no oeste da Ásia (MATOS, 2001), é abundante na região nordeste do Brasil, onde é comumente conhecida como “colônia”. Infusões e decocções de suas folhas são corriqueiramente usadas por atribuir-se a estas, propriedade diurética e anti-hipertensiva (MENDONÇA et al., 1991; MATOS, 2001). Experimentalmente, foi observado que a administração (i.v.) do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAZ), em ratos acordados normotensos, induzia uma hipotensão que foi atribuída à ação do seu principal constituinte, o terpinen-4-ol (Trp-4-ol) (LAHLOU et al., 2002c). Essa hipotensão do OEAZ parece ser independente do SNA, sugerindo que ele atue como um agente dilatador do MLV.

Estudos realizados em ratos hipertensos DOCA-sal mostraram que a magnitude da resposta hipotensora para a administração i.v. de OEAZ, Trp-4-ol ou de hexametônio é maior em ratos DOCA-sal do que em ratos normotensos uninefrectomizados, acordados (LAHLOU et al., 2002c). A amplificação dessa hipotensão induzida pelo OEAZ permaneceu inalterada pelo pré-tratamento i.v. com hexametônio ou com metilatropina, corroborando a hipótese de que o OEAZ atua diretamente sobre o sistema vascular. O aumento da hipotensão em ratos hipertensos DOCA-sal é sugerida como consequente do aumento da resposta vascular para o OEAZ (LAHLOU et al., 2002c).

Em 2005, MOURA e colaboradores demonstraram que o extrato de *Alpinia zerumbet* (EAZ) promoveu um efeito vasodilatador que foi dependente da ativação da via ON-GMPc e independente da abertura de canais para K_{ATP} ou K_{Ca} . Esses

autores sugeriram que os receptores para bradicinina também poderiam participar do efeito vasodilatador do EAZ.

Pinto e colaboradores estudaram o efeito vasorelaxante do OEAZ e do seu principal constituinte o 1,8-cineol e constataram que este efeito parece ser totalmente dependente da integridade funcional do endotélio vascular e que não poderia ser totalmente atribuído às ações do 1,8-cineol, (PINTO et al., 2009).

Croton zehntneri

O *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) é abundante no nordeste do Brasil, onde é comumente conhecida como "canela de cunhã" e suas folhas usadas em infusões e decocções para o tratamento de ansiedade, anorexia e distúrbios gastrointestinais (BATATINHA et al., 1995; CRAVEIRO et al., 1997; LEAL-CARDOSO et al., 1999). Esta planta aromática é caracterizada por um odor forte e agradável, remanescente de anis e dos cravos-da-índia. Por essa característica, os extratos do caule e das folhas são usados como flavorizantes nos alimentos e bebidas (CRAVEIRO et al., 1978, 1997).

Experimentalmente foi observado que, a administração i.v. do óleo essencial do *croton zehntneri* (OECZ) induziu uma queda inicial da PAM seguida de uma resposta pressora, em ratos normotensos acordados. Estes efeitos foram atribuídos principalmente às ações dos seus principais constituintes - anetol e estragol. A hipotensão inicial induzida pelo OECZ (fase I) foi mediada por mecanismos colinérgicos e é decorrente de uma bradicardia concomitante, de origem reflexa, enquanto a resposta pressora subsequente (fase II) parece ser resultado de uma ação vasoconstritora indireta, provavelmente devida à inibição da produção do ON

endotelial. Esta hipótese foi suportada pelos achados “*in vitro*” que mostraram que baixas concentrações de OECZ amplificaram as contrações da FEN em anéis de aorta, efeito este que foi abolido pela retirada do endotélio ou pelo bloqueio da óxido nítrico síntase (NOS) com L-NAME. Estes dados *in vivo* e *in vitro* foram os primeiros relatos dos efeitos farmacológicos do OECZ sobre o sistema cardiovascular (de SIQUEIRA et al., 2006a). Mais tarde, em estudos realizados em ratos anestesiados, os mesmos autores corroboraram a natureza reflexa da fase 1 demonstrando que a hipotensão inicial induzida pelo OECZ e seus principais constituintes foi abolida pela bivagotomia, pelo tratamento perineural com a CAP e pelo pré-tratamento i.v. com a capsazepina. Tais resultados levam a crer que este reflexo vago-vagal parece ser mediado através da estimulação dos receptores vanilóides tipo 1 (TPRV1) localizados nas fibras sensoriais vagais (de SIQUEIRA et al., 2006b).

Ocimum gratissimum

O *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecido como “alfavaca” pertence à família “Lamiaceae” e ao gênero *Ocimum*. Esta planta é geralmente usado na culinária como condimento. Na medicina popular, infusões e decocções das suas folhas são geralmente usadas para o tratamento de problemas digestivos e como anti-séptico bucal (MATOS, 2001). No Oeste da África, extratos desta planta são usados como diaforético, laxante e também no tratamento de tosse, febre e conjuntivite (OLIVER et al., 1960).

Em nosso laboratório, estudos realizados em ratos normotensos acordados ou anestesiados mostraram que a administração do OE de *Ocimum gratissimum* (OEOG) (i.v.) induzia efeitos hipotensores e bradicardizantes, atribuídos, ao menos

em parte, às ações do EUG - seu principal constituinte. Estas respostas são decorrentes de mecanismos distintos - a hipotensão induzida pelo OEOG é independente da presença do SNA, parecendo resultar de efeitos vasodilatadores diretos sobre o MLV (LAHLOU et al., 2004b). Resultados obtidos pelo tratamento i.v. com EUG, em ratos anestesiados e acordados, mostram redução da PAM, provavelmente devido a um relaxamento vascular ativo. Não parece que esse relaxamento seja mediado pela via endotelial L-arginina/ON.

Diversas plantas aromáticas que possuem o EUG na composição de seus OEs são utilizadas na medicina popular para o tratamento da hipertensão, acreditando-se que este componente seja o responsável pelos efeitos hipotensores (LAHLOU et al., 2004a).

Em 2005, nós estudamos os efeitos cardiovasculares da administração (i.v.) do OEOG e do EUG em ratos hipertensos DOCA-sal e mostramos que a administração OEOG ou EUG induziu hipotensão e bradicardia dose-dependentes, tanto em ratos acordados DOCA-sal como em seus controles normotensos uninefrectomizados. Entretanto, o tratamento DOCA-sal aumentou significativamente a redução da PAM induzida pelo hexametônio, assim como a resposta hipotensora para ambos OEOG e EUG, mas a bradicardia não foi alterada. O pré-tratamento i.v com o hexametônio ou com a metilatropina não modificou a resposta hipotensora em ratos hipertensos, parecendo ser mediado principalmente pelo aumento do relaxamento do MLV induzido pelo OEOG (INTERAMINENSE et al., 2005).

Para corroborar a hipótese de que o efeito hipotensor do OEOG era mediado pela atividade vascular, nós estudamos o mecanismo de ação do OEOG e do EUG.

Para isto, foram utilizadas preparações de aorta isolada (na presença do endotélio), oriundas de ratos hipertensos DOCA-sal, sendo demonstrado que o OEOG e o EUG foram capazes de relaxar a contração induzida pela FEN. Porém, em preparações sem endotélio esse efeito foi significativamente reduzido. Tanto o OEOG como o EUG reduziu ou aboliu (dependendo da concentração) as contrações induzidas pelo CaCl_2 em meio sem cálcio. Esses resultados sugerem que a resposta hipotensora para o OEOG em ratos hipertensos DOCA-sal é devido a um relaxamento vascular, que é parcialmente dependente da integridade do endotélio vascular e parece ser predominantemente mediado pela inibição do influxo de Ca^{2+} (INTERAMINENSE et al., 2007).

Aniba canelilla

Ainda em 2005, os efeitos cardiovasculares induzidos pelo OEAC foram avaliados em ratos normotensos acordados e anestesiados, verificando-se que a administração i.v. do OEAC induziu uma hipotensão e bradicardia dose-dependentes, dois efeitos que ocorreram independentemente. A resposta hipotensora permaneceu inalterada pelo tratamento com hexametônio (i.v.), porém, foi reduzida parcialmente com a metilatropina ou com o L-NAME. Além disso, o OEAC causou um relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta pré-contraídos com KCl, um efeito que foi significativa e similarmente inibido pela remoção do endotélio ou pela adição da atropina no meio de perfusão. Por outro lado, o OEAC aboliu a contração induzida pelo CaCl_2 , mas não àquela induzida pela cafeína, em meio sem Ca^{2+} . Esses resultados sugeriram que a hipotensão induzida pelo OEAC é devida a um relaxamento ativo do vaso, que é parcialmente

ocasionado por fatores dependentes da integridade do endotélio, mediado pelos receptores muscarínicos periféricos promovendo a liberação de ON, e predominantemente, mediado por fatores que independem da integridade do endotélio, através da inibição do influxo de Ca^{2+} para o interior da célula. Embora a bradicardia seja dependente principalmente da presença do tônus parassimpático para o coração (LAHLOU et al., 2005).

Em 2010, o efeito reflexo induzido pela administração do NF o principal constituinte do OEAC foi avaliado em ratos normotensos anestesiados, a administração do NF induziu um efeito hipotensor e bradicardizante dose-dependente que foi caracterizado por dois períodos (fase 1 e 2). O administração do NF diretamente no ventrículo esquerdo foi capaz de abolir o efeito hipotensor e bradicardizante da fase 1, efeito semelhante foi observado após a bivagotomia ou pelo tratamento perineural dos nervos vagos com capsaicina (CAP, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$). No entanto, permaneceu inalterado pelo pré-tratamento i.v. com capsazepina (1 mg/kg) ou ondasetron (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Em ratos acordados o NF (5 e 10 mg/kg) induziu um rápido efeito hipotensor e bradicardizante (fase 1) que foi completamente abolido pelo pré-tratamento com metilatropina (1 mg/kg, i.v.). Em conjunto esses resultados permitem sugerir que o OEAC e o NF induzem um efeito reflexo bradicardizante e hipotensor (fase 1) que é aparentemente resultado da estimulação das fibras C aferentes vagais pulmonares e não das fibras C aferentes cardíacas. Este efeito não parece envolver a ativação dos receptores vanilóides TPRV_1 nem dos receptores 5-HT₃ localizados em nervos sensoriais vagais. A resposta hipotensora da fase 2 parece ser resultado, pelo menos em parte, do efeito direto do NF no músculo liso vascular.

3.2. *Aniba Canelilla*

A *A. canelilla* é uma árvore medindo aproximadamente 10 m, seu tronco é retilíneo com um diâmetro em torno de 60 cm, (Figura 1), pertence a família Lauraceae. É uma planta abundante na região Amazônica do Brasil, sendo conhecida como “casca-preciosa”. A família Lauraceae encontra-se vastamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo composta por 49 gêneros e 2.500 a 3.000 espécies (WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil, existem aproximadamente 40 espécies de *Aniba* (MARQUES, 2001), dentre essas as mais utilizadas na culinária, em marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria, na indústria química e na medicina popular são: *Aniba burchelli*, *Aniba canellila*, *Aniba duckei*, *Aniba firmula*, *Aniba fragans*, *Aniba gardneri*, *Aniba guianensis*, *Aniba hastmanniana*, *Aniba parviflora*, *Aniba permolis*, *Aniba pseudocoto*, *Aniba rosaeodora*, *Aniba riparia* e *Aniba terminalis*.

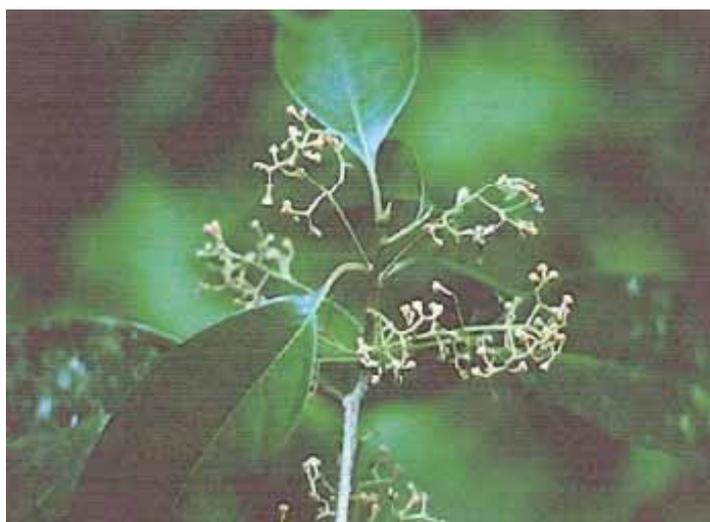


Figura 1. Folhas e flores da *Aniba canelilla*.

Fonte: http://www.s bq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias_Interessantes_de_Produtos_Naturais10.pdf.

A família Lauraceae difere das demais pela sua importância econômica. Algumas espécies são utilizadas pela indústria para a fabricação de vários produtos, como perfumes e medicamentos, porém a grande maioria das espécies é empregada pelas comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico de sua utilização (MARQUES, 2001).

Na família Lauraceae, o OE é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas nas folhas, na casca e no lenho (BARROS, 1997).

A *A. canelilla* faz parte de uma espécie historicamente importante na região amazônica por ter sido confundida com as árvores da canela (cinamomo). Pouco tempo após o descobrimento do Brasil os irmãos Pizarro, Francisco e Gonzalo, tomaram conhecimento que a canela crescia em abundância por trás da muralha Andina. Diante dessa informação os irmãos Pizarro, foram em busca da canela para romper o monopólio dessa especiaria, que naquela época estava na mão dos portugueses (PINTO, 1995). A canela era a especiaria mais procurada no mercado europeu, e seu comércio era bastante lucrativo. Durante a expedição, Pizarro determinou que o tenente Francisco Orellana descesse pelo rio Amazonas em busca de comida e Pizarro acompanhado de 80 espanhóis resolveu adentrar a mata. Após 2 meses de caminhada pensavam ter encontrado as árvores de canela, todavia, Pizarro não sabia que aquela não era o famoso cinamomo e sim a *A. canelilla* (PINTO, 1995). Anos mais tarde, os químicos Magalhães e Gottlieb (1960) identificaram que o OEAC continha o nitro-derivado odorífero conhecido como NF (Figura 2) que é o verdadeiro responsável pelo aroma de canela apresentado pela *A. canelilla* (PINTO, 1995).

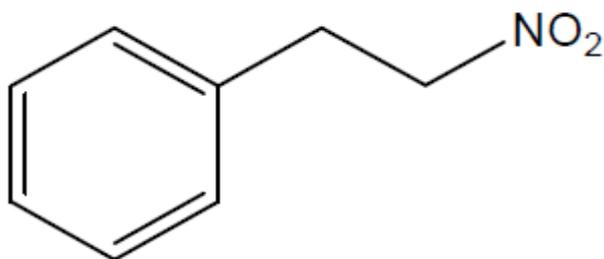


Figura 2. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (OGER et al., 1994)

Na medicina popular, decocções de cascas de *A. canelilla* são comumente usadas por seus efeitos antiespasmódicos, estimulante digestivo e por suas propriedades carminativas (MAIA et al., 2001). Suas folhas contêm 0,8% de OE do peso seco da planta, sendo considerado um rendimento relativamente baixo, uma vez que alguns óleos apresentam rendimentos por volta dos 6% (LIMA, 2004). A composição do OEAC varia de acordo com a estação climática, no período chuvoso, o NF chega a valores próximos a 95%, enquanto o ME permanece abaixo de 18%. Por outro lado, no período de estiagem, o NF reduz para 40%, enquanto o ME chega a 45%. O maior teor de NF foi encontrado nas folhas durante a estação chuvosa atingindo 95,3% da composição do óleo enquanto que o teor de ME foi de 0,2 % (TAVEIRA et al., 2003).

Pouco é conhecido acerca das ações farmacológicas do OEAC, Orger e colaboradores (1994), relataram sua propriedades fungistática. Também, foi relatado que esse OE possui efeitos relaxantes na musculatura lisa intestinal, justificando seu uso na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (MAIA et al., 2001). A atividade miorelaxante também foi demonstrada para o ME em íleo isolado de rato (LIMA et al., 2000), o que sugere que a atividade miorelaxante do OEAC pode ser, parcialmente, atribuída às ações do ME.

O NF possui atividade analgésica que provavelmente é de origem periférica, embora este mecanismo ainda não esteja completamente elucidado, no entanto, é provável que os receptores para opióides estejam envolvidos na sua atividade antinoceptiva (de LIMA et al., 2009). As cascas de *A. canelilla* possuem uma notável capacidade antioxidante, provavelmente atribuída à presença dos alcalóides benzil-tetra-hidroisoquinolona e tetra-hidroprotoberberina (da SILVA et al., 2007).

Estudos demonstram que os antioxidantes podem prevenir as doenças cardiovasculares. São várias as hipóteses que corroboram esse efeito protetor, dentre elas: i) a capacidade de retardar o desenvolvimento e progressão das lesões ateroscleróticas iniciais, através da redução da oxidação do LDL. As LDLs oxidadas estimulam as células endoteliais a produzirem quimiocinas e outros fatores que têm atividade quimiotática para monócitos causando adesão no endotélio e desencadeando a aterosclerose; ii) a redução do estresse oxidativo, promovendo uma melhora da função endotelial; iii) proteção contra episódios aterotrombóticos incluindo isquemia do miocárdico; iv) inibição da agregação plaquetária (LEIFERT; MAHINDA, 2008). Alguns trabalhos mostram ainda, a relação direta do uso de antioxidantes com redução da PA (SOARES DE MOURA et al., 2002; TOM et al., 2010; LEE et al., 2011).

3.3. Controle da Pressão Arterial

A homeostase do sistema cardiovascular é resultante da integração do sistema endócrino, nervoso e da regulação local do fluxo sanguíneo. A modulação cardiovascular da PA pelo sistema neural abrange a ativação de receptores

periféricos (pressorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares) (CHAPLEAU et al., 1989).

O barorreflexo é o principal responsável pela regulação momento a momento da PA, uma vez que exerce importante papel na regulação da FC, débito cardíaco, contratilidade do miocárdio, vasomotricidade e distribuição regional do fluxo sanguíneo (DI RIENZO et al., 2009).

Em 1927, Heinrich Ewald Hering estudou o reflexo carotídeo e propôs o seu funcionamento que continua sendo aceito até hoje. Hering observou que a manipulação mecânica do seio carotídeo induz alterações hemodinâmicas nos animais (HAIBARA; SANTOS, 2000). A partir deste momento várias investigações foram realizadas com o intuito de descrever melhor o funcionamento do controle barorreflexo arterial (KRIEGER, 1964; MICHELINI, 2008; CHAPLEAU et al., 1995; CHAPLEAU, 2001; IRIGOYEN et al., 2003).

Os receptores do controle barorreflexo arterial, denominados de pressorreceptores, estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo. E foram descritos como terminações nervosas livres localizadas na camada adventícia das artérias aorta e carótidas (KRAUHS, 1979).

Uma contribuição importante para a compreensão do controle central da PA foi dada através de estudos eletrofisiológicos e histológicos, os quais identificaram a região no núcleo do trato solitário (NTS) como a estrutura chave no controle reflexo da PA (MCCALL et al., 1977).

Quando o NTS é excitado através do IX e X pares cranianos pela ativação dos pressorreceptores irá projetar informações ao núcleo dorsal motor do vago e

núcleo ambíguo, determinando aumento do tônus vagal. Ainda, o NTS também estimula a região caudal do bulbo ventro lateral (CVLM) secretando o aminoácido inibitório γ -aminobutírico (GABA). O GABA inibe os neurônios pré-motores simpáticos localizados na região rostral do bulbo ventro lateral (RVLM), determinando a diminuição do tônus simpático (Figura 3) (MICHELINI, 2008; KORNET et al., 2005).

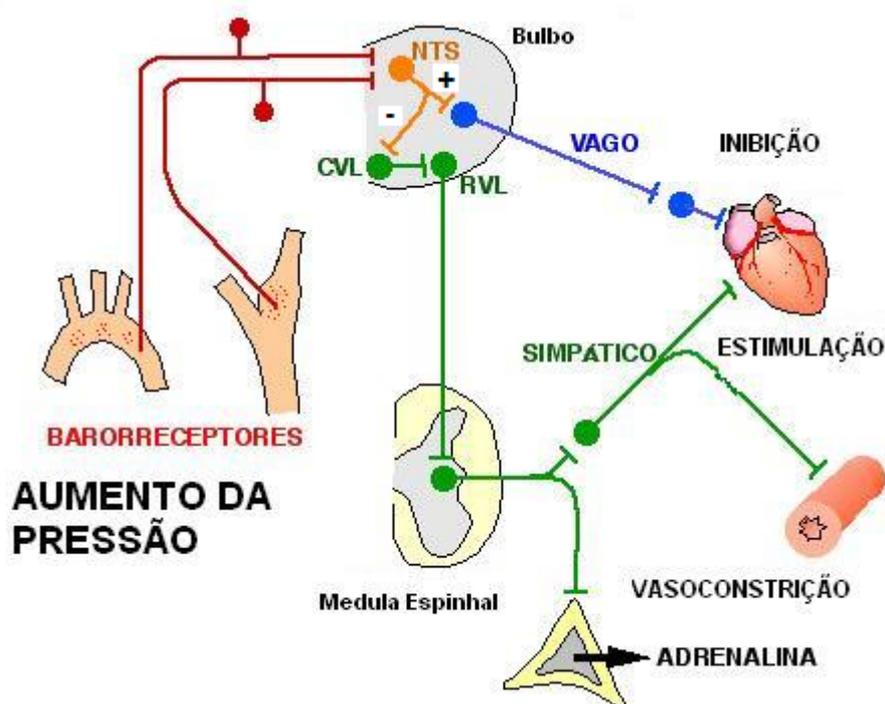


Figura 3. Arco barorreflexo

Fonte: http://www.uam.es/personal_pdi/medicina/algvilla/t_presion/baroreceptor.html

Outro importante reflexo no controle neural da circulação é o reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch (RBJ). Este reflexo é desencadeado pela ativação das fibras C cardiopulmonares, cujas terminações receptoras estão localizadas nas câmaras cardíacas e nos grandes vasos pulmonares. Essas fibras são estimuladas por substâncias químicas tais como: CAP, serotonina ou fenilbiguanida e alcaloides

da veratridina (MARK; DUNLAP, 2008). A ativação desses receptores induz hipotensão, bradicardia e apneia que caracteriza o RBJ (THOREN, 1979).

O sistema neural atua através dos mecanismos regulatórios centrais e periféricos. Os mecanismos periféricos que conduzem a informação para a periferia são determinados pela inervação autonômica adrenérgica e colinérgica e pela neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica (NANC).

3.3.1. Sistema nervoso autônomo

O SNA é um sistema que conduz as informações do SNC para regular os órgãos periféricos. É formado pelo componente simpático, pelo parassimpático e pelo sistema nervoso entérico. As fibras nervosas do SNA fazem sinapse num gânglio antes de alcançarem o órgão-alvo, desta forma as fibras que fazem a sinapse antes do gânglio são denominadas de fibras pré-ganglionares e as que fazem sinapse após o gânglio são as fibras pós-ganglionares. As fibras pré-ganglionares liberam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) sendo denominadas de fibras colinérgicas. No caso do sistema nervoso parassimpático, as fibras pós-ganglionares também são colinérgicas, no entanto as fibras pós-ganglionares simpáticas possuem como neurotransmissor a noradrenalina (NA) (GUYTON; HALL, 2006). Em alguns casos, o simpático libera a adrenalina, como por exemplo nas glândulas sudoríparas. A maioria dos órgãos recebe ambas as inervações, simpática e parassimpática. No sistema parassimpático periférico, a ACh atua nos receptores muscarínicos e nicotínicos, enquanto no sistema nervoso simpático a NA atua nos receptores adrenérgicos ou adrenorreceptores (AR) (KIRSTEIN; INSEL, 2004).

Neurotransmissão colinérgica

Os receptores nicotínicos são canais iônicos ativados por ligantes que medeiam um sinal de transmissão rápido e possuem uma estrutura pentamérica (KIRSTEIN; INSEL, 2004). Esses receptores se dividem em dois subtipos: Nn (neuronal) e Nm (musculares e ganglionares), os quais estão presentes no SNC, na junção neuromuscular e nos gânglios autonômicos (RYALL, 1982; EGLIN, 1996).

Os receptores muscarínicos são membros de uma grande família de receptores acoplados a proteína G (FREDRIKSSON et al., 2003) e são classificados em cinco subtipos, designados M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅. No coração, a ativação dos receptores muscarínicos M₂ (HAMMER; GIACHETTI, 1982) produz uma resposta cronotrópica e inotrópica negativa decorrente da inibição da enzima adenilato ciclase (AC), desencadeada pelo acoplamento do receptor a proteína Gi (MAEDA et al., 1988; EGLIN et al., 1996). Os locais de atuação do sistema parassimpático no coração são os átrios e os tecidos especializados na geração e condução do impulso elétrico (nodo sinoatrial, atrioventricular e fibras de Purkinje) (LEVY; SCHWARTZ, 1994). No endotélio, a predominância é do tipo M₃, cuja ativação induz a liberação de NO que se difunde para as células adjacentes do músculo liso causando relaxamento (FURCHGOTT, 1984; MONCADA, 1991).

Neurotransmissão adrenérgica

A NA produz seus efeitos nas células através da ligação aos AR e são divididos em diversas subclasses: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 e β_3 (DALLY; MCGRATH, 2011).

Há alguns anos, os β -adrenorreceptores (β -ARs) eram classificados em dois subtipos (β_1 e β_2) (LANDS et al., 1967), os quais pertencem à classe de receptores acoplados a proteína G, com sete domínios transmembranas. Mas, atualmente, é admitido que no sistema cardiovascular existam 3 subtipos de β -ARs, onde o subtipo β_3 apresenta uma estrutura molecular e um perfil farmacológico que o diferencia dos outros dois subtipos (ROSEC; GAUTHIER, 2006). Aparentemente, esse novo subtipo de receptor é ativado quando o tônus catecolaminérgico é alto (GAUTHIER et al., 2011). Os receptores β_3 são ativados pelos agonistas BRL 37344, SR58611 A, CGP 12177 A e cianopindolol e são bloqueados pelo SR 529230 A. Experimentalmente, foi verificado em roedores e coelhos que a estimulação desses receptores leva a um efeito inotrópico negativo (GAUTHIER et al., 2000; ROSEC; GAUTHIER, 2006 ; GAUTHIER et al., 2006).

No coração a ativação dos β -ARs é a principal forma de aumentar o desempenho cardíaco. No passado, apenas os β_1 e β_2 - ARs foram descritos no coração e apresentavam uma relação de aproximadamente 80:20 (β_1/β_2) (BRISTOW et al., 1986; KAUMANN; MOLENAAR, 1997; ATALA; CONSOLIM-COLOMBO, 2007). Classicamente, os efeitos da estimulação do β_1 -AR no coração, é cronotrópico e inotrópico positivo. Este último é decorrente da ativação da via do 3' 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (SARSERO et al., 2003). Zheng e

colaboradores (2004) verificaram que os efeitos da estimulação do β_1 -AR induz hipertrofia cardíaca e apoptose das células cardíacas. Algumas evidências sugerem que os efeitos prejudiciais da estimulação dos β_1 -AR em células cardíacas são provavelmente mediadas pela via de sinalização Ca^{2+} /calmodulina-dependente de quinase II, independente da cascata da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). No entanto, a ativação dos β_2 -AR pode proteger o coração por seus efeitos anti-apoptóticos e arritmogênico (ZHENG et al., 2004). A ativação dos 3 subtipos de AR no coração produz efeitos complexos, de acordo com o tipo de agonista, a densidade do subtipo de receptor e sua sensibilidade, podendo variar quando ocorre a presença de algumas doenças (WORKMAN, 2010). Zhou e colaboradores (2011) relataram que a expressão e função dos β_3 -AR exibem ritmo circadiano no coração normal e que este ritmo pode ser alterado em algumas doenças. A estimulação desses receptores foi associada à redução da ocorrência de taquicardia ventricular e arritmias (ZHOU et al., 2011). Segundo esses autores, tais dados sugerem a importância dos β_3 -AR nas desordens orginarias do ritmo circadiano cardíaco após o infarto do miocárdio.

Nos vasos a estimulação de β -ARs localizados na musculatura lisa e no endotélio levam ao relaxamento do MLV, controlando a distribuição do fluxo sanguíneo nos diferentes órgãos. Embora o subtipo β_2 seja predominante (LANDS et al., 1967), outros subtipos podem estar implicados neste controle e seu envolvimento varia de acordo com o leito vascular e a espécie animal (OSSWALD; GUIMARÃES, 1983 ; GAUTHIER et al., 2011). Em 2009, Olivier e colaboradores mostraram que na aorta de ratos, o principal receptor expresso é o subtipo β_3 , seguido do β_1 e depois do β_2 . Evidências experimentais apontam para que a

estimulação de β_3 no leito da artéria mesentérica, em camundongos knockout, leva à vasodilatação independente de eNOS. Esse subtipo de receptor foi associado à resposta vasorelaxante em pequenas artérias coronárias humanas agindo através da liberação de ON e através de fatores hiperpolarizantes dependentes do endotélio (DESSY, et al. 2004).

Os adrenorreceptores α_1 (α_1 -AR) existem em predominância, na musculatura lisa das artérias e arteríolas, sabe-se que os três subtipos do α_1 -AR contribuem para a regulação da PA destacando a participação para o α_{1A} e α_{1D} (COTECCHIA, 2010). Ao se ligar a esses receptores, a NA produz vasoconstrição, levando ao aumento da resistência vascular periférica (RVP) e consequentemente da PA (JACKSON et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2009).

Inserir informação sobre a participação constitutiva SHR

O receptor α_2 é conhecido como receptor pré-ganglionar, e também recebe o nome de auto-receptor. A atuação de um agonista nesse receptor inibe a liberação de NA, modulando sua resposta como uma alça reflexa de retroalimentação negativa (KINNAM; LEVINE, 1995; OSTOPOVICI-HALIP et al., 2011).

3.3.2. Neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica

A denominação NANC vem sendo utilizada para designar o conjunto de fibras do SNA em que os neurotransmissores da junção neuro-efetora não são a NA ou a ACh (BURNSTOCK, 1986; HOLZER, 1992; MAGGI, 1995a). Os neurotransmissores liberados do componente sensorial NANC são neuropeptídeos. O primeiro neuropeptídeo a ser descoberto liberado por essas fibras foi a substância P (SP). Outros neuropeptídeos são o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP),

o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (BRAIN; COX, 2006).

Os neurônios sensoriais que secretam os neuropeptídeos são as fibras-C não-mielinizadas e as fibras mielinizadas A δ . Esses neurônios fornecem uma densa inervação para a maioria dos órgãos e tecidos, em especial para os vasos sanguíneos, onde os nervos perivasculares frequentemente terminam em estreita associação com as células endoteliais (BRAIN; COX, 2006).

Esses neuropeptídeos liberados atuam em células alvo, produzindo diversos efeitos biológicos, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, alterações na contratilidade do músculo liso, cronotropismo positivo, degranulação de mastócitos e uma variedade de efeitos sobre leucócitos e fibroblastos (MAGGI, 1995b).

A CAP é capaz de estimular seletivamente subtipos de neurônio aferente primário sensível a vanilóide (VSPA), tais como a fibra C e A δ levando a liberação de neuropeptídeos (JANCSÓ et al., 1967). Após este efeito os neurônios tornam-se dessensibilizados e impossibilitados de conduzir novos estímulos. Dependendo da concentração e do tempo de exposição a este agente, ocorrem as ações neurotóxicas, com consequente degeneração (JANCSÓ et al., 1967; MAGGI; MELLI, 1988; HOLZER, 1991). A CAP atua em TRPV1 e o primeiro antagonista descrito para este receptor foi a capsazepina em 1992 por Bevan e colaboradores. A liberação de neuropeptídeos destas fibras pode ser modulada por ação de diversas substâncias tais como a 5-hidroxitriptamina (receptor 5-HT₁), ácido γ -aminobutírico (receptor GABA), histamina (receptor H₃) e também NPY, peptídeos opióides endógenos, somatostatina, o VIP e galanina (MAGGI, 1991).

Alguns estudos mostram que as fibras nervosas sensoriais primárias, sensíveis à CAP encontram-se distribuídas por todo o sistema cardiovascular (BARJA et al., 1983; WHARTON et al., 1986), especialmente nas artérias de resistência, sugerindo que esses nervos possam estar envolvidos na regulação da homeostase cardiovascular (MULDERRY et al., 1985). Essas fibras são encontradas na camada adventícia e são ativadas por estímulos químicos e mecânicos (MAGGI; MELI, 1988; HOLZER, 1992). A ativação das terminações periféricas dos nervos sensoriais elucida uma função aferente – quando a informação é percebida e transmitida para o SNC, iniciam-se reflexos voluntários e autonômicos – e uma função eferente, através da qual neurotransmissores são liberados das terminações periféricas, induzindo o relaxamento arteriolar e o aumento da permeabilidade das vênulas (MEEHAN; KREULEN, 1992).

Os nervos sensoriais perivasculares liberam vários neurotransmissores, incluindo a SP e o CGRP. Adicionalmente, os nervos sensoriais na mesentérica podem exercer o papel fisiológico na coordenação, por ativação reflexa, do fluxo mesentérico com alterações da motilidade intestinal (MEEHAN; KREULEN, 1992). Apesar de ser separado por várias camadas de células do MLV, podem ocorrer interações entre o endotélio e os nervos perivasculares. Assim, o ON que se difunde facilmente, através das membranas, pode modular a liberação do neurotransmissor contrátil dos nervos simpáticos nos vasos sanguíneos. Logo, é possível que uma lesão no endotélio, onde há perda de mecanismos vasorrelaxantes e potencialização das respostas contráteis, os nervos sensoriais assumam um papel mais importante na regulação do tônus vascular (RALEVIC, 2002)

Com relação ao controle da PA sabe-se que um dos fatores que a influencia é a regulação do fluxo simpático, onde tradicionalmente o papel do sistema nervoso sensorial sobre a regulação desse fluxo é exercido através de mecanismos do barorreflexo. No entanto, recentemente achados apontam que os nervos sensoriais somáticos sensíveis a CAP e seus neuropeptídeos exercem uma influência reguladora sobre a atividade simpática. O gânglio da raiz dorsal contém corpos celulares de neurônios sensíveis ao CGRP, os quais enviam axônios para os tecidos periféricos (coração, vasos sanguíneos e rins) e centralmente para o corno dorsal da medula espinhal. Essas aferências sinápticas com as células intermediolateral da coluna espinhal, contém os neurônios pré-ganglionares sinápticos. Esta ligação fornece evidências morfológicas apoiando a hipótese de que os aferentes primários podem influenciar a regulação da atividade simpática ao nível da medula espinhal e assim, a função cardiovascular tardia (WANG; WANG, 2007). Recentemente, Yang e colaboradores demonstraram que a estimulação dos TRPV1 promovem liberação de ON e reduzem a PA (YANG et al., 2010).

3.4. Mecanismos vasculares

O músculo liso encontrado na camada média dos vasos sanguíneos apresenta características do músculo liso unitário, o que significa que se comporta como um sincício funcional (GUYTON, 2006). As células do MLV são células que apresentam aspecto fusiforme com um comprimento de 30 a 60 μm e um diâmetro relativamente constante de 4 μm . O núcleo da célula se localiza no centro e tem forma elipsóide e compreende 20-30% do volume celular. O sarcolema no músculo liso apresenta em torno de 2 a 6% do volume celular e possui uma bicamada lipídica

rica em subunidades proteicas. O retículo sarcoplasmático (RS) existe como uma estrutura tubular, mas apresenta uma organização diferente daquela observada no músculo estriado. Não há sarcômeros bem definidos, porém apresentam estruturas chamadas “corpos densos” (análogos dos discos Z dos músculos estriados) que funcionam como meios de transmissão de forças mecânicas, de maneira a proporcionar um acoplamento entre os miofilamentos e o estroma do tecido conectivo (BOLTON et al., 2002).

As principais proteínas envolvidas no processo de contração do músculo liso são: miosina, actina, caldesmon e tropomiosina. A miosina é composta por duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. A actina é uma proteína globular e sua forma é de um filamento helicoidal duplo. A calmodulina é uma proteína multifuncional ligante de Ca^{2+} , sendo um importante mediador de muitos efeitos regulatórios inclusive na contratilidade do músculo liso. O caldesmon apresenta uma estrutura dimérica que se encontra associada à actina na ausência de Ca^{2+} . Em presença deste íon, forma-se o complexo Ca^{2+} -calmodulina que se liga ao caldesmon deslocando-o da sua ligação com o filamento de actina, expondo assim os seus sítios de ligação com a miosina. A tropomiosina é uma proteína fibrosa, que junto com o caldesmon ocupa o sulco formado pelos dois filamentos de actina (PAIVA; FARIAS, 2005).

3.4.1. Íons de cálcio e seus canais

A contração do MLV é regulada principalmente pela concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e pela sensibilidade dos elementos contráteis a este íon.

No MLV, a principal origem do Ca^{2+} mioplasmático é o meio extracelular, cuja entrada é mediada: pelos canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs), pelos canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs), pelos canais para cátions não-seletivos e pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Além disso, o RS também contribui para o aumento do Ca^{2+} intracelular, cuja liberação pode ser mediada pelo IP_3 ou pelo próprio Ca^{2+} (WELLMAN et al., 2003).

No MLV, a variação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é bastante estreita, variando de 100 nM, quando as artérias estão completamente dilatadas a 350 nM em artérias contraídas (FARACI et al., 1996; KNOT et al., 1998). A entrada de Ca^{2+} através dos VOCCs é determinada pelo potencial de membrana (E_m) celular que é modulado por vários tipos diferentes de canais iônicos, incluindo os canais para K^+ , Cl^- e outros cátions (WELLMAN et al., 2003).

Os ROCCs são ativados pela ligação de hormônios, neurotransmissores ou fármacos a receptores específicos localizados na membrana das células musculares lisas, cuja contração acontece através de um mecanismo semelhante. Dentre estas substâncias pode-se citar a NA, a adrenalina, a serotonina, a endotelina-1, a angiotensina II, etc.

No músculo liso, o acoplamento excitação-contração se faz através de dois mecanismos principais: um eletromecânico e outro farmacomecânico (SOMLYO et al., 1994). O eletromecânico inicia-se com a despolarização da membrana plasmática decorrente da entrada de íons (Na^+ e K^+) alterando a diferença de potencial transmembrana e promovendo a abertura de VOCCs (PAIVA; FARIAS, 2005). Essa despolarização induz a difusão de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula (NELSON et al., 1990).

No MLV estão presentes dois tipos de canais para cálcio, o canal tipo L (*long lasting*) e o canal do tipo T (*transient*). No MLV existe predominância dos canais tipo L, sendo este responsável pela principal via de entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular (CRIBBS, 2006). Após a despolarização da membrana os canais tipo L se abrem e seu fechamento acontece quando a membrana é repolarizada ou hiperpolarizada (PAIVA; FARIAS, 2005).

O acoplamento farmacomecânico envolve a interação de agonistas com os seus receptores na membrana das células musculares lisas, que, em sua grande maioria, são receptores formados por sete domínios transmembranais e acoplados a um complexo de proteínas G (α , β e γ) (MELDRUM et al., 1991) (Figura 4). No estado inativado, estas proteínas G estão acopladas entre si e a subunidade alfa está ligada ao difosfato de guanosina (GDP). Durante a ativação, ou seja, quando o ligante se liga ao seu receptor, esse complexo protéico é ativado, e a subunidade G_{α} , então ativada, liga-se agora ao trifosfato de guanosina (GTP). A subunidade alfa-GTP se dissocia das demais e estimula a atividade da fosfolipase C (PLC). Esta enzima hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), um fosfolipídio de membrana, em dois potentes segundos mensageiros: o IP_3 e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 atua no RS induzindo a liberação de Ca^{2+} e o DAG, junto com o Ca^{2+} , ativa a proteína quinase C (PKC), responsável pelo aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , fosforilação da cadeia leve da miosina e pelo aumento da condutância iônica dos canais transmembranais (tipo L). Os ésteres de forbol são utilizados para ativar a PKC, imitando as ações desenvolvidas pela DAG e causam a contração do músculo liso (WEBB, 2003).

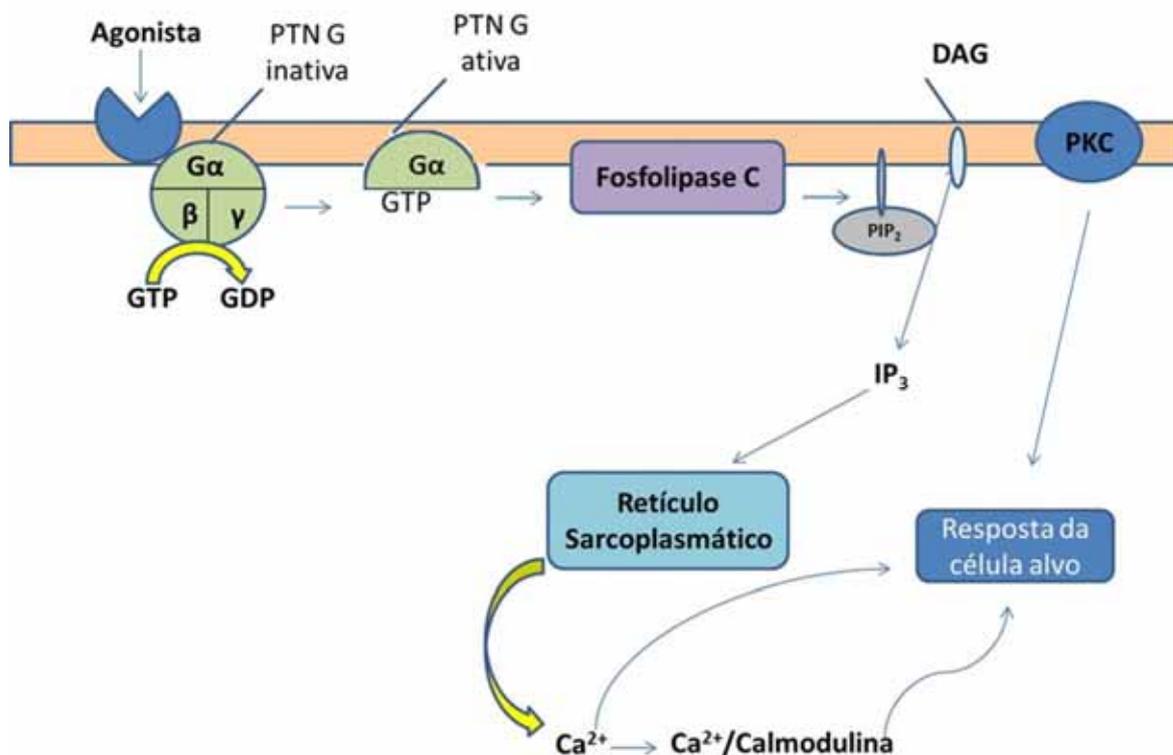


Figura 4. Mecanismo de ação de determinado agonista no acoplamento farmacomecânico.

3.4.2. Contração Muscular

O processo de contração inicia-se com o aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma (VOROTNIKOV et al., 2002). Os canais iônicos são importantes na regulação da contração do músculo liso, pois atuam modulando o E_m e consequentemente da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (GOLLASCH et al., 2000). O Ca^{2+} presente no citoplasma liga-se a quatro sítios presentes na calmodulina formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Essa ligação do Ca^{2+} com a calmodulina altera sua conformação permitindo a interação com a Quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Para que a miosina seja fosforilada é necessário a associação do complexo Ca^{2+} -calmodulina com a MLCK que altera a conformação do complexo deslocando a

sequência auto-inibitória. Após a fosforilação da miosina esta torna-se apta a interagir com a actina formando o complexo actino-miosina (HUXLEY et al., 1954). Durante o repouso, os sítios de ligação da actina com a miosina estão encobertos pelo complexo tropomiosina-caldesmon, presente em toda extensão dos filamentos finos. A modificação conformacional do caldesmon (ocasionada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina) libera a tropomiosina, tornando exposto os sítios de ligação da actina proporcionando a formação do complexo actino-miosina. Contudo o processo de contração do MLV depende de dois componentes: ativação da miosina através de sua fosforilação e a ativação da actina pela saída do complexo tropomiosina-caldesmon. Vale salientar que para a realização do processo acima descrito é necessária energia proveniente da hidrólise do ATP pela ATPase da miosina (HOROWITZ et al., 1996).

O desenvolvimento da contração do músculo liso é na maioria das vezes decorrente da fosforilação da cadeia regulatória da miosina, no entanto o caldesmon exerce um efeito modulatório neste processo (HOROWITZ et al., 1996). No mesmo momento em que a PKC é ativada, ocorre a ativação do GTP ligado à proteína Rho-A. O mecanismo preciso de ativação desta última pela proteína G ainda não está claro, mas envolve um fator de troca do nucleotídeo guanina (RhoGEF) e a migração do Rho-A da membrana plasmática. Após a ativação, o aumento do Rho-quinase leva a inibição da miosina fosfatase (Figura 5) contraindo a célula (WEBB, 2003).

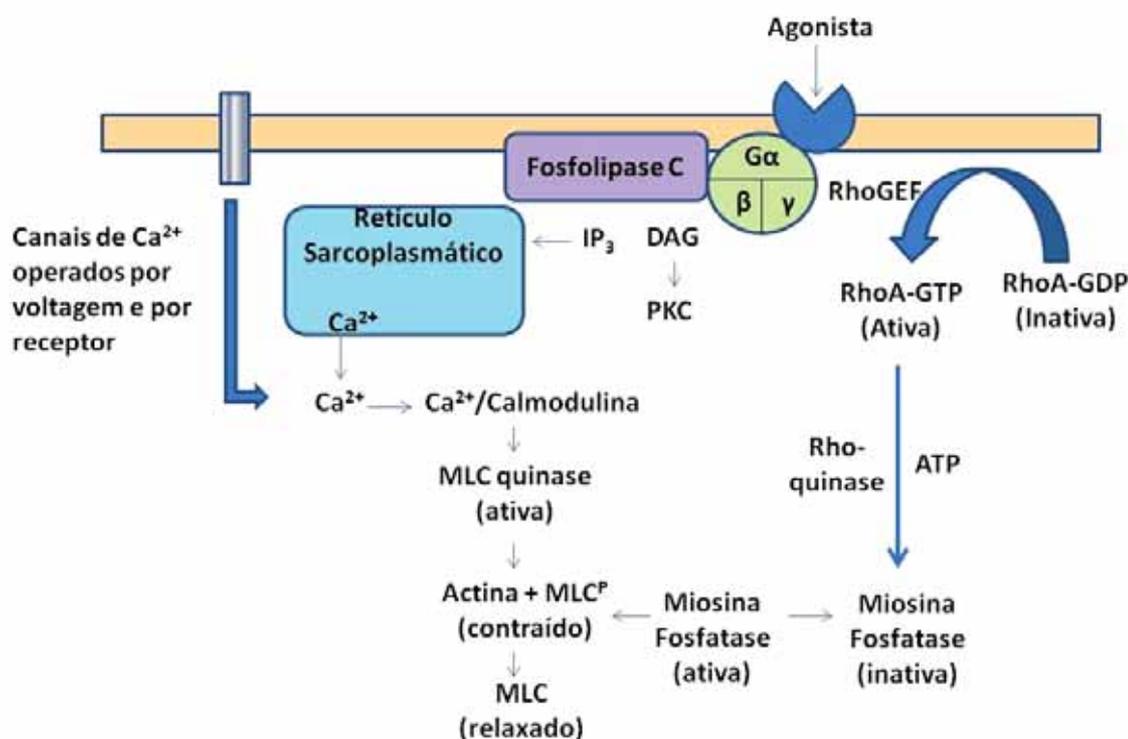


Figura 5. Regulação da contração do músculo liso. Vários agonistas atuam em receptores específicos ocasionando a contração do músculo liso. Subseqüente a ligação, ocorre aumento da atividade da PLC. A PLC produz a partir do PIP₂ o DAG e o IP₃. O IP₃ se liga aos receptores específicos no RS, liberando Ca²⁺. O DAG junto com o Ca²⁺ ativa a PKC, que fosforila proteínas específicas. O Ca²⁺ ativado liga-se a calmodulina, promovendo a ativação da miosina quinase de cadeia leve (MCL quinase).

3.4.3. Relaxamento muscular

Estabelecida uma contração, o relaxamento do MLV pode ocorrer por vários processos que, na maioria dos casos, é devido à redução da [Ca²⁺]_i. Esta redução é ocasionada pelo sequestro do Ca²⁺ através do RS ou pela extrusão pelas Ca²⁺ ATPases da membrana plasmática, levando à dissociação do complexo calmodulina-MLCK. A enzima fosfatase da cadeia leve da miosina desfosforila a miosina, diminuindo o número de pontes actina-miosina (HAI et al., 1989).

Substâncias como o ON e o fator atrial natriurético aumentam a concentração do 3`5`-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) o qual na PKG promovendo o relaxamento do MLV através da redução da $[Ca^{2+}]_i$ em células isoladas e tecidos intactos (RAPAPORT et al., 1985; KARAKI; WEISS, 1988). Esta redução, mediada pela via GMPc/PKG, pode envolver as seguintes vias:

- abertura de canais para K^+ e consequente hiperpolarização, causando uma diminuição do influxo do Ca^{2+} (ROBERTSON et al., 1993)
- diminuição da entrada do Ca^{2+} independente da alteração do E_m , como o efeito do 8-bromo-GMPc em células musculares vasculares (ISHIKAWA et al., 1993)
- ativação da bomba Ca^{2+} -ATPase do RS e da membrana citoplasmática, dependente do GMPc com consequente diminuição do Ca^{2+} livre no citoplasma (POPESCU et al., 1985; TWORT; VAN BREEMAN, 1988)
- aumento da atividade trocadora Na^+/Ca^{2+} (NCX) como evidenciado em aorta isolada de rato (ITOH et al., 1983)

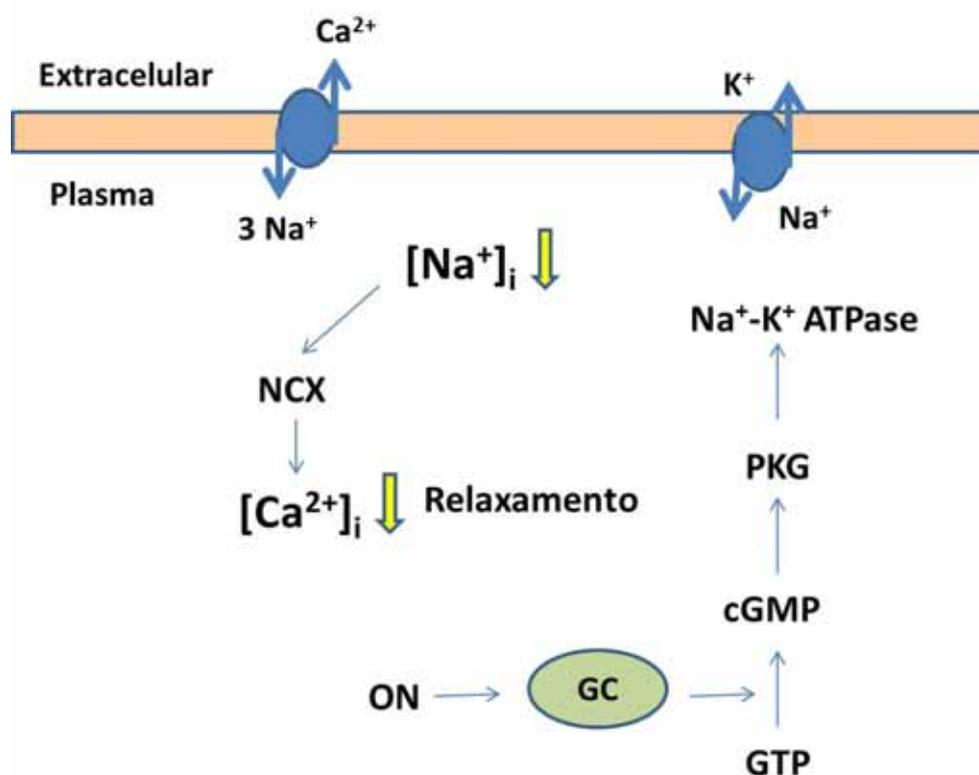


Figura 6. A ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) pelo GMPc. GC, guanilato ciclase; ON óxido nítrico; PKG, GMPc dependente (Adaptado de NISHIMURA, 2006).

NISHIMURA (2006), verificou que o ON induz relaxamento no MLV principalmente através da ativação da guanilato ciclase (GC) solúvel, que atua no GTP gerando o GMPc. O relaxamento mediado pelo GMPc envolve uma diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através da ativação da Ca^{2+} -ATPase presente tanto na membrana plasmática como no RS, como também através da Na^+/K^+ ATPase e os vários canais para K^+ . O estímulo da bomba Na^+/K^+ ATPase encontrada na membrana plasmática é dado pela proteína quinase dependente de GMPc (PKG), com a ativação da PKG e conseqüentemente da bomba, ocorrendo uma diminuição da concentração intracelular de Na^+ , que estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e resulta na diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 6). Ainda, segundo Nishimura, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também poderia estar envolvido na redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediada pelo AMPc. O isoproterenol (agonista

β -adrenérgico), por exemplo, atua no receptor ativando a proteína G que estimula a AC. O aumento de AC via isoproterenol ou forskolin (um ativador da AC) leva a produção do AMPc pela quebra do ATP. Este AMPc atua sobre a PKA que estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, causando a saída de Ca^{2+} do interior celular e aumentando a entrada do Na^+ . Conseqüentemente, ocorre uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o que leva ao relaxamento (Figura 7). O relaxamento do músculo liso também pode ocorrer devido ao aumento de AMPc cujo mecanismo principal é a fosforilação da MLCK via PKA, reduzindo à sua afinidade pela calmodulina (MCDANIEL et al., 1991; SOMLYO et al., 1994). Além disso, o AMPc pode reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} no MLV (CHEN et al., 1992) e/ou por ativar canais para K^+ levando à hiperpolarização de membrana e redução do influxo de Ca^{2+} via VOCCs (LINCOLN et al., 1990; SADOSHIMA et al., 1988). De acordo com estes últimos autores, durante o relaxamento do MLV induzido pelo AMPc pode ocorrer: **i)** hiperpolarização da membrana pela ativação de canais para K_{Ca} e inativação de canais para Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L; **ii)** inibição da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares; **iii)** redução da fosforilação da cadeia leve da miosina; **iv)** aumento do efluxo de Ca^{2+} .

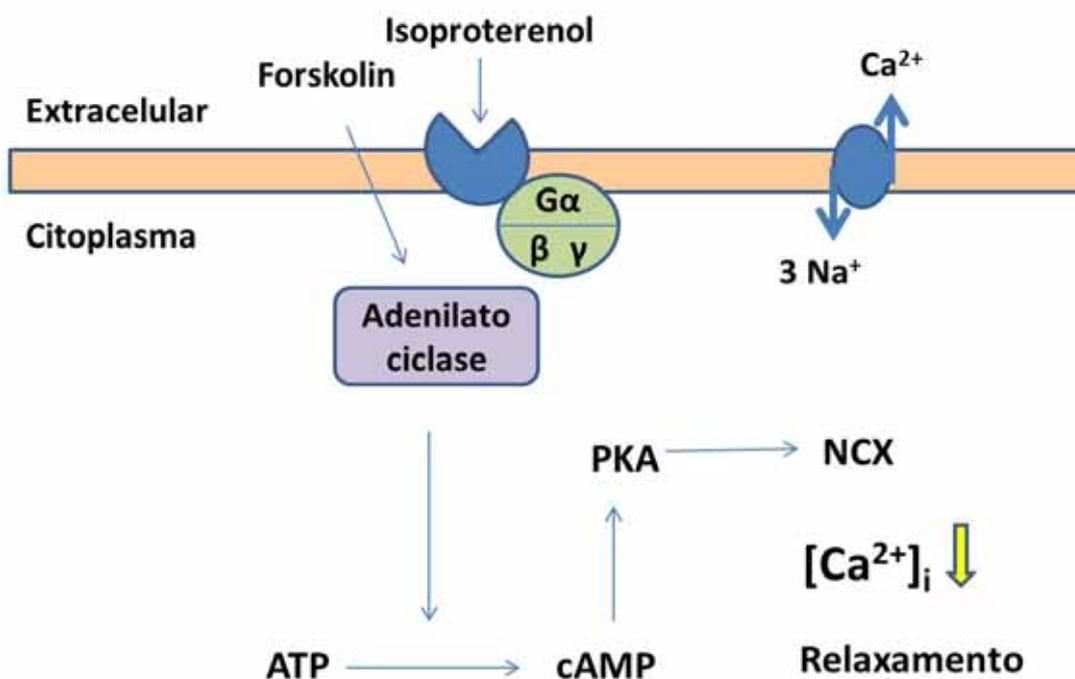


Figura 7. A ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) pelo AMPc. AC, adenilato ciclase; Gs, proteína G ligado ao GTP; PKA, proteína quinase dependente-AMPc (Adaptado de NISHIMURA, 2006).

O mecanismo primário para a diminuição do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido pelo aumento do AMPc é a ativação da PKG (LINCOLN et al., 1990). Embora a PKG seja ativada pelo aumento de GMPc, altas concentrações de AMPc no meio intracelular também pode ativá-la (FRANCIS; CORBIN, 1994). Assim, o relaxamento do MLV mediado pelo AMPc pode também ser devido a fosforilação via PKG e a ativação de proteínas que atuam na homeostasia do Ca^{2+} intracelular, incluindo a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (LOHMANN et al., 1997).

Na figura 8, pode-se observar que a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é consequente a atuação da Ca,Mg -ATPase tanto no RS como na membrana plasmática, e também pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, resultando na redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O complexo Ca^{2+} /calmodulina não será formado e consequentemente ocorrerá a inativação MLCK, desviando o balanço de atividade quinase para fosfatase, o que

resultará em desfosforilação da cadeia leve de miosina e relaxamento muscular (WEBB, 2003).

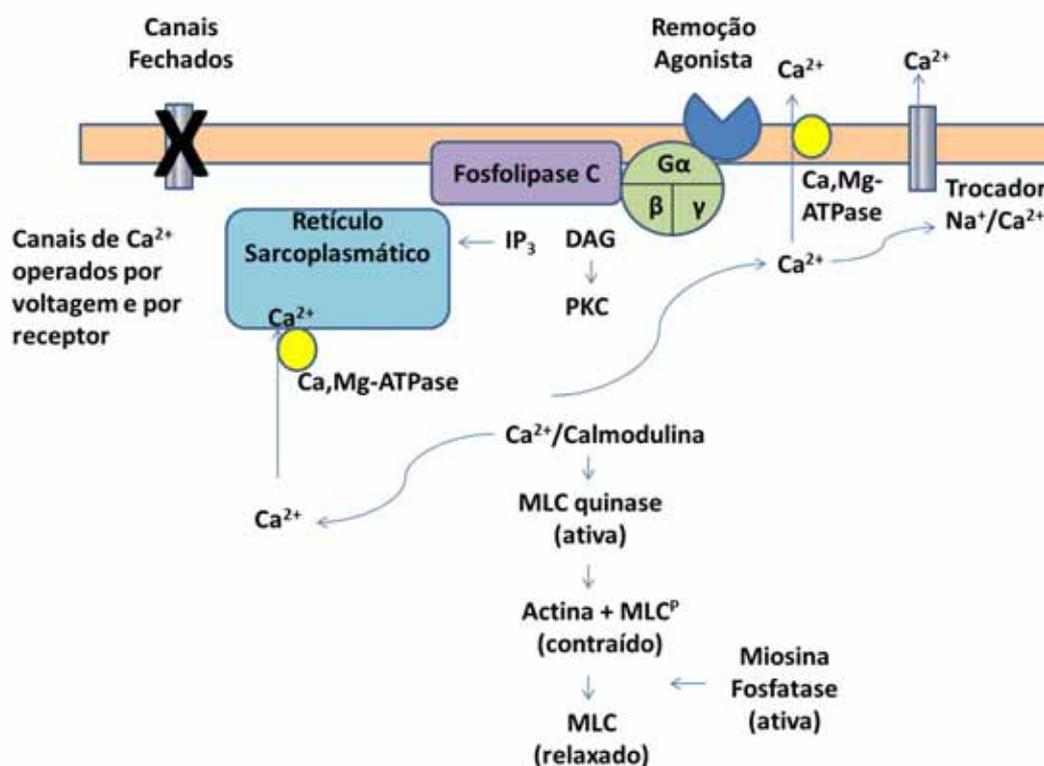


Figura 8. Relaxamento do músculo liso. O processo de relaxamento requer uma concentração intracelular diminuída de Ca²⁺ e uma atividade aumentada da miosina fosfatase de cadeia leve de miosina (MLC fosfatase). O retículo sarcoplasmático (RS) e a membrana plasmática contém a Ca,Mg-ATPase que remove o Ca²⁺ do citosol. O trocador Na⁺/Ca²⁺ localizado na membrana plasmática também reduz a [Ca²⁺]_i. Durante o relaxamento, os canais de Ca²⁺ operados por voltagem ou por receptor presente na membrana plasmática permanecem fechados resultando na diminuição da entrada de Ca²⁺ para a célula (Adaptado de WEBB, 2003).

No MLV, o relaxamento produzido por algumas substâncias como ADP/ATP, adenosina, histamina, trombina e ACh são mediados pelo endotélio vascular através da liberação do ON ou do chamado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FRDE) (RAPAPORT et al., 1985, FELETOU; VANHOUTTE, 1988). O ON é formado em células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina, na presença da enzima NOS (VANHOUTTE, 2003). A ativação da NOS é dependente da [Ca²⁺]_i nas células endoteliais, sendo Ca²⁺/calmodulina dependente. O ON se difunde das células

endoteliais para o MLV, onde atua estimulando a enzima GC, que catalisa a produção de GMPc, causando a inibição do processo contrátil (Figura 9) (VANHOUTTE, 2003).

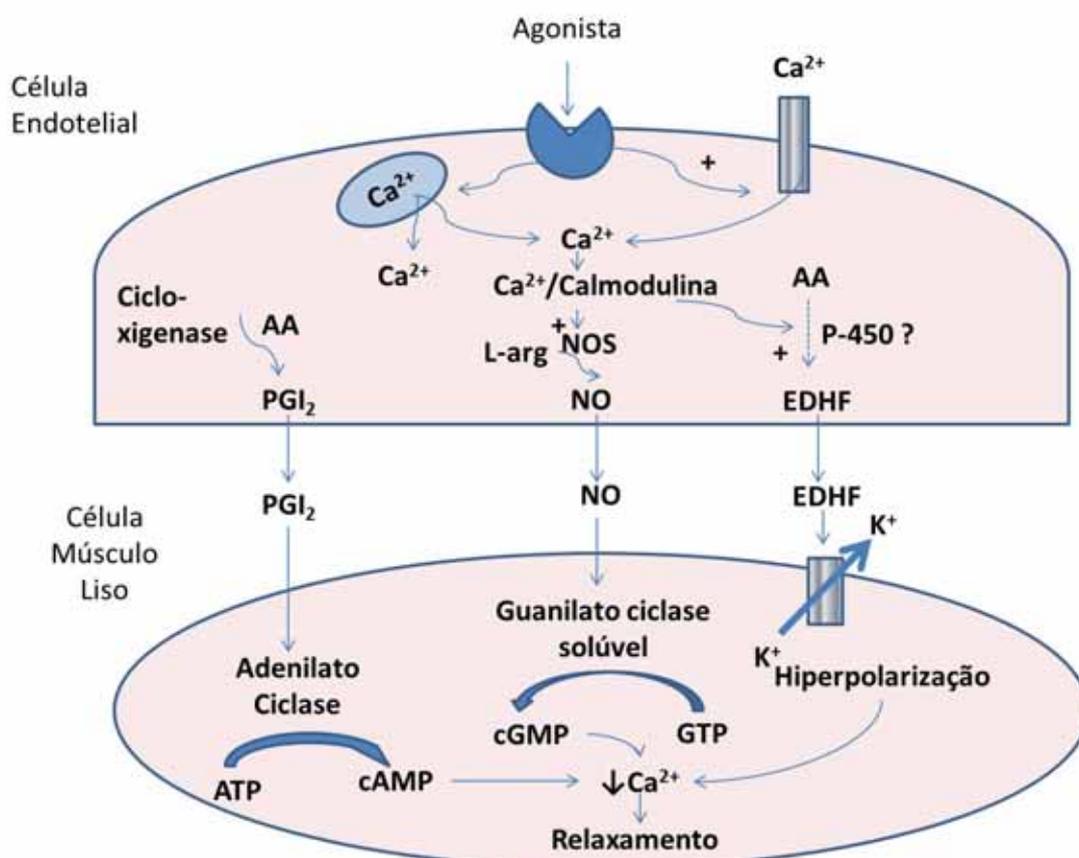


Figura 9. Substâncias secretadas pelo endotélio. O papel do aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} na liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE). A ativação de receptores endoteliais induz um influxo de Ca^{2+} no citoplasma da célula endotelial. Após a interação do Ca^{2+} com a calmodulina, ativa a NO-sintetase e as cicloxigenases, e leva a liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE). O ON causa relaxamento pela ativação e formação de GMP cíclico (GMPc) a partir do GTP. FHDE causa hiperpolarização e relaxamento pela abertura dos canais de K^+ . As prostaciclina (PGI_2) causam relaxamento pela ativação da AC que conduz a formação de AMP cíclico (AMPc). Quando os agonistas ativam as células endoteliais, o aumento do IP_3 pode contribuir para o aumento de Ca^{2+} citoplasmático liberado pelo RS (Adaptado de VANHOUTTE, 2003).

Além de atuar sobre o processo de relaxamento, o ON atua inibindo a proliferação celular, a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos à parede vascular, além de ser um ativador do processo fibrinolítico (VANHOUTTE, 2003). Sendo, portanto, considerado o fator de origem endotelial mais importante e quando a sua síntese e/ou liberação está reduzida compromete a homeostasia do endotélio vascular.

3.5. Tratamento farmacológico da hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (WRIGHT et al., 1999; PADWAL et al., 2001; WILLIAMS, 2010).

Existem diversas hipóteses a respeito da patogênese da hipertensão arterial. Um dos primeiros pesquisadores a tentar explicar a patogênese da hipertensão arterial foi Goldblatt em 1934, argumentando que uma diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente uma redução de oxigênio nos rins (isquemia) poderia de alguma forma induzir a hipertensão. Para testar esta idéia, Goldblatt restringiu parcialmente o fluxo de grandes artérias renais de cães e essa constrição parcial de ambas as artérias renais resultam em um aumento persistente e reprodutível na PA. Neste trabalho também foi realizada a oclusão de outras grandes artérias como a femoral e a esplênica, porém essa oclusão não induziu nenhum efeito, indicando que a hipertensão resultava especificamente da isquemia renal.

Entretanto, Grassi (2004) enfatizou a atividade do sistema nervoso simpático, que em indivíduos hipertensos, apresenta-se em um estado reativo hiperadrenérgico crônico. Outra hipótese importante considera a microcirculação como a principal causa da hipertensão e de suas manifestações iniciais nas doenças cardiovasculares (STRUIJKER et al., 1992; MULVANY, 1993).

Vale salientar que hipertensão arterial é caracterizada quando os níveis pressóricos são iguais ou superiores a 140/90 mmHg, quando encontrado em pelo menos duas aferições, no mesmo momento (VI Consenso Brasileiro de HAS). A tabela a seguir mostra a classificação dos níveis de PA em adultos.

Tabela 1. Classificação da hipertensão (VI Consenso Brasileiro HAS).

| Classificação | Pressão Arterial Sistólica (mmHg) PAS | Pressão Arterial Diastólica (mmHg) PAD |
|----------------------------------|--|---|
| Normal | < 130 | < 85 |
| Normal limítrofe | 130 -139 | 85 – 89 |
| Hipertensão leve (estágio 1) | 140 – 159 | 90 – 99 |
| Hipertensão moderada (estágio 2) | 160 – 179 | 100 – 109 |
| Hipertensão grave (estágio 3) | ≥ 180 | ≥ 110 |
| Hipertensão sistólica (isolada) | ≥ 140 | < 90 |

Atualmente existe um grande número de drogas disponíveis para tratar a hipertensão. Ensaios clínicos com diferentes drogas anti-hipertensivas têm mostrado o impacto positivo do tratamento farmacológico na morbimortalidade cardiovascular (COLLINS et al., 1990; PEREZ et al., 2009; PEREZ; MUSINI, 2008; CHEN et al., 2010, PSATY et al., 2003). Várias classes farmacológicas estão disponíveis, como

os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (RIEGGER et al., 1982; SCHIFFRIN et al., 1994), os antagonistas do receptor AT_1 (PITT et al., 2000), os antagonistas dos canais para Ca^{2+} (BÜHLER et al., 1985), bloqueadores dos receptores β_1 adrenérgicos (SCHIFFRIN et al., 1994) e os diuréticos (ZENG et al., 2011).

O antagonismo dos receptores β_1 -adrenérgicos atua na regulação da circulação através de diversos mecanismos, incluindo redução na contratilidade do miocárdio e da FC, conseqüentemente, do débito cardíaco (MOLENAAR et al., 2007). Os antagonistas do receptor de angiotensina II superam teoricamente algumas desvantagens dos IECA, já que estes últimos não apenas impedem a conversão de angiotensina I em angiotensina II, mas também impedem a degradação de bradicinina e de SP mediada pela ECA, o efeito colateral mais importante dos IECA é a tosse seca que é muito improvável de ocorrer com o uso dos antagonistas do receptor da angiotensina II uma vez que essa classe de medicamentos não exerce efeito sobre a ECA melhorando assim a qualidade de vida de seus usuários (ROSA et al., 2002; WRIGHT; MUSINI, 2010).

O uso dos antagonistas do canal para Ca^{2+} na hipertensão arterial é decorrente do aumento da resistência vascular periférica nesta doença, uma vez que a contração do MLV é dependente da $[Ca^{2+}]_i$ livre. Sendo assim, a inibição da movimentação transmembranar de Ca^{2+} deve diminuir a quantidade total de Ca^{2+} que alcança os sítios intracelulares. Os bloqueadores dos canais para Ca^{2+} diminuem a PA pelo relaxamento do músculo liso arteriolar e pela diminuição da RVP (RINALDI; CINGOLANI, 1994). Os antagonistas de canais para Ca^{2+} constituem um grupo heterogêneo de drogas, existindo, no presente, quatro famílias

distintas: os derivados das diidropiridinas (como, por exemplo, nifedipina, felodipina, lacidipina e amlodipina), dos benzotiazepínicos (como, por exemplo, diltiazem), das fenilalquilaminas (como, por exemplo, verapamil) e tetralol (mebefradil) (PITT, 1997).

Foi demonstrado que a associação de fármacos com mecanismo de ação semelhante traz poucos benefícios adicionais. No entanto, o uso concomitante de fármacos que pertencem a diferentes classes é uma estratégia para se atingir o controle efetivo da PA, além de ser possível reduzir a dose terapêutica de cada grupo do medicamento reduzindo assim os efeitos adversos (STUMPE, 1992).

Apesar da existência de vários fármacos para o tratamento da hipertensão, cada vez mais se busca novas drogas, visto que esta doença é uma das principais causas de morte entre adultos sendo responsável por aproximadamente 40% dos óbitos no Brasil (SBH, 2002). Portanto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes que possam oferecer novas ações terapêuticas. Neste sentido, o uso de fitomedicamentos para o tratamento da hipertensão pode ser uma alternativa terapêutica.

4. METODOLOGIA

4.1. Extração e análise química

As cascas do *A. canelilla* foram coletadas durante o período chuvoso, maio de 2005 na área do Rio Cauaxi, município de Paragominas, sudeste do Estado do Pará, Brasil. Sua identificação foi confirmada pelo Dr. da Silva M.H.L. (Departamento de Botânica, Museu Emílio Goeldi, Belém, Brasil). Um voucher (# 174904) foi depositado no herbário do Museu Emílio Goeldi, na cidade de Belém, Pará, Brasil. O OEAC foi cedido pelo Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia da Universidade Federal do Pará.

O OEAC foi obtido das cascas da planta, as quais foram secas em ar seco, moídas e submetidas à hidrodestilação (100g, 4h), usando um aparelho do tipo Clevenger. A análise do OEAC foi feita em cromatografia gasosa (Finnigan Mat Inços XL) e espectrometria em massa (GC/MS). Resumidamente, utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida WCOT DB-5MS (30 m x 0.25 mm; espessura de 0.25 µm); temperatura programada de 60 a 240 °C (3 °C/min); temperatura do injetor 220 °C; gás: hélio, ajustado à velocidade linear de 32 cm/s (medido a 100 °C); fluxo de separação foi ajustado para dar uma proporção de 20:1; tipo de injeção *splitless* (1 mL, de solução hexano 1:1000); EIMS, a energia de elétrons, 70 eV. Para purificar o principal componente o NF, o OE da casca (15g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando éter de petróleo (isocrática) e cromatografia em camada delgada (hexano-acetato de etila, 9:1. O Thermo Foco GC/FID funciona sob as seguintes condições: WCOT DB-5 ms (30m · 0,25mm; 0,25

1m de espessura do filme), coluna capilar de sílica fundida; temperatura programada entre 60-240 °C; (3 °C/min); injetor e detector de temperaturas, 220 e 250 °C; gás, nitrogênio; tipo de injeção, *splitless* (2 µL, solução de hexano 1:1000).

A composição química do OEAC utilizado em nosso estudo encontra-se descrita na tabela 2.

Tabela 2. Composição química e índice de retenção dos constituintes do OEAC.

| Compounds | Composition (% of total weight) | Retention Indices |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------|
| α-Pinene | 0.3 | 938 |
| β-Pinene | 0.2 | 978 |
| Δ ³ -Carene | 0.2 | 1009 |
| Limonene | 0.1 | 1029 |
| β-Phellandrene | 0.1 | 1030 |
| Benzene acetaldehyde | 0.3 | 1043 |
| Benzonitrile | 0.1 | 1142 |
| α-Terpineol | traces | 1188 |
| Safrole | 0.4 | 1284 |
| 1-nitro-2-phenylethane | 52.4 | 1304 |
| α-Cubebene | 0.2 | 1350 |
| Eugenol | 1.7 | 1355 |
| α-Copaene | 0.2 | 1375 |
| β-Elemene | 0.1 | 1392 |
| Methyleugenol | 38.6 | 1400 |
| α-Humulene | 0.2 | 1453 |
| β-Selinene | 0.4 | 1483 |
| α-Selinene | 0.4 | 1492 |
| γ-Cadinene | 0.3 | 1522 |
| <i>trans</i> -Calamenene | 0.1 | 1530 |
| Cadina-1,4-diene | tr | 1533 |
| 1- <i>epi</i> -Cubenol | 0.1 | 1626 |
| Cubenol | 0.1 | 1643 |
| Selin-11-en-4-α-ol | 2.5 | 1653 |
| Total identified | 99.66 | |

4.2. Soluções e Reagentes

Foram utilizadas algumas soluções injetáveis que estão disponíveis no mercado como o pentobarbital sódico (Sanofi, Libourne, França) e heparina (Laboratoires Léo SA Montigny-le-Bretonneux, França). A penicilina benzatina foi adquirida no Lafepe (Recife, PE, Brasil). Para os experimentos *in vivo*, OEAC e NF, foram dissolvidos em tween 80 (2%) e solução salina isotônica imediatamente antes do uso. Capsazepina (Tocris, Ballwin, MO, EUA) foi diluída em dimetilsulfóxido (Sigma) a 0,1 mol/L (37 mg/ml) e diluído em solução salina contendo 10% de Tween 80 e 10% de etanol à concentração final de 1mg/mL. O ondansetron (Sigma) e brometo de metilatropina (Sigma) foram dissolvidos em solução salina, e a CAP (Sigma) foi preparada em Tween 80 a 1 %, 1% de etanol e 98% de soro fisiológico. As drogas foram injetadas manualmente em bolus, no volume de 0,1 mL, seguido de 0,2 mL de soro fisiológico para lavar o cateter. Nos experimentos *in vitro*, o cloridrato de FEN (Sigma) e de ACh (Sigma) foram dissolvidos diretamente no meio de perfusão, enquanto o OEAC e o NF, foram dissolvidos em DMSO (1%) e homogeneizados imediatamente antes do uso. O meio de perfusão utilizado foi a solução Krebs-Henseleit com tampão de bicarbonato (KHB) (pH 7,4) com a seguinte composição em (mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂. 2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01.

4.3. Material

Foram utilizados ratos machos adultos SHR (Figura 10) com 12 semanas para os estudos *in vivo* e com 24 semanas para os estudos *in vitro*, provenientes do

Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos sob condições de temperatura constante (22 ± 2 °C) ciclo claro escuro padrão (12 horas claro/12 horas escuro) com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco, sob o n° do processo: 23076.038710/2010-12.



Figura 10. Rato SHR oriundo do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

4.4. Experimentos farmacológicos “*in vivo*”

4.4.1. Cateterização dos animais

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e catéteres heparinizados (125 UI/mL em salina isotônica),

foram implantados: um na aorta abdominal (para o registro da PA) e outro na veia cava inferior (para administração de drogas), através da artéria e veia femoral esquerda, respectivamente; ambos 1 cm abaixo da artéria renal, como descrito previamente (Figura 11) (LAHLOU et al., 1990). Estes catéteres foram exteriorizados dorsalmente, ao nível da nuca. Posteriormente, os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam uma injeção intramuscular de penicilina (24 000 UI). Todos os experimentos de registro cardiovascular foram realizados 24 horas após o procedimento cirúrgico. Em alguns animais, um cateter de Teflon foi introduzido na artéria carótida direita e foi avançado de maneira retrograda até que sua extremidade distal fosse posicionada dentro do ventrículo esquerdo (de SIQUEIRA et al., 2010). A posição deste catéter dentro do ventrículo foi verificada pela medida da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e pelo exame *pos-mortem*.



Figura 11. Fotografia do procedimento cirúrgico realizado para implantação dos catéteres na artéria e veia femoral.

4.4.2. Sistema de registro

No momento do experimento, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P23 DI) acoplado a um polígrafo Gilson modelo 5/6H (Gilson Medical Electronics, Middletown, USA). Esta unidade forneceu as pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD). A PAM foi calculada através da fórmula: $PAM = PAD + [(PAS - PAD) / 3]$. A FC foi obtida por derivação do sinal da PA através de um cardiotacômetro (Figura 12).



Figura 12. Fotografia do sistema utilizado para registro de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos.

4.4.3. Protocolos experimentais “*in vivo*”

A administração i.v do OEAC e do NF foi sempre efetuada após um período de estabilização (45-60 minutos (min) para ratos acordados e 15-20 min para ratos anestesiados) da PA e da FC. Estes parâmetros foram registrados durante 5 a 10 min,

de acordo com a duração dos efeitos. Quando injeções subsequentes do OEAC ou NF foram administradas, os valores da PA e da FC foram acompanhados até retornarem aos seus respectivos níveis de controle. Os tempos de cada resposta foram medidos a partir do fim da administração até o aparecimento da bradicardia ou hipotensão. Injeções sucessivas do OEAC ou do NF foram separadas por intervalos de 10 min para evitar taquifilaxia. Doses dos antagonistas foram escolhidas de acordo com as recomendadas na literatura e com base em experimentos previamente realizados em nosso laboratório. Cada série de experimentos (isto é, curva dose-efeito com ou sem pré-tratamento com o antagonista) foi realizada em 5 a 7 animais por grupo. Todas as séries de experimentos, exceto a série 6 (ratos acordados), foram realizadas em ratos SHR anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg, i.p.).

Série 1: Esta série de experimentos teve por objetivo estabelecer uma relação dose-efeito. Cada animal intacto recebeu doses crescentes do NF (1, 3, 5 e 10 mg/kg) e do OEAC (1, 5, 10 e 20 mg/kg) através do catéter intravenoso, o curso temporal e as mudanças da PAM e FC foram registradas. Em outros grupos de animais, o NF (10 mg/kg, n = 6) e o OEAC (10 mg/kg, n = 5) também foram injetados antes e 20 min após a bivaotomia realizada em nível cervical.

Série 2: Esta série de experimentos foi realizada para avaliar o papel das fibras C aferentes vagais na mediação dos eventos cardiovasculares induzidos pelo OEAC e NF. Para estudar este papel, foi utilizado o método conhecido de tratamento perineural dos nervos vagos com CAP (JANSCÓ et al., 1983; SCHELEGLE et al., cols., 2000), um procedimento que vem sendo utilizado com sucesso em nosso laboratório, a fim de produzir um bloqueio seletivo da condução neural dos aferentes vagais via fibra-C

(de SIQUEIRA et al., 2006b; 2010). Resumidamente, tendo isolado os nervos vagais, foi colocado CAP (250 µg/mL) embebida em cotonetes em torno de um segmento de 2-3 mm de nervo durante 20 min, em seguida, os cotonetes foram removidos. Alterações máximas na PAM e FC provocadas pelo NF (10 mg/kg, i.v.) e OEAC (10 mg/kg i.v.) foram avaliadas antes e depois do tratamento perineural dos nervos vagos com CAP ou seu veículo. A abolição imediata do reflexo hipotensor e bradicardizante (reflexo vagal) induzido pela administração i.v. de CAP (1 µg/kg) foi tomada como critério de sucesso do tratamento perineural com CAP.

Série 3: Esta série de experimentos foi realizada para avaliar o envolvimento da ativação dos TPRV₁ na mediação das alterações cardiovasculares induzidas pelo NF e OEAC. Portanto, cada animal recebeu uma injeção de NF (10 mg/kg, i.v.) ou OEAC (10 mg/kg, i.v.) e as alterações máximas na PAM e FC foram determinadas. Oito min mais tarde e, dois min antes de uma segunda injeção do NF (10 mg/kg, i.v.) ou OEAC (10 mg/kg, i.v.), os ratos foram pré-tratados com capsazepina (1 mg/kg, i.v.), um antagonista competitivo do TPRV₁, (MALINOWSKA et al., 2001; SMITH; Mc QUEEN, 2001), ou com o veículo e novamente as alterações PAM e a FC foram determinadas. Como controle positivo, o efeito do pré-tratamento com capsazepina (1 mg/kg, i.v.) nas respostas hipotensora e bradicardizante induzidas pela CAP (1 µg/kg, i.v.) também foram determinados seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Série 4: Para determinar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos (5-HT₃) na mediação das alterações cardiovasculares induzida pelo NF e OEAC, cada animal recebeu uma injeção de NF (10 mg/kg, i.v.) ou OEAC (10 mg/kg, i.v.) e as alterações máximas na PAM e FC foram determinadas cinco min mais tarde e, cinco min antes

da segunda injeção do NF (10 mg/kg, i.v.) ou do OEAC (10 mg/kg, i.v.), na presença de um antagonista dos receptores 5-HT₃ (ondasetron) (30 µg/kg, i.v.) (BAGCHI; DESHPANDE, 1999) foi administrado e as alterações máximas da PAM e FC foram novamente determinadas. Como controle positivo do experimento, o efeito do pré-tratamento com ondasetron (30 µg/kg, i.v.) nas respostas iniciais hipotensoras e bradicardizantes a serotonina (5 mg/kg, i.v.) foram determinados seguindo o mesmo protocolo.

Série 5: Para determinar a localização das fibras aferentes C envolvidas nas respostas cardiovasculares ao NF e ao OEAC, foram comparadas as respostas sistêmicas e no ventrículo esquerdo à administração do NF (10mg/kg, i.v.) e do OEAC (10 mg/kg, i.v.). Injetado no ventrículo esquerdo, o NF ou OEAC não atinge a circulação pulmonar e, presumivelmente não tem acesso imediato as fibras-C pulmonares.

Série 6: Nesta série de experimentos foram utilizados ratos acordados, a fim de avaliar o papel do mecanismo colinérgico na mediação das alterações cardiovasculares induzida pelo NF. Portanto, o curso temporal das mudanças na PAM e FC provocada pelas injeções do NF (5 e 10 mg/kg, i.v.) foram determinadas em ratos previamente tratados via i.v., 10 min antes com o veículo (1 ml/kg) ou metilatropina (1 mg/kg) (VASQUEZ; KRIEGER, 1982). Cada animal recebeu doses crescentes em bolus, conforme descrito anteriormente.

4.5. Experimentos “*in vitro*”

4.5.1. Estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas superiores

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e por meio de uma incisão na região abdominal foi retirada a artéria mesentérica superior. A artéria foi cuidadosamente colocada em um recipiente (placa de Petri). Após a remoção do tecido conectivo, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente 3 mm. Os anéis foram acondicionados, por meio de hastes, em cubas de vidro contendo 5 ml de solução Krebs-Henseleit. A solução nutritiva de Krebs-Henseleit utilizada nestes experimentos apresentava a seguinte composição (concentrações em mM): NaCl (133), KCL (5,0), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,3), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (20) e glicose (10), mantida a 37°C e gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Uma das hastes foi conectada a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (PowerLab 8/30, modelo ML870, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) e a outra extremidade foi presa a cuba (Figura 13). Em seguida, os anéis de mesentérica foram submetidos a uma tensão basal de 0,5 g durante 60 min, período para a estabilização da preparação antes do início dos protocolos experimentais.

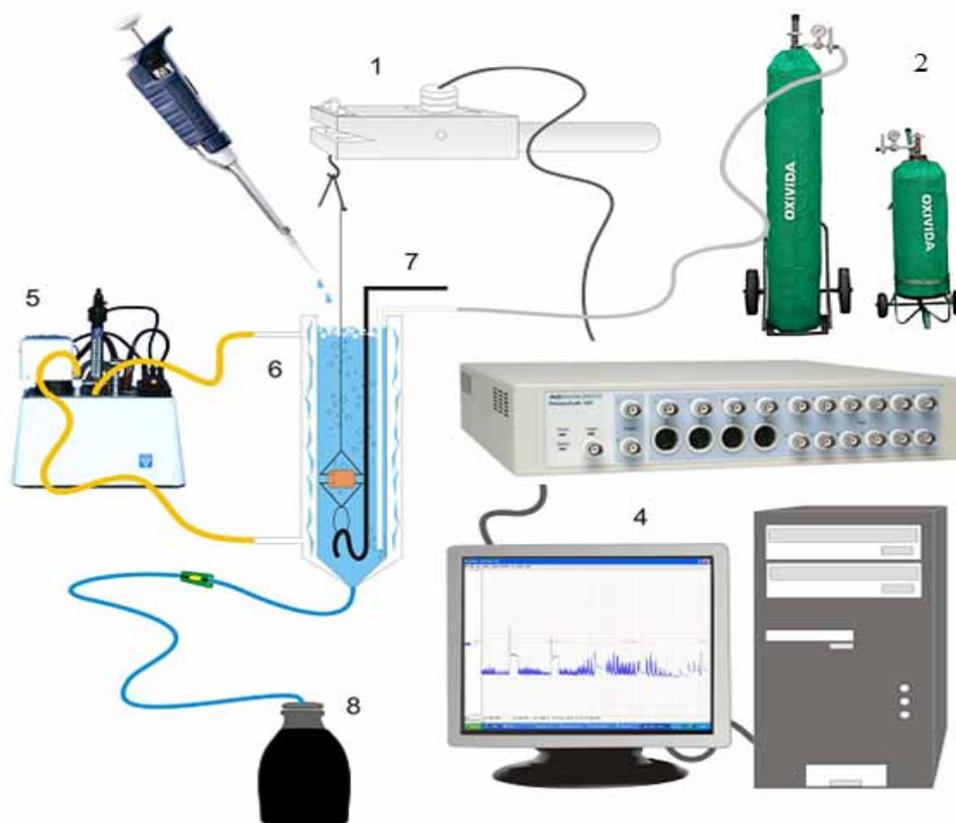


Figura 13. Esquema simplificado do set up utilizado nos experimentos de reatividade vascular; 1. Transdutor de tensão isométrica (LETICA Scientific Instruments, TRI-210); 2. Fonte de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂); 3. Sistema de Aquisição de Dados (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Austrália); 4. Software PowerLab 7.1; 5. Banho de circulação Haake FJ; 6. Cuba de 5 mL; 7. Haste Fixa; 8. Coletor.

4.5.1.1. Protocolos experimentais para as preparações "in vitro"

Ao término do período de estabilização, contrações controles foram induzidas pela adição de KCl (75 mM) no banho. Quando duas contrações sucessivas apresentaram uma magnitude similar, as preparações foram consideradas em equilíbrio (teste de viabilidade da preparação). Após 30 min, foi adicionado a FEN (um agonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos; 1 μ M) para induzir uma contração sustentada, sobre a qual foi adicionada a ACh (um agonista muscarínico; 1 μ M) com o objetivo de confirmar a presença ou ausência de endotélio nas preparações estudadas (teste do endotélio). Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo

relaxamento induzido pela ACh foi igual ou superior a 50% da contração induzida pelo FEN (1 μ M) (Figura 14).

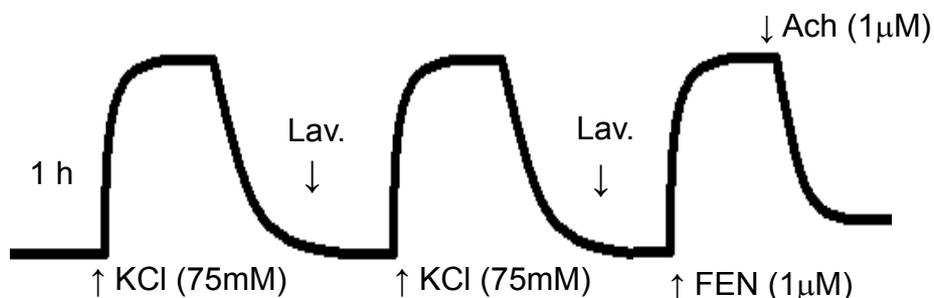


Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para o estudo de viabilidade da preparação e o teste do endotélio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Para a execução dos protocolos experimentais em artérias sem endotélio vascular, esta camada foi removida mecanicamente por meio da fricção com uma cânula metálica no lúmen da artéria. Após a realização do teste de viabilidade da preparação e o teste da presença do endotélio como descrito acima, foram realizadas as seguintes séries de experimentos:

Série 1: Para avaliar os efeitos do OEAC (0,1-1000 μ g/mL) sobre o tônus basal das preparações de artérias mesentéricas contendo endotélio, esta série foi realizada (Figura 15).



Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito do OEAC sobre o tônus basal em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 2: Os efeitos de concentrações crescentes do OEAC (0,1-1000 μ g/mL) ou NF (0,1-1000 μ g/mL) foram estudados após a indução de contrações sustentadas com

KCl (75 mM) ou FEN (1 μ M) (Figura 16). Nas preparações que foram contraídas com a FEN foi avaliado o efeito do óleo e do seu constituinte em preparações com e sem endotélio. A fim de avaliar o papel dos canais para K^+ , foram realizados experimentos em preparações contendo endotélio incubadas por 20 min com tetratilamônio (TEA) (5 mM).

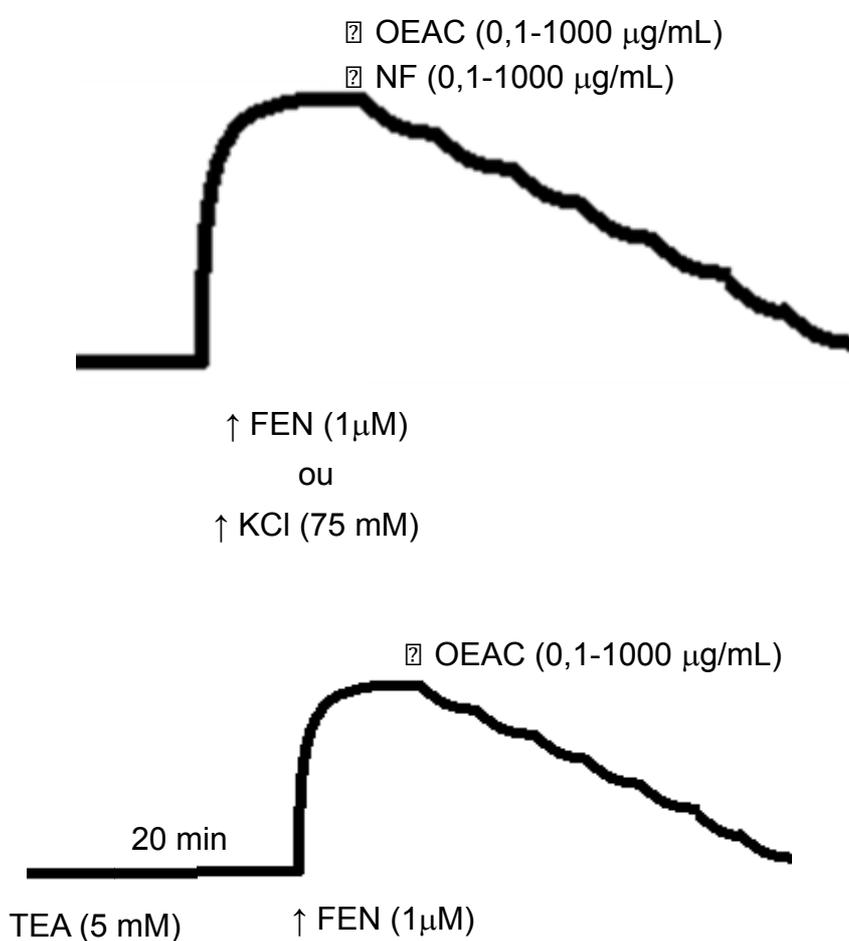


Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do OEAC ou NF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídas com FEN (1 μ M) com e sem endotélio ou KCl (75 mM). Em um grupo foi incubado o TEA (5 mM).

Série 3: Nesta série de experimentos os efeitos inibitórios da pré-exposição (10 min) para uma concentração (3-1000 $\mu\text{g/mL}$) do OEAC sobre a curva de contração induzida pela FEN (10^{-10} - 10^{-4} M) ou KCl (25 – 150 mM), foram estudados em preparações contendo endotélio, em meio com Ca^{2+} (Figura 17).

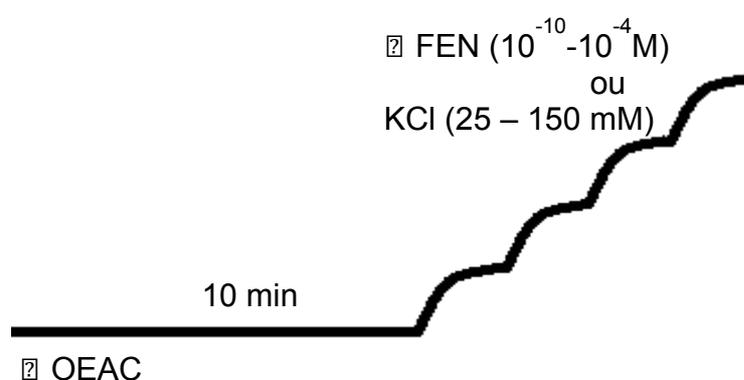


Figura 17. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de uma determinada concentração do OEAC sobre a contração induzida pela curva da FEN (10^{-10} – 10^{-4} M) ou curva ao KCl (25 – 150 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 4: Esta série de experimentos foi realizada para avaliar os efeitos inibitórios do OEAC sobre as contrações induzidas pelo Ca^{2+} exógeno em anéis de artéria mesentérica despolarizados pelo KCl em meio sem Ca^{2+} . As soluções sem Ca^{2+} foram preparadas pela omissão do CaCl_2 na solução de Krebs-Henseleit. Após a verificação da viabilidade do tecido, a preparação foi mantida em solução de Krebs-Henseleit sem Ca^{2+} na presença do EDTA (1 mM), para quelar o Ca^{2+} extracelular, e KCl (75 mM). Em seguida uma curva cumulativa concentração-resposta de Ca^{2+} (0,1 – 20 mM) foi executada. No término da curva, a preparação foi lavada e o mesmo protocolo descrito acima foi realizado na presença do OEAC ou NF (100 e 600 $\mu\text{g/mL}$). O óleo ou o constituinte foi adicionado à preparação 10 min antes de se realizar uma curva

concentração-resposta cumulativa para o Ca^{2+} (Figura 18). A resposta contrátil máxima obtida na primeira curva concentração-resposta foi tomada como controle, e as contrações foram calculadas em função desse valor.

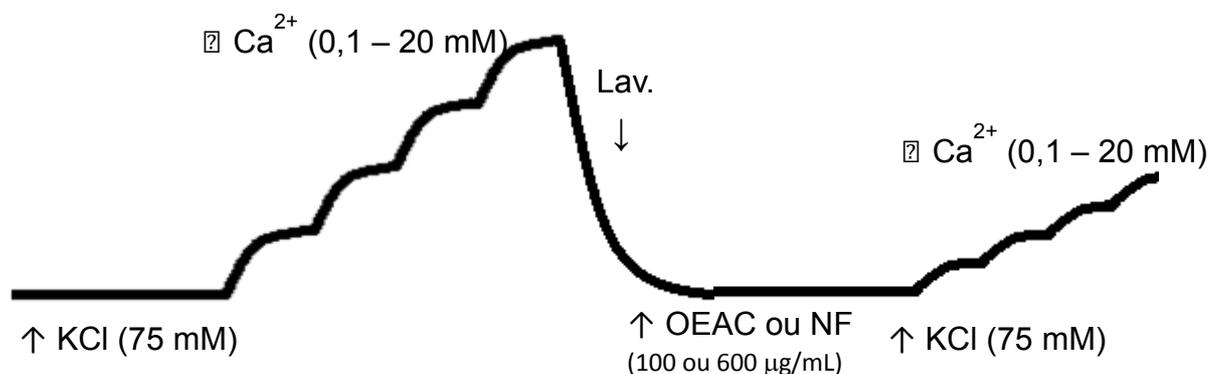


Figura 18. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC ou NF sobre a curva ao CaCl_2 previamente despolarizada com KCl 75 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 5: Esta série foi realizada para avaliar os efeitos inibitórios do OEAC sobre as contrações induzidas pelo Ba^{2+} exógeno em anéis de mesentérica despolarizados pelo KCl em meio sem Ca^{2+} . As soluções sem Ca^{2+} foram preparadas pela omissão do CaCl_2 na solução de Krebs-Henseleit. Após a verificação da viabilidade do tecido, a preparação foi mantida em solução de Krebs-Henseleit sem Ca^{2+} na presença do EDTA (1 mM) para quelar o Ca^{2+} extracelular e KCl (75 mM). Em seguida, uma curva cumulativa concentração-resposta ao Ba^{2+} (0,1 - 20 mM) foi executada. No término da curva, a preparação foi lavada e o mesmo protocolo descrito acima foi realizado na presença do OEAC (100 e 600 $\mu\text{g/mL}$). O óleo foi adicionado a preparação 10 min antes da curva cumulativa concentração-resposta para o Ba^{2+} , foi feito também um grupo que foi pré-incubado com a nifedipina (1 μM) (Figura 19). A resposta contrátil máxima obtida na primeira curva concentração-resposta foi tomada como controle, e as contrações foram calculadas em função desse valor.

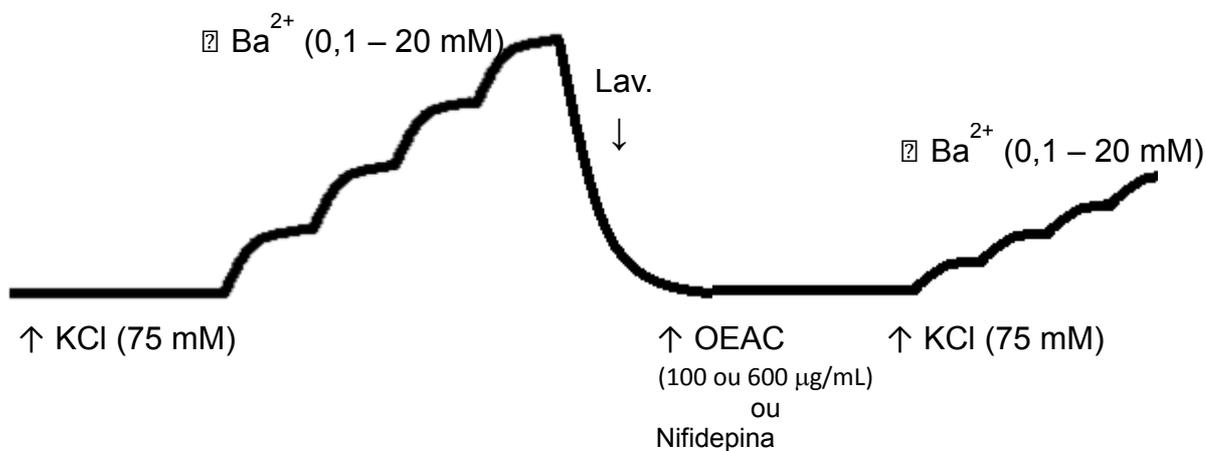


Figura 19. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC ou nifedipina sobre a curva ao Ba²⁺ previamente despolarizada com KCl 75 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 6: Nesta série de experimentos, foi avaliado o efeito de concentrações crescentes (10, 30, 100, 300, 600 e 1000 µg/mL) do OEAC sobre a contração induzida pelo PDB (1 µM) em preparações de artéria mesentérica com endotélio em meio sem Ca²⁺ com EDTA (1 mM) (Figura 20).

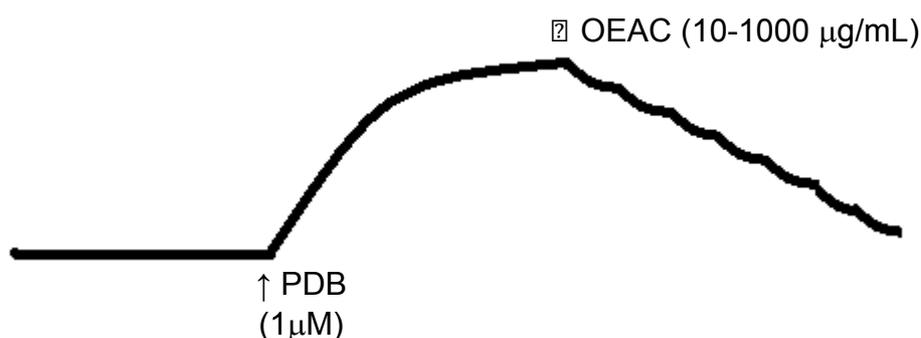


Figura 20. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do OEAC sobre a contração induzida pelo PDB em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 7: Com a finalidade de avaliar os efeitos do OEAC na contração induzida pela cafeína em meio sem Ca²⁺, após o período de estabilização, as preparações contendo endotélio foram contraídas com KCl 75 mM e em seguida foram lavadas

várias vezes por um período de 10 min com solução sem Ca^{2+} contendo EDTA (1 mM) mantida a uma temperatura de 25°C. Em seguida, a cafeína (20 mM) foi adicionada ao banho e produziu uma contração transitória, a preparação foi lavada com o Krebs-Henseleit com Ca^{2+} , e o KCl (75 mM) foi adicionado ao banho para promover o retorno do Ca^{2+} aos estoques intracelulares. As preparações foram lavadas com solução sem Ca^{2+} e o OEAC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi adicionado 5 min antes da administração de cafeína (Figura 21).

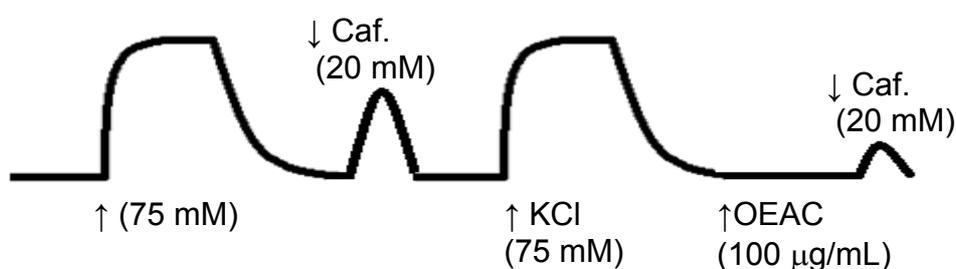


Figura 21. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC sobre a contração induzida pela cafeína em meio sem Ca^{2+} de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Série 8: Com o intuito de avaliar os efeitos do OEAC na contração induzida pela FEN em meio sem Ca^{2+} , após o período de estabilização, as preparações com endotélio foram contraídas com KCl 75 mM e em seguida foram lavadas várias vezes por um período de 10 min com solução sem Ca^{2+} contendo EDTA (1 mM). Em seguida a FEN (1 mM) foi adicionada ao banho e produziu uma contração, a preparação foi lavada com o Krebs-Henseleit com Ca^{2+} , e o KCl (75 mM) foi adicionado ao banho para promover o retorno do Ca^{2+} aos estoques intracelulares.

As preparações foram lavadas com solução sem Ca^{2+} e o OEAC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi adicionado 5 min antes da administração da FEN (Figura 22).

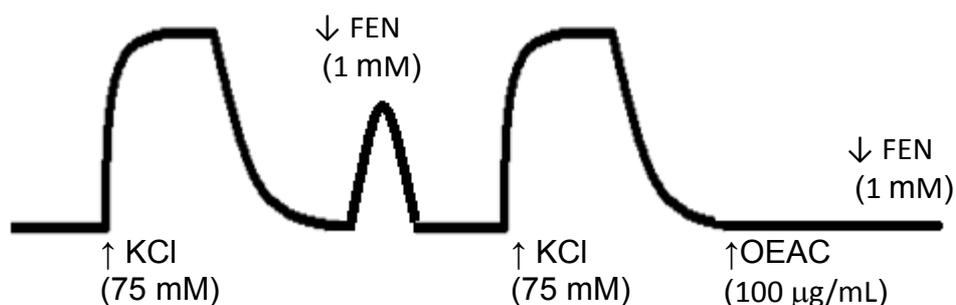


Figura 22. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito do OEAC sobre a contração induzida pela FEN em meio sem Ca^{2+} de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

4.5.2. Estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Os animais foram sacrificados e o leito mesentérico foi removido e colocado em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C . O terceiro ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 1,5 - 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio de dissecação. Dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos resistência (Danish Mvo Tech, model 610M; JP-Trading I/S) para estudos de tensão isométrica. Um dos fios foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permitia o estiramento das artérias (Figura 23). Esse miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab 8/30, modelo ML870, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) e este a um computador.

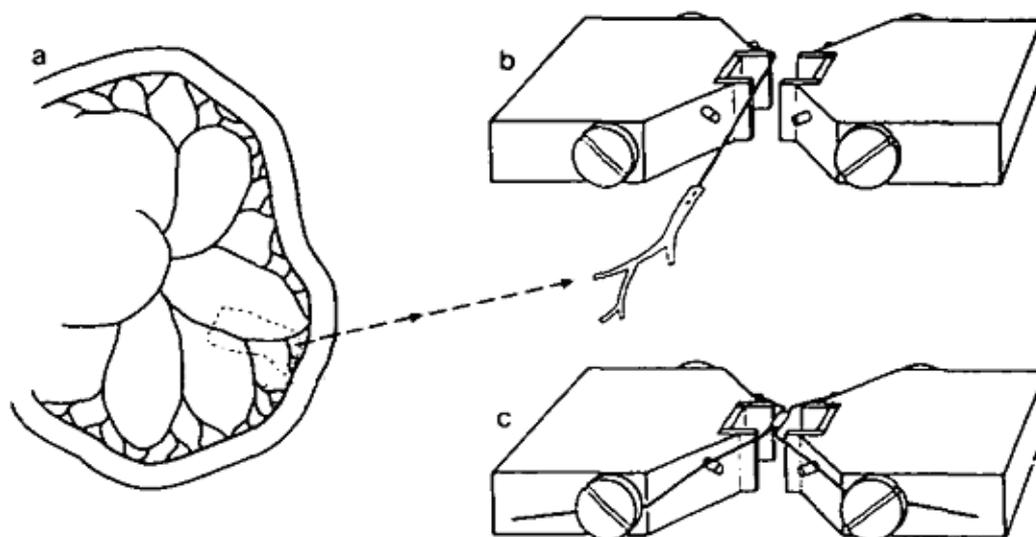


Figura 23. Esquema demonstrando os principais componentes da preparação para o estudo de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977). (a) Leito mesentérico e seus ramos, (b) diagrama mostrando como a parte terminal da artéria é montada entre dois fios de tungstênio de 32 μm de diâmetro cada, (c) diagrama mostrando a as placas de aço, entre as quais está montada uma artéria de até 2 mm de comprimento e uma das placas está conectada a um transdutor de força de alta sensibilidade enquanto a segunda está conectada a um micrômetro (MULVANY; HALPERN, 1977).

Após a montagem das artérias de resistência, estas foram estabilizadas por um período de 30 min em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantida à temperatura de 37° C. Após o período de estabilização, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão/diâmetro interno foi calculado e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L_{100}) foi determinada (MULVANY; HALPERN, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L_1 , calculado como $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, circunferência na qual o desenvolvimento

de força é máximo (MULVANY; HALPERN, 1977). O diâmetro luminal efetivo (l_1) foi determinado de acordo com a equação $l_1 = L_1/\pi$.

4.5.2.1. Protocolo experimental em artérias de resistência

Após as artérias terem sido normalizadas, foram submetidas a um período de estabilização de 30 min e em seguida, contraídas com KCl (75 mM), para avaliar sua integridade funcional. Após 30 min foi adicionado NA (1 μ M) para induzir uma contração sustentada, sobre a qual foi adicionada a ACh (1 μ M) para confirmar a presença ou ausência de endotélio nas preparações estudadas. Em seguida, foram avaliados os efeitos de concentrações crescentes do OEAC (0,1-1000 μ g/mL) após a indução de contrações sustentadas com NA (1 μ M).

4.6 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Variações máximas da PAM e da FC após cada dose do OEAC e do NF foram expressas em porcentagem dos valores basais. O valor da IC_{50} , definido como a concentração do OEAC (μ g/ml) requerida para produzir 50% da redução da resposta máxima da contração induzida por KCl ou FEN, foi utilizado para avaliar a sensibilidade vascular para o OEAC e NF, e foi determinada graficamente em cada experimento individual. A significância ($p < 0,05$) dos resultados foi determinada pelo uso de testes t de Student (pareado ou não pareado), U de Mann-Whitney e análise de variância (ANOVA) a uma via ou duas vias, seguida pelo teste de Dunnett ou Bonferroni quando apropriado.

5. RESULTADOS

Artigo 1. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats

Artigo 2. Vasorelaxant effects of the essential oil of *Aniba canelilla* and its main constituent, 1-nitro-2-phenylethane, on mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats

OUTROS RESULTADOS

1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats

ORIGINAL
ARTICLECardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats

Leylliane de Fátima Leal Interaminense^a, Rodrigo José Bezerra de Siqueira^a, Fabiano Elias Xavier^a, Gloria Pinto Duarte^a, Pedro Jorge Caldas Magalhães^b, Joyce Kelly da Silva^c, José Guilherme Soares Maia^c, Pergentino José da Cunha Sousa^d, José Henrique Leal-Cardoso^e, Saad Lahlou^{e*}

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

^cFaculdade de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

^dFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

^eInstituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil

Keywords

1-nitro-2-phenylethane, essential oil of *Aniba canelilla*, isolated mesenteric preparation, sensory C-fibers, SHR, vago-vagal reflex

ABSTRACT

This study investigated the cardiovascular responses to the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) and its main constituent 1-nitro-2-phenylethane (NP) in spontaneously hypertensive rats (SHRs). In anesthetized SHRs, intravenous (i.v.) bolus injections of EOAC (1–20 mg/kg) or NP (1–10 mg/kg) elicited dose-dependent hypotensive and bradycardiac effects, which were characterized in two periods (phases 1 and 2). The first rapid component (phase 1) evoked by EOAC and NP both at 10 mg/kg was absent after left ventricle injection, fully abolished by bilateral vagotomy and perineural treatment of both cervical vagus nerves with capsaicin (250 µg/mL) while remained unaltered by i.v. pretreatment with capsazepine (1 mg/kg) or ondansetron (30 µg/kg). In conscious SHRs, NP (5 and 10 mg/kg, i.v.) evoked rapid hypotensive and bradycardiac effects (phase 1) that were fully abolished by methylatropine (1 mg/kg, i.v.) pretreatment. In rat endothelium-containing mesenteric preparations, increasing concentrations (0.1–1000 µg/mL) of EOAC and NP relaxed the phenylephrine-induced contraction in a concentration-dependent manner. It is concluded that NP induces a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1) that apparently results from the stimulation of vagal pulmonary rather than cardiac C-fiber afferents. This effect does not appear to involve activation of either vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors located on vagal sensory nerves. The phase 2 hypotensive response to i.v. NP seems to result, at least in part, from its direct vasodilatory effect on the peripheral smooth muscle. All in vivo and in vitro effects of EOAC are mostly attributed to the actions of its main constituent NP.

Received 10 March 2010;
revised 15 June 2010;
accepted 10 September 2010

*Correspondence and reprints:
lahlou562@gmail.com

INTRODUCTION

Aniba canelilla (H.B.K.) Mez (syn. *Aniba elliptica* A. C. Sm., *Cryptocarya canelilla* Kunth), (Lauraceae) is an aromatic

plant abundant in the Amazon region, where it is commonly known as 'casca-preciosa' (precious bark). This plant is an important and historically interesting species in the Amazon forest because it was confused

with cinnamon trees (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) during the 1540 voyage of Pizarro and Orellana from the Andes to the Amazon estuary and during Humbolt and Bonpland's 1800 expedition in the Orinoco River basin to find the 'famous cinnamon' [1].

The trunk wood, fine stems and leaves of *casapreciosa* are used as spices and ingredients for local dishes, fragrances, and sachets. In folk medicine, decoctions of bark from *A. canelilla* are commonly used for their antispasmodic, digestive-stimulating and carminative properties [2]. Stem bark of *A. canelilla* has an essential oil content of 1% by dry weight. The odoriferous principle of leaf, bark, and trunk wood of *A. canelilla* is 1-nitro-2-phenylethane (NP) (Figure 1a), also responsible for the plant's cinnamon scent [3]. Methyl Eugenol is also an important volatile constituent of the essential oil of *A. canelilla* (EOAC) [3]. NP is considered to be a major contributor to tomato flavor, as are 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylethanol [4]. Nitroderivatives found in higher plants are rare. In the case of NP, its biogenesis involves phenylalanine oxidation followed by spontaneous decarboxylation [5]. Oger *et al.* reported fungistatic properties for bark EOAC [6]. Furthermore, it

has been reported that bark EOAC exerts relaxant effects on intestinal smooth muscle, supporting the use of the plant in folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders [7]. Recently, antioxidant activity of the EOAC and NP [8] as well as antinociceptive activity of NP [9] have been reported.

Previously, we showed that the hypotensive response to intravenous (i.v.) administration of the EOAC in normotensive rats is mainly because of active vascular relaxation rather than the withdrawal of sympathetic tone [10]. Cardiovascular effects of the EOAC could be attributed, at least in part, to the actions of its main constituent NP. This study examined this possibility by comparing the mechanism underlying the cardiovascular responses to i.v. administration of EOAC to that of NP, in anesthetized, spontaneously hypertensive rats (SHRs).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Barks of *A. canelilla* were collected in May, 2005, in the area of Cauaxi River, Municipality of Paragominas, southeast of Pará state, Brazil. Its identification was confirmed by Dr. da Silva M.H.L. (Department of Botanic, Emílio Goeldi Museum, Belém, Pará, Brazil). A voucher specimen (#174904) is deposited in the herbarium of Emílio Goeldi Museum, in the city of Belém, Pará State, Brazil.

Essential oil distillation, fractionation, and analysis

Bark was air-dried, grinded, and submitted to hydrodistillation (100 g, 4 h) using a Clevenger-type apparatus. Analytical conditions, composition of the EOAC used in this study and retention indices of its constituents have been previously reported [10]. The sample of EOAC used in this study contained 52.4% of NP, 38.6% of methyl-eugenol and other minor constituents [10]. To purify the main constituent NP, bark essential oil (15 g) was submitted to fractionation in a silica gel chromatographic column using petroleum ether (isocratic elution) and thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate, 9 : 1). The percentage content of NP in the oil and in the purified fractions was obtained in a Thermo Focus GC/FID operated under the following conditions: WCOT DB-5 ms (30 m × 0.25 mm; 0.25 μm film thickness) fused silica capillary column; temperature programmed, 60–240 °C (3 °C/min); injector and detector temperatures, 220 and 250 °C; carrier gas, nitrogen; injection type, splitless (2 μL, of a 1 : 1000 hexane solution).

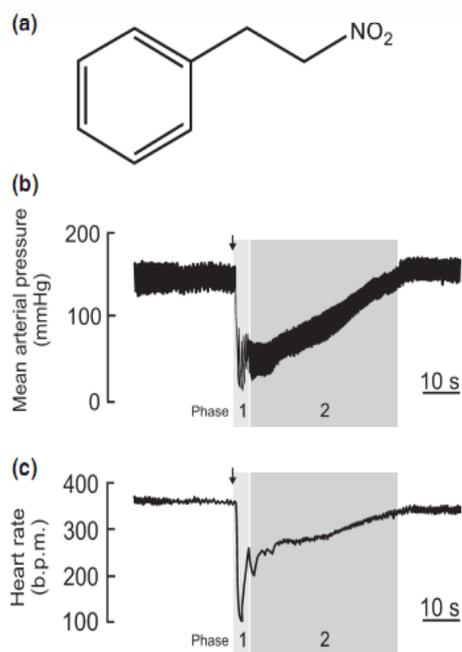


Figure 1 Chemical structure of 1-nitro-2-phenylethane (NP) (Panel a). Representative recordings showing changes in mean arterial pressure (MAP, Panel b) and heart rate (HR, Panel c) induced by intravenous injection of NP (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized spontaneously hypertensive rats without any pretreatment. The same time course was observed after intravenous injection of the essential oil of *Aniba canelilla*. Arrows indicate the time of injection.

Solutions and drugs

Sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) and heparin (Laboratoires Léo SA, Montigny-le-Bretonneux, France) were used as commercially available injectable solutions. Penicillin G benzathine salt was purchased from Lafepe (Recife, PE, Brazil). For in vivo experiments, EOAC and NP were dissolved in Tween 80 (2%), brought to the chosen volume with sterile isotonic saline and sonicated just before use. Capsazepine (Tocris, Ballwin, MO, USA) was first diluted in dimethyl sulphoxide (Sigma) to 0.1 mol/L (~ 37 mg/mL) and further diluted with saline containing 10% Tween 80 and 10% ethanol to a final concentration of 1 mg/mL. Ondansetron (Sigma) and methylatropine bromide (Sigma) were dissolved in saline, and capsaicin (CAP, Sigma) was prepared in 1% Tween 80, 1% ethanol and 98% saline. Drugs were injected manually as a bolus in a volume of 0.1 mL, followed by a 0.2 mL flush with physiological saline. For in vitro experiments, phenylephrine (PHE) hydrochloride (Sigma), and acetylcholine (Sigma) were dissolved directly in the perfusion medium, while EOAC and NP were dissolved in Tween 80 (2%) and sonicated just before use. The perfusion medium used was fresh Krebs–Henseleit bicarbonate (KHB) buffer (pH 7.4) of the following composition (in mM): NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO₃ 25; CaCl₂·2H₂O 2.5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄·7H₂O 1.2; glucose 11; and EDTA 0.01.

Animals

Adult male SHR (age: 16–18 weeks) were obtained from our local colonies maintained at the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. They were kept under conditions of constant temperature (22 ± 2 °C) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. All animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication 85–23, revised 1996). All procedures described here were reviewed by and had prior approval from local animal ethics committee.

In vivo experiments

Catheterization procedure

Rats were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg), and catheters (PE-10 fused to PE-50) were implanted in the abdominal aorta (for the recording of arterial blood pressure) and in the inferior vena cava (for drug administration) through the left femoral artery and vein, respectively as previously

reported [11]. Postoperatively, rats received an intramuscular injection of penicillin (24 000 IU). They were housed individually in plastic cages and allowed to recover for 24–48 h before any circulatory experiments. In some animals ($n = 7$), a Teflon catheter was inserted into the right carotid artery and was advanced retrogradely until its tip was positioned in the left ventricle. The position of the tip within the left ventricle was verified by measurement of left ventricular blood pressure and confirmed by postmortem examination.

Recordings of mean arterial pressure and heart rate

At the time of experiments, rats were again anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). A short tracheal cannula was inserted via a tracheotomy, through which rats breathed spontaneously in the supine position. Body temperature was maintained by an electric heating pad. The arterial catheter was therefore connected to a blood pressure transducer coupled to a polygraph recorder. Heart rate (HR) was obtained using a cardiometer triggered by the pressure pulses. Both signals were recorded on a Gilson model 5/6H polygraph (Gilson Medical Electronics, Middletown, WI, USA). Mean arterial pressure (MAP) was calculated as diastolic + [(systolic blood pressure – diastolic blood pressure)/3].

Experimental design and protocols

To explore the cardiovascular responses to EOAC and NP, the following protocol was used. Before each experiment, a period of 15–20 min was allowed to obtain a stable MAP and HR tracing. Baseline values of these variables were determined, and their changes were measured during a 10-min postinjection period. Injection response times were measured from the end of an injection to the onset of bradycardia or hypotension. Successive injections of EOAC or NP were separated by 10-min intervals to avoid tachyphylaxis. Doses of agonists and antagonists were chosen according to those recommended in the literature. The following series of experiments, except series 7 (conscious rats), were performed in anesthetized SHR.

In a first series of experiments that was carried out to establish a dose–effect relationship, each intact animal received a series of increasing bolus doses of EOAC (1–20 mg/kg, $n = 6$) or NP (1–10 mg/kg, $n = 6$) via the i.v. catheter, and time course of the changes in MAP and HR was recorded (Series 1). In four different groups of rats, maximal changes in MAP and HR elicited by i.v. injection of EOAC and NP (both at 10 mg/kg) were determined before and 20 min after a cervical bilateral

vagotomy (Series 2; $n = 5$ and 6 , respectively), before and 20 min after bilateral perineural treatment (PNT) with CAP (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $n = 5$ and 6 , respectively) (Series 3) as previously described [11], before and 2 min after i.v. pretreatment with the competitive TPRV₁ receptor antagonist, capsazepine (1 mg/kg) [12] ($n = 6$ and 6 , respectively) (Series 4), and before and 5 min after i.v. pretreatment with the 5-HT₃ receptor antagonist, ondansetron (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [13] ($n = 6$ and 5 , respectively) (Series 5). To determine the location of the afferent C-fiber endings involved in elicitation of cardiovascular responses, EOAC and NP (10 mg/kg, $n = 4$ and 3 , respectively) were injected into the left ventricle, thereby bypassing the pulmonary circulation so that they would not have immediate access to the pulmonary C-fibers (Series 6). Abolition of the immediate hypotension and bradycardiac reflex (vagal reflex) of i.v. CAP (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 3$) was taken as the criterion of successful PNT with CAP (results not shown). As a control positive experiment, i.v. pretreatment with capsazepine (1 mg/kg, $n = 3$) and ondansetron (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 3$) almost abolished the well-known reflex bradycardiac and hypotensive responses to CAP (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) and serotonin (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), respectively (results not shown).

The last series of experiments (Series 7) was performed in conscious SHR to assess the role of cholinergic mechanism in the mediation of NP-induced cardiovascular changes. Therefore, changes in MAP and HR elicited by i.v. injections of NP (5 and 10 mg/kg) was determined in conscious rats that had been pretreated intravenously 10 min earlier with vehicle (1 mL/kg, $n = 7$) or methylatropine (1 mg/kg, $n = 5$) [14].

In vitro experiments

For isometric tension recording, each segment of superior mesenteric artery (SMA) was removed and placed in cold oxygenated KHB buffer. Segments of SMA (3 mm in length), free of fat and connective tissue, were mounted between two steel hooks in isolated tissue chambers containing gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHB, at 37 °C, under a resting tension of 0.5 g (optimal resting tension), which was readjusted every 15 min during a 45-min equilibration period before drug administration. Isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (Letica TRI 201; Panlab, S.L., Barcelona, Spain) connected to an acquisition system (ML870/P ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Vessels were initially exposed twice to 75 mM KCl to check their functional integrity. After 30 min, rings were contracted with a concentration of PHE inducing

50–70% of the contraction induced by KCl and acetylcholine (1 μM) was then added to assess endothelium integrity. Sixty minutes later, relaxation to increasing concentrations (0.1–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the EOAC ($n = 5$) or NP ($n = 6$) was assessed in endothelium-intact SMAs precontracted with PHE. Contraction data were expressed as a percentage of the PHE-induced contraction.

Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm SEM. Maximal changes in MAP and HR were expressed as a percentage of baseline values. For in vitro experiments, the IC₅₀ value, defined as the EOAC and NP concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) required producing a half maximum reduction of PHE-induced contraction was used to evaluate vascular sensitivity to EOAC and NP. The significance ($P < 0.05$) of results was assessed by paired Student's *t*-test, Mann–Whitney U-test and one-way (doses) analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparison test when appropriate.

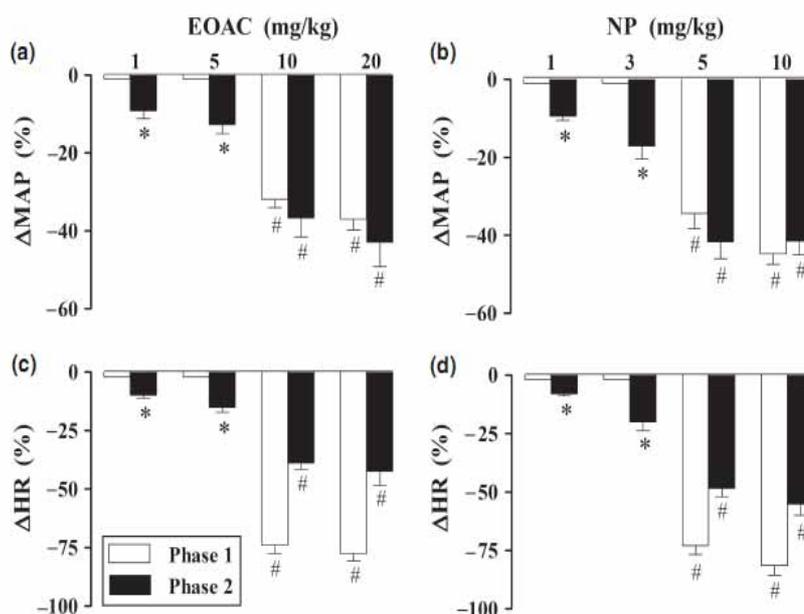
RESULTS

The purity of NP isolated from EOAC by silica column chromatography was 98%. Average baseline MAP and HR values recorded in anesthetized SHR ($n = 64$) before any treatment were 152.2 ± 3.2 mmHg and 354 ± 5 beats/min, respectively.

In vivo experiments

Injections of EOAC (1–20 mg/kg, i.v.) and NP (1–10 mg/kg, i.v.) elicited dose-dependent ($P < 0.01$, one-way ANOVA) hypotensive (Figure 2; panels a and b, respectively) and bradycardiac (Figure 2; panels c and d, respectively) effects, which became significant (Figure 2; $P < 0.05$, Dunnett's test) at 1 mg/kg. At 5 and 10 mg/kg of NP, the hypotensive (Figure 1, panel b) and bradycardiac (Figure 1, panel c) responses to NP are biphasic. The same was observed for those elicited by 10 and 20 mg/kg of EOAC. The first rapid component of EOAC- and NP-induced bradycardia and hypotension (phase 1) occurred at 1–1.5 and 1.5–2.5 s after injection, respectively, while the second component of EOAC- and NP-induced bradycardia and hypotension (phase 2) occurred at 3–6 and 4–8 s after injection, respectively. Cardiovascular responses to EOAC and NP both returned to baseline within 40–60 s. As previously reported [8,9], the same volume of vehicle (Tween 80) did not induce any significant changes in either baseline MAP or HR values.

Figure 2 Maximal decreases in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) induced by intravenous injection of the essential oil of *Aniba camellilla* (EOAC; 1–20 mg/kg) (Panels a and b, respectively) and 1-nitro-2-phenylethane (NP; 1–10 mg/kg) (Panels c and d, respectively) in pentobarbital-anesthetized spontaneously hypertensive rats. Biphasic (phases 1 and 2) hypotensive and bradycardiac effects were more evident at 5 and 10 mg/kg for NP and at 10 and 20 mg/kg for the EOAC. Data are mean \pm SEM and expressed as a percentage of baseline ($n = 6$ per group). * $P < 0.05$ and # $P < 0.01$ by paired Student's *t*-test vs. the corresponding baseline values.



Phase 1 of hypotensive and bradycardiac responses to EOAC (Figure 3; panels a and b, respectively) and NP (Figure 4; panels a and b, respectively) was completely abolished ($P < 0.01$, paired Student's *t*-test) by either cervical bivagotomy or PNT with CAP, while it was significantly unaltered by capsazepine and ondansetron pretreatments. By contrast, phase 2 of hypotensive and bradycardiac responses to EOAC (Figure 3; panels c and d, respectively) and NP (Figure 4; panels c and d, respectively) was partly but significantly reduced ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test) by either cervical bivagotomy or PNT with CAP, while it remained significantly unchanged by capsazepine and ondansetron pretreatments.

When injected directly into the left ventricle via the carotid arterial catheter with intact vagi, EOAC and NP both at 10 mg/kg did not evoke the rapid hypotension and bradycardia responses (phase 1). However, EOAC and NP induced a delayed systemic hypotension (-28.42 ± 8.92 and $-13.13 \pm 2.90\%$, respectively; baseline MAP = 149.8 ± 5.4 and 149.3 ± 7.3 , respectively) and bradycardia (-39.73 ± 15.15 and $-53.94 \pm 17.92\%$, respectively; baseline HR = 418 ± 11 and 416 ± 12 beats/min, respectively) that occurred with the same latency when compared to that observed for the phase 2 responses after their i.v. injection.

In conscious SHR, average baseline values of MAP and HR before any treatment were 170.1 ± 4.9 mmHg and 373 ± 14 beats/min, respectively (pooled data from 12 rats). Neither baseline MAP nor HR values was significantly changed following i.v. administration of vehicle or NP at the lowest dose of 1 mg/kg (data not

shown). However, bolus injection of higher doses (5 and 10 mg/kg, i.v.) of NP-evoked significant ($P < 0.01$, Dunnett's test) and very brief monophasic decreases in MAP (-48.50 ± 4.61 and $-55.34 \pm 3.41\%$, respectively) and HR (-78.76 ± 5.01 and $-88.85 \pm 3.02\%$, respectively), which occurred within about 1–3 s after the injection of NP. Pretreatment with methylatropine (1 mg/kg, i.v.) increased significantly ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test) the baseline HR (448 ± 11 vs. 387 ± 21 beats/min) without affecting baseline MAP (175.0 ± 9.3 vs. 170.6 ± 11.3 mmHg). The phase 1 decreases in MAP and HR evoked by NP (5 and 10 mg/kg) were fully abolished by methylatropine pretreatment. Similar results were observed for the monophasic hypotensive and bradycardiac responses to EOAC (10 and 20 mg/kg) (data not shown).

In vitro experiments

In SMA preparations with intact endothelium from SHR, increasing concentrations (0.1–1000 μ g/mL) of EOAC and NP inhibited the PHE-induced contractions in a concentration-dependent manner ($P < 0.001$, one-way ANOVA). The first inhibitory effect of EOAC and NP became significant at a concentration of 1 and 3 μ g/mL, respectively, while their maximal relaxation occurred at a concentration of 600 μ g/mL. The IC_{50} (μ g/mL) for EOAC- and NP-induced vasorelaxant effects were 19.0 ± 3.9 and 29.6 ± 5.4 μ g/mL, respectively. There is no significant ($P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) difference between the IC_{50} values for EOAC- and NP-induced vasorelaxant effects.

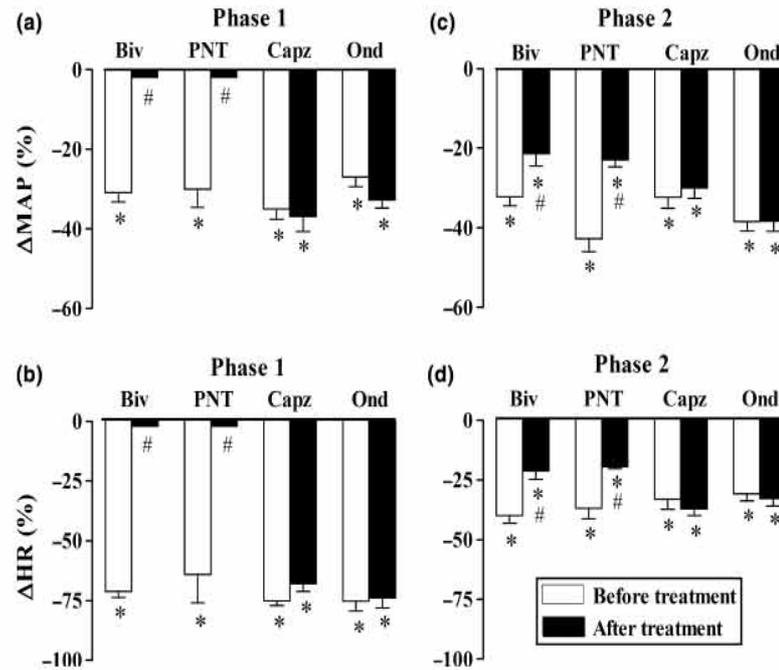


Figure 3 Phase 1 decreases in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) (Panels a and b, respectively) and phase 2 hypotensive and bradycardiac effects (Panels c and d, respectively) elicited by intravenous (i.v.) administration of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) (10 mg/kg) in four groups of pentobarbital-anesthetized spontaneously hypertensive rats: (i) before and after bivagotomy (Biv) at cervical level, (ii) before and after perineural pretreatment (PNT) of both cervical vagi with capsaicin (CAP) (250 μ g/mL), (iii) before and after pretreatment with capsazepine (Capz; 1 mg/kg, i.v.), and (iv) before and after pretreatment with ondansetron (Ond; 30 μ g/kg, i.v.). Phases 1 and 2 hypotensive and bradycardiac effects elicited by EOAC were, respectively, abolished and significantly reduced by bivagotomy and PNT with CAP but remained unaltered by capsazepine or ondansetron pretreatment. Data are mean \pm SEM and expressed as a percentage of baseline ($n = 5$ –6 rats per group). * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ by paired Student's *t*-test vs. the baseline values and the corresponding responses before any pretreatment, respectively.

DISCUSSION

This study shows that i.v. administration of higher doses of EOAC (10 and 20 mg/kg) and its main constituent NP (5 and 10 mg/kg) induced two periods of hypotension and bradycardia in anesthetized SHR. Initially, a rapid bradycardia (onset time of 1–2 s) occurred coincidentally (onset time of 2 s) with an arterial hypotension (phase 1) and then a delayed decrease in blood pressure associated with a second bradycardia (phase 2). All these effects are reversible excluding therefore the possibility that they might have been related to a putative toxic effect of EOAC and NP.

This study focused on the initial and rapid bradycardia that occurred concomitantly with the initial hypotension (phase 1). Phase 1 hypotensive and bradycardiac responses to EOAC and NP were fully abolished in bivagotomized, anesthetized SHR. Following pretreatment of conscious SHR with i.v. methylatropine, a peripheral nonselective muscarinic receptor antagonist,

NP-induced phase 1 cardiovascular responses were also abolished. Our data indicate that EOAC- and NP-induced phase 1 hypotensive and bradycardiac responses are mediated by a vagal reflex and an efferent cholinergic mechanism. Furthermore, PNT with CAP of both cervical vagi, which has been demonstrated to selectively block the conduction of C-fiber afferents [(15), the present study] fully prevented the phase 1 bradycardia and hypotension evoked by EOAC and NP. Taken together, these findings suggest that i.v. treatment with EOAC and NP stimulates vagal sensory C-fibers to elicit vago-vagal reflex decreases in HR and blood pressure. It is well known that baroreceptor-mediated responses to vasodepressor stimuli become blunted in anesthetized pentobarbital rats [16,17]. It is possible that intact reflex regulation of blood pressure in conscious rats may mask phase 2 of NP-induced cardiovascular responses seen in anesthetized rats, and therefore it is responsible for the monophasic nature of the NP-induced cardiovascular effects in conscious

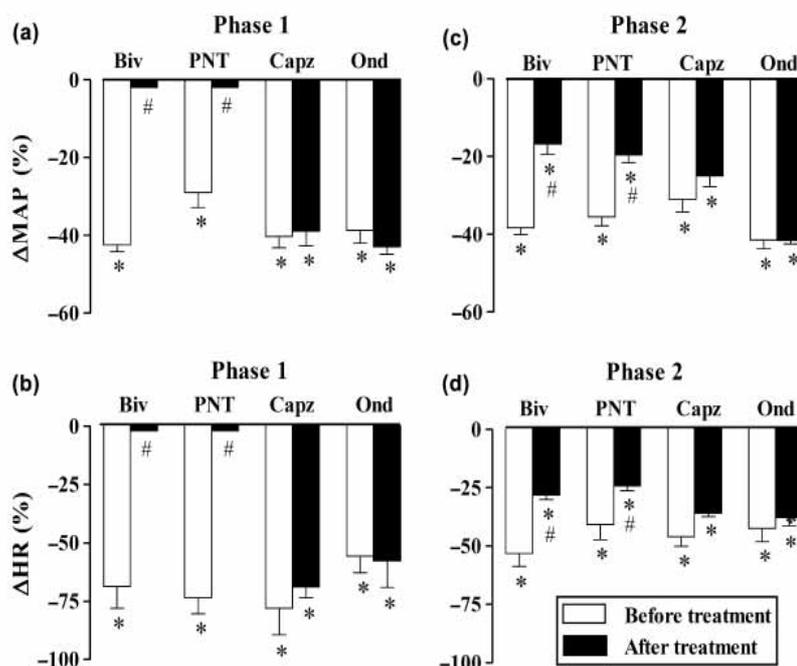


Figure 4 Phase 1 decreases in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) (panels a and b, respectively) and phase 2 hypotensive and bradycardiac effects (panels c and d, respectively) elicited by intravenous (i.v.) administration of 1-nitro-2-phenylethane (NP; 10 mg/kg) in four groups of pentobarbital-anesthetized spontaneously hypertensive rats: (i) before and after bivagotomy (Biv) at cervical level, (ii) before and after perineural pretreatment (PNT) of both cervical vagi with capsaicin (CAP) (250 μ g/mL), (iii) before and after pretreatment with capsazepine (Capz; 1 mg/kg, i.v.), and (iv) before and after pretreatment with ondansetron (Ond; 30 μ g/kg, i.v.). Phases 1 and 2 hypotensive and bradycardiac effects elicited by 1-nitro-2-phenylethane (NP) were, respectively, abolished and significantly reduced by bivagotomy and PNT with CAP but remained unaltered by capsazepine or ondansetron pretreatment. Data are mean \pm SEM and expressed as a percentage of baseline ($n = 5$ –6 rats per group). * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ by paired Student's t -test vs. the baseline values and the corresponding responses before any pretreatment, respectively.

SHRs. One may suggest that EOAC and NP activate vagal sensory C-fibers indirectly via its metabolites. However, this hypothesis seems unlikely because the latency of the EOAC- and NP-induced reflex response is too short to be the result of a metabolic pathway and/or a secondary effect of the release of other substances by EOAC and NP. To examine the origin of the EOAC- and NP-induced reflex, we compared the cardiovascular responses to EOAC and NP injected into the left ventricle to those elicited by their i.v. injections. When EOAC and NP were injected into the left ventricle, the rapid bradycardia and hypotension reflex (phase 1) was absent, suggesting that it is not due to reflex originating from the heart, but seems to result from stimulation of pulmonary C-fiber afferents. It is known that activation of these afferents by various chemical agents induces the transient systemic hypotension that accompanies the reflex bradycardia [18–20].

Attempts have been made to examine the receptor specificity of the EOAC- and NP-induced bradycardiac and depressor reflex. As phase 1 cardiovascular

responses to EOAC and NP occurred as rapidly as the well-known vago-vagal reflex responses elicited by i.v. injections of CAP [21,22] or the 5-HT₃ receptor agonist serotonin [23], we investigated therefore the possibility that EOAC and NP could induce a CAP- or serotonin-like bradycardiac and depressor reflex. However, the vago-vagal reflex evoked by EOAC and NP is not mediated by activation of vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors (and/or secondary to release of endogenous 5-HT) because it was unaffected by capsazepine and the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron pretreatment, respectively. At the present time, we have no clues regarding the nature of receptors present on sensory vagal afferents that initiate the EOAC- and NP-induced reflex activity involving vagal afferent and efferent nerve fibers. Further experiments are necessary to address this issue.

It is noteworthy that phase 2 bradycardiac and hypotensive responses to EOAC and NP were slightly but significantly reduced by either bilateral vagotomy or PNT of both vagus nerves with CAP. This indicates that part of this phase 2 response appears to be mediated

partially through activation of afferent vagal C-fibers. The remaining phase 2 hypotension after these pretreatments seems to result from a direct vasodilatory effect of EOAC or NP on the peripheral smooth muscle. This hypothesis is supported by the following lines of evidence. First, EOAC and NP induced a concentration-dependent vasorelaxation in PHE-precontracted isolated SMA preparations. This study was not aimed to assess the mechanism underlying these vasorelaxant effects, and further experiments are needed to address this issue. Second, a hypotensive response was also observed after left ventricle injection of EOAC and NP and could not be completely abolished by either bilateral vagotomy or PNT with CAP of both vagus nerves, and finally EOAC- and NP-induced phase 2 hypotension was more potent on diastolic arterial blood pressure, suggesting that it is most likely due to the decrease in the peripheral vascular resistances.

The effects of NP described in this study in SHR were similar to those recently reported in normotensive rats by de Siqueira *et al.* [24]. In brief, NP-induced cardiovascular responses also characterized by two phases (phases 1 and 2) mediated through a similar mechanism as that reported herein in SHR, i.e. stimulation of vagal pulmonary C-fiber afferents with no participation of both vanilloid TPRV₁ and 5-HT₃ receptors for NP-induced phase 1 vago-vagal reflex and peripheral vasodilatation for NP-induced phase 2 hypotension response [24]. Assuming that a similar phenomenon would probably be observed in Wistar Kyoto rats, control experiments in these animals were not considered as necessary in this study.

Both *in vivo* and *in vitro* effects of the EOAC in SHR are mimicked by its main constituent NP, indicating that they are mostly attributed to the action of NP. Methyl-eugenol, the second constituent of the EOAC, could not mediate the vago-vagal hypotensive and bradycardiac responses (phase 1) to EOAC because bilateral vagotomy in anesthetized rats reduced the bradycardiac effects of methyleugenol without affecting the hypotension [25]. However, a putative partial contribution of methyleugenol in mediating the vasorelaxant effects (phase 2) of EOAC could not be discarded.

It is concluded that *i.v.* treatment of pentobarbital-anesthetized SHR with NP induces a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1) that apparently result from the stimulation of vagal pulmonary rather than cardiac C-fiber afferents. The transduction mechanism of the NP excitation of C-fiber endings is not fully understood and seems not to involve the activation of

either vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors located on vagal sensory nerves. The second hypotensive response (phase 2) to *i.v.* NP seems to result, at least in part, from its direct vasodilatory effect on the peripheral smooth muscle. All *in vivo* and *in vitro* effects of EOAC reported herein are mainly attributed to the actions of its main constituent NP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the 'Conselho Nacional de Pesquisa' (CNPq), 'Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (FUNCAP) and the 'Universidade Federal de Pernambuco' (UFPE). Expert reviewing of the manuscript by Dr. Steven D. Aird (UMUC Asia, Biology, Okinawa-ken, Japan) is gratefully acknowledged. LFL Interaminense, RJB de Siqueira, and JK da Silva are Ph.D. Fellowship students.

ABBREVIATIONS LIST

CAP – capsaicin
 EOAC – essential oil of *Aniba canelilla*
 HR – heart rate
 MAP – mean arterial pressure
 NP – 1-nitro-2-phenylethane
 PHE – phenylephrine
 PNT – perineural treatment
 SHR – spontaneously hypertensive rat

REFERENCES

- Naranjo P., Kijjoo A., Giesbrecht A.M., Gottlieb O.R. *Ocotea quixos*, American cinnamon. *J. Ethnopharmacol.* (1981) **4** 233–236.
- Maia J.G., Zoghbi M.G., Andrade E.H. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Brazil, 2001.
- Gottlieb O.R., Magalhães M.T. Essential oil of bark and wood of *Aniba canelilla*. *Perf. Essent. Oil Res.* (1960) **50** 69–70.
- Tieman D., Taylor M., Schauer N., Fernie A.R., Hanson A.D., Klee H.J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) **103** 8287–8292.
- Gottlieb O.R., Magalhães M.T., Mors W.B. On the biogenesis of organic nitroderivatives and propenylbenzenes. *An. Acad. Bras. Ciênc.* (1961) **33** 301–303.
- Oger J.M., Richomme P., Guinaudeau H., Bouchara J.P., Fournet A. *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res.* (1994) **6** 493–497.

- 7 Maia J.G., Sousa P.J., Fontes Júnior E.A., Santos A.M. Volatile compounds and antispasmodic activity of the stem bark oil of *Aniba canelilla*. XII Congresso Ítalo-latinoamericano de Etno-medicina. RJ, Brazil, 2003.
- 8 da Silva J.K., Sousa P.J., Andrade E.H., Maia J.G. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. J. Agric. Food. Chem. (2007) **55** 9422–9426.
- 9 de Lima A.B., Santana M.B., Cardoso A.S. et al. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent component of *Aniba canelilla* essential oil. Phytomedicine (2009) **16** 555–559.
- 10 Lahlou S., Magalhães P.J., de Siqueira R.J. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. J. Cardiovasc. Pharmacol. (2005) **46** 412–421.
- 11 de Siqueira R.J., Leal-Cardoso J.H., Couture R., Lahlou S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (2006) **33** 238–247.
- 12 Malinowska B., Kwolek G., Göthert M. Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. (2001) **364** 562–569.
- 13 Bagchi S., Deshpande S.B. Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom-induced augmentation of cardiac reflexes is mediated through the involvement of peripheral 5-HT₃ and central 5-HT_{1A} receptor subtypes. Toxicon (1999) **37** 1697–1709.
- 14 Vasquez E.C., Krieger E.M. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in the rat. Braz. J. Med. Biol. Res. (1982) **15** 377–387.
- 15 Jansc  G., Such G. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. J. Physiol. (1983) **34** 359–370.
- 16 Bedran-de-Castro M.T., Farah V.M., Krieger E.M. Influence of general anesthetics on baroreflex control of circulation. Braz. J. Med. Biol. Res. (1990) **23** 1185–1193.
- 17 Barringer D.L., Bu ag R.D. Differential anesthetic depression of chronotropic baroreflexes in rats. J. Cardiovasc. Pharmacol. (1990) **15** 10–15.
- 18 Brugere S., Saavedra A., Penna M. Cardiorespiratory inhibitory reflex induced by intravenous administration of acetaldehyde in rats. Alcohol (1986) **3** 317–322.
- 19 Coleridge J.C.G., Coleridge H.M. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. (1984) **99** 1–110.
- 20 Dawes G.S., Comroe J.H. Jr. Chemoreflexes from the heart and lungs. Physiol. Rev. (1954) **34** 167–201.
- 21 Donnerer J., Lembeck F. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. (1982) **320** 54–57.
- 22 Yeh J.L., Lo Y.C., Wang Y., Chen I.J. Cardiovascular interactions of nonivamide, glyceryl nonivamide, capsaicin analogues, and substance P antagonist in rats. Brain Res. Bull. (1993) **30** 641–648.
- 23 Whalen E.J., Johnson A.K., Lewis S.J. Functional evidence for the rapid desensitization of 5-HT(3) receptors on vagal afferents mediating the Bezold-Jarisch reflex. Brain Res. (2000) **873** 302–305.
- 24 de Siqueira R.J., Macedo F.I., Interaminense L.F. et al. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. Eur. J. Pharmacol. (2010) **638** 90–98.
- 25 Lahlou S., Figueiredo A.F., Magalhães P.J., Leal-Cardoso J.H., Gloria P.D. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. Life Sci. (2004) **74** 2401–2412.

Vasorelaxant effects of the essential oil of *Aniba canelilla* and its main constituent, 1-nitro-2-phenylethane, in isolated superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Fundamental & Clinical Pharmacology</i> |
| Manuscript ID: | Draft |
| Manuscript Type: | Original Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Interaminense, Leylliane; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia de Siqueira, Rodrigo; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Xavier, Fabiano; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Duarte, Gloria; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia Magalhaes, Pedro; Federal University of Ceara, Physiology and Pharmacology Maia, Guilherme; Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos Sousa, Pergentino; Universidade Federal do Pará, Faculdade de Farmácia Lahlou, Saad; Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas |
| Keywords: | Essential oil of Aniba canelilla, Isolated mesenteric artery, 1-Nitro-2-phenylethane, Vasorelaxant effect, spontaneously hypertensive rats |
| Areas of Speciality: | Cardiovascular Pharmacology |
| | |

1
2
3 **Vasorelaxant effects of the essential oil of *Aniba canelilla* and its main**
4 **constituent, 1-nitro-2-phenylethane, in superior mesenteric arteries from**
5
6 **spontaneously hypertensive rats**
7
8
9

10
11
12
13
14 Leylliane de Fátima Leal Interaminense^a, Rodrigo José Bezerra de Siqueira^a, Fernanda
15
16 Elizabeth dos Ramos Alves^a, Fabiano Elias Xavier^a, Gloria Pinto Duarte^a, Pedro Jorge
17
18 Caldas Magalhães^b, José Guilherme Soares Maia^c, Pergentino José da Cunha Sousa^d, Saad
19
20
21 Lahlou^{e,*}
22
23

24
25
26 ^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
27
28 Brazil

29
30
31 ^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
32
33 Brazil

34
35
36 ^cFaculdade de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém,
37
38 Brazil

39
40
41 ^dFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

42
43 ^eInstituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil

44
45
46
47 ***Corresponding author:** Prof. Saad Lahlou, Instituto Superior de Ciências Biomédicas,
48
49 Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700 Campus Itaperi, 60740-000, Fortaleza,
50
51 CE, Brazil. (fax: +55 85 3101 9810, E-mail address: lahlou562@gmail.com).
52
53

54
55
56 **Running title:** Vasorelaxant effects of EOAC and NP

57
58 **Abbreviations:** EOAC, essential oil of *Aniba canelilla*; NP, 1-nitro-2-phenylethane; PHE,
59
60 phenylephrine; SHR, spontaneously hypertensive rat; MLC, myosin light chain

ABSTRACT

The present study investigated the mechanisms underlying vasorelaxant effects of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) and its main constituent 1-nitro-2-phenylethane (NP) in isolated superior mesenteric artery (SMA) from spontaneously hypertensive rats (SHRs). At 0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$, EOAC and NP relaxed SMA preparations pre-contracted with 75 mM KCl with IC_{50} [geometric mean (95% confidence interval)] values of 294.19 [158.20-94.64] and 501.27 [378.60-624.00] $\mu\text{g/mL}$, respectively); or with phenylephrine (PHE) ($\text{IC}_{50\text{s}}$ = 11.07 [6.40-15.68] and 7.91 [4.08-11.74] $\mu\text{g/mL}$, respectively). All these effects are reversible and remained unaltered by vascular endothelium removal. At 3-1000 $\mu\text{g/mL}$, EOAC and NP inhibited the concentration-response curves of KCl (25-125 mM) or PHE (10^{-10} - 3×10^{-4} M). In SMA preparations maintained under Ca^{2+} -free conditions, EOAC (600 $\mu\text{g/mL}$) reduced the PHE-, but not the caffeine-induced contraction. In Ca^{2+} -free and high K^{+} (75 mM) medium, the contractions produced by CaCl_2 or BaCl_2 were reduced or even abolished by EOAC at 100 and 600 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Similar effects were also observed with NP on the contractions induced by CaCl_2 . EOAC (10-1000 $\mu\text{g/mL}$) also relaxed the contraction evoked by phorbol dibutyrate (IC_{50} = 52.66 [10.82-94.64] $\mu\text{g/mL}$). It is concluded that EOAC has a myogenic endothelium-independent vasorelaxation through inhibitory actions on contractile events that include intracellular pathways, more than a superficial action restricted to the membrane environment such as a simple blocking activity on a given receptor or ion channel. This vasorelaxant effect of EOAC appears preferential to receptor-activated pathways and is mainly attributed to the action of its main constituent, NP.

Keywords: Essential oil of *Aniba canelilla*; Isolated mesenteric artery; 1-Nitro-2-phenylethane; Vasorelaxant effect; Spontaneously hypertensive rats.

INTRODUCTION

Aniba canelilla (H.B.K.) Mez [syn. *Aniba elliptica* A. C. Sm., *Cryptocarya canelilla* Kunth], (Lauraceae) is an aromatic plant abundant in the Amazon region, where it is commonly known as “casca-preciosa” (precious bark). This plant is an important and historically interesting species in the Amazon forest because it was confused with cinnamon trees (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) during the 1540 voyage of Pizarro and Orellana from the Andes to the Amazon estuary and during Humbolt and Bonpland’s 1800 expedition in the Orinoco River basin to find the “famous cinnamon” [1].

The trunk wood, fine stems and leaves of casca-preciosa are used as spices and ingredients for local dishes, fragrances, and sachets. In folk medicine, decoctions of bark from *A. canelilla* are commonly used for their antispasmodic, digestive stimulating and carminative properties [2]. Stem bark of *A. canelilla* has an essential oil content of 1% by dry weight. The odoriferous principle of leaf, bark, and trunk wood of *A. canelilla* is 1-nitro-2-phenylethane (NP) (Figure 1), also responsible for the plant’s cinnamon scent [3]. Methyleneugenol is also an important volatile constituent of the essential oil of *A. canelilla* (EOAC) [3]. NP is considered to be a major contributor to tomato flavor, as are 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylethanol [4]. Nitroderivatives found in higher plants are rare. In the case of NP, its biogenesis involves phenylalanine oxidation followed by spontaneous decarboxylation [5]. Oger and co-workers reported fungistatic properties for bark EOAC [6]. Furthermore, it has been reported that bark EOAC exerts relaxant effects on intestinal smooth muscle, supporting the use of the plant in folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders [7]. Recently, antioxidant activity of the EOAC and NP [8] as well as antinociceptive activity of NP [9] have been reported.

Recently, we showed that intravenous (i.v.) administration of EOAC and its main constituent NP induced two periods of hypotension and bradycardia in anesthetized, spontaneously hypertensive rats (SHRs). Initially a rapid bradycardia (onset time of 1-2 sec)

1
2
3 occurred coincidentally (onset time of 2 sec) with an arterial hypotension (phase 1) and then,
4
5 a delayed decrease in blood pressure associated with a second bradycardia (phase 2) [10].
6
7 Several lines of evidence showed that phase 1 bradycardiac and depressor responses to EOAC
8
9 are of reflex origin (vago-vagal reflex), that apparently result from the stimulation of vagal
10
11 pulmonary rather than cardiac C-fiber afferents. The transduction mechanism of the EOAC
12
13 excitation of C-fiber endings is not fully understood and seems not to involve the activation of
14
15 either vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors located on vagal sensory nerves [10]. The second
16
17 hypotensive response (phase 2) to i.v. EOAC resulted, at least in part, from its direct
18
19 vasodilatory effect on the peripheral smooth muscle. All *in vivo* and *in vitro* effects of EOAC
20
21 reported herein are mimicked by its main constituent NP [10]. These *in vitro* and *in vivo*
22
23 effects have been also observed with NP in normotensive rats [11]. The present study
24
25 investigated the mechanism(s) underlying the vasorelaxant effects of the EOAC in isolated
26
27 superior mesenteric artery (SMA) preparations from SHR.
28
29
30
31
32

33 MATERIALS AND METHODS

34 Plant material

35
36
37 Barks of *A. canelilla* were collected in May, 2005, in the area of Cauaxi River, Municipality
38
39 of Paragominas, southeast of Pará state, Brazil. Its identification was confirmed by Dr. da
40
41 Silva M.H.L. (Department of Botanic, Emílio Goeldi Museum, Belém, Pará, Brazil). A
42
43 voucher specimen (#174904) is deposited in the herbarium of Emílio Goeldi Museum, in the
44
45 city of Belém, Pará State, Brazil.
46
47
48
49

50 Essential oil distillation, fractionation and analysis

51
52
53 Bark was air-dried, grinded and submitted to hydrodistillation (100g, 4 h) using a Clevenger-
54
55 type apparatus. Analytical conditions, composition of the EOAC used in the present study and
56
57 retention indices of its constituents have been previously reported [10,12]. The sample of
58
59 EOAC used in the present study contained 52.4% of NP, 38.6% of methyleugenol and other
60

1
2
3 minor constituents [10,12]. In order to purify the main constituent NP, bark essential oil (15g)
4
5 was submitted to fractionation in a silica gel chromatographic column using petroleum ether
6
7 (isocratic elution) and thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate, 9:1). The percentage
8
9 content of NP in the oil and in the purified fractions was obtained in a Thermo Focus GC/FID
10
11 operated under the following conditions: WCOT DB-5ms (30 m x 0.25 mm; 0.25 μ m film
12
13 thickness) fused silica capillary column; temperature programmed, 60-240 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/min);
14
15 injector and detector temperatures, 220 and 250 $^{\circ}$ C; carrier gas, nitrogen; injection type,
16
17 splitless (2 μ L, of a 1:1000 hexane solution).
18
19
20
21

22 Solutions and drugs

23
24 EOAC and NP were first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemicals Co., St
25
26 Louis, MO, USA) up to 1% of the total volume, made up with the perfusion medium and
27
28 sonicated just before use. The perfusion medium used was fresh Krebs-Henseleit solution
29
30 (KHS) buffer (pH 7.4) of the following composition (in mM): NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO₃
31
32 25; CaCl₂.2H₂O 2.5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄.7H₂O 1.2; glucose 11 and
33
34 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.01. In some experiments, a modified KHS's
35
36 solution containing equimolar BaCl₂, instead of CaCl₂ was used. Phenylephrine (PHE)
37
38 hydrochloride, acetylcholine chloride, phorbol 12,13-dibutyrate (PDB), tetraethylammonium
39
40 (TEA) chloride, noradrenaline (NA), caffeine and nifedipine hydrochloride, which were all
41
42 purchased from Sigma, were first dissolved in distilled water and were made up with KHS.
43
44
45
46
47

48 Animals

49
50 Adult male SHRs (age: 16-18 weeks) were obtained from local colonies maintained at the
51
52 Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife,
53
54 Brazil. They were kept under conditions of constant temperature (22 \pm 2 $^{\circ}$ C) with a 12 h
55
56 light/12 h dark cycle and free access to food and water. All animals were cared for in
57
58 compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US
59
60

1
2
3 National Institutes of Health (NIH Publication 85-23, revised 1996). All procedures described
4
5 here were reviewed by and had prior approval from local animal ethics committee.
6

7 **Tissues preparation and experimental protocols**

8
9
10 Rats were sacrificed by cervical dislocation. For isometric tension recording, SMA was
11
12 removed and placed in cold oxygenated KHS buffer. Segments of SMA (3 mm in length),
13
14 free of fat and connective tissue, were mounted between two steel hooks in isolated tissue
15
16 chambers containing gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHS, at 37°C, under a resting tension of
17
18 0.5 g (optimal resting tension), which was readjusted every 15 min during a 45-min
19
20 equilibration period before drug administration. Isometric tension was recorded by using an
21
22 isometric force displacement transducer (Letica TRI 201, Panlab, S.L., Barcelona, Spain)
23
24 connected to an acquisition system (ML870/P ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).
25
26 Vessels were initially exposed twice to 75 mM KCl to check their functional integrity. After
27
28 30 min, rings were contracted with a concentration of PHE inducing 50-70% of the
29
30 contraction induced by KCl and acetylcholine (1 μM) was then added to assess endothelium
31
32 integrity. Sixty min later, the series of experiments 1 to 8 were performed.
33
34
35
36
37

38
39 For wire myograph experiments, small vessels corresponding to the third-order mesenteric
40
41 arteries were removed and cleaned of surrounding adhering tissue in KHS under microscope.
42
43 Segments (2 mm of length) from these mesenteric resistance arteries were mounted in a small
44
45 dual myograph chamber (DMT, model 610 M, Aarhus Denmark). Two tungsten (40 μm)
46
47 wires were introduced into the lumen of the segments and mounted according to a previously
48
49 described method [13]. After a 30 min equilibration period in oxygenated KHS at 37 °C at pH
50
51 = 7.4, segments were stretched to their optimal lumen diameter for active tension
52
53 development. This was determined based on the internal circumference-wall tension ratio of
54
55 the segments by setting their internal circumference, L_o, to 90% of what the vessels would
56
57 have if they were exposed to a passive tension equivalent to that produced by a transmural
58
59
60

1
2
3 pressure of 100 mmHg [13]. Series 9 of experiments was performed using such an
4
5 experimental setup.
6

7
8 **Series 1.** This series of experiments were carried out to assess the effects of EOAC (1-1000
9
10 $\mu\text{g/mL}$) on the spontaneous tone of endothelium-containing SMA preparations. In other
11
12 experiments, effects of vehicle at the same concentrations used to dissolve EOAC were also
13
14 studied.
15

16
17 **Series 2.** In this series of experiments, the effects of cumulative concentrations (0.1-1000
18
19 $\mu\text{g/mL}$) of EOAC and NP on the sustained contractile responses to KCl (75 mM) were studied
20
21 in endothelium-containing SMA preparations. The effects of increasing concentrations (0.1-
22
23 1000 mg/mL) of EOAC or NP on the sustained contractile responses to PHE (1 μM) were
24
25 also studied in either endothelium-containing or endothelium-denuded SMA preparations
26
27 maintained in Ca^{2+} -containing medium. In order to assess the role of potassium channels in
28
29 the effects of EOAC in PHE-contracted tissues, experiments were performed in endothelium-
30
31 containing SMA preparations incubated for 20 min with TEA (5 mM).
32
33

34
35 **Series 3.** This series of experiments were aimed to assess the inhibitory effects of pre-
36
37 exposure for 20 min to EOAC, at several concentrations (3-1000 $\mu\text{g/mL}$), or vehicle on the
38
39 contractile responses to PHE (10^{-10} - 3×10^{-4} M) or to KCl (25-125 mM) in SMA with intact
40
41 endothelium.
42
43

44
45 **Series 4.** This series of experiments were carried out to assess the inhibitory effects of EOAC
46
47 or NP on the contractions induced by exogenous Ca^{2+} in SMA preparations depolarized by
48
49 KCl (75 mM) in Ca^{2+} -free medium. Calcium-free solutions were prepared by omitting CaCl_2
50
51 from normal KHS solution. After verification of tissue responsiveness, the preparation was
52
53 maintained in free Ca^{2+} KHS solution in the presence of high concentration of KCl and EDTA
54
55 (2 mM) to remove extracellular Ca^{2+} . Thereafter, a control cumulative concentration-response
56
57 curve for Ca^{2+} (0.01-20 mM) was then performed. After washing preparation by changing
58
59
60

1
2
3 bath chamber solution, EOAC or NP (both at 100 and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the
4
5 preparation for 5 min, and their effects on cumulative concentration-response curve for CaCl_2
6
7 (0.01-20 mM) were then evaluated. Maximal response to exogenous Ca^{2+} was obtained when
8
9 an increase in the Ca^{2+} concentration did not induce a significant additional contraction. The
10
11 contractile response obtained with the first concentration-response curve for CaCl_2 was taken
12
13 as control, and the contractions were calculated as a function of the value observed to 20 mM
14
15
16
17
18 Ca^{2+} .

19
20 **Series 5.** This series of experiments was carried to assess the inhibitory effects of EOAC on
21
22 the contractions induced by exogenous Ba^{2+} , an ion that selectively passes through VOCCs
23
24 but is only slightly permeable to receptor-activated Ca^{2+} channels [14], in mesenteric
25
26 preparations depolarized by K^+ under Ca^{2+} -free conditions. After verification of tissue
27
28 responsiveness, the preparation was maintained in Ca^{2+} -free medium (containing 2 mM
29
30 EDTA), and then after 5 min 75 mM KCl was added to the bath. After 1 min, Ba^{2+} was
31
32 cumulatively added still in the presence of high K^+ . Thereafter, a control cumulative
33
34 concentration-response curve for Ba^{2+} (0.1-20 mM) was then constructed. In other
35
36 preparations, following a similar protocol, EOAC (100 and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the
37
38 preparation for 5 min, and then a second cumulative concentration-response curve for Ba^{2+}
39
40 was obtained.

41
42
43
44
45
46 **Series 6:** In this series of experiments, inhibitory effects of increasing concentrations (10-
47
48 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of EOAC on the contraction elicited by PDB (1 μM) were studied in
49
50 endothelium-containing SMA preparations incubated in Ca^{2+} -free medium with EDTA (2
51
52 mM).
53

54
55
56 **Series 7:** To investigate whether OEAC inhibitory actions could also be partially due to the
57
58 blockade of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channels activated by IP_3 , the effects of EOAC on
59
60 PHE-induced contractions in Ca^{2+} -free medium were determined as follows. After the usual

1
2
3 stabilization time, the tissues were washed with Ca^{2+} -free solution for 6 min. PHE (1 μM) was
4
5 added to produce a transient contraction. After washing the tissues with Ca^{2+} -containing KHS
6
7 solution, 75 mM KCl was added for Ca^{2+} internal stores loading. The preparations were
8
9 washed with Ca^{2+} -free solution followed by the addition EOAC (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 min later.
10
11 After 5 min, PHE (1 μM) was administered still in the presence of EOAC.
12
13

14
15 **Series 8:** In the series of experiments, the effects of EOAC on caffeine-induced contractions
16
17 in Ca^{2+} -free medium were determined. After the usual stabilization time, the tissues were
18
19 washed with Ca^{2+} -free solution for 6 min, with the temperature maintained at 25 °C.
20
21 Thereafter, caffeine (20 mM) was added in the medium and produced a transient contraction.
22
23 After washing the tissues with KHS solution, high KCl (75 mM) was added for Ca^{2+} internal
24
25 stores loading. The preparations were washed with Ca^{2+} -free solution and the vasorelaxant
26
27 effects of EOAC (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), added for 5 min before the administration of caffeine, were
28
29 determined.
30
31

32
33
34 **Series 9:** After a 45 min-equilibration period, each mesenteric resistance arterial segment was
35
36 exposed twice to KCl (120 mM) to assess its maximum contractility. Thirty min later, rings
37
38 were contracted with a concentration of NA (1 μM) that induced approximately 50% of the
39
40 KCl contraction, and then acetylcholine (1 μM) was added to assess the integrity of the
41
42 endothelium. After 60 min, the effects of increasing concentrations (0.1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of
43
44 EOAC on sustained contractile responses to NA (1 μM) were studied in preparations with
45
46 intact endothelium.
47
48

49 50 51 **Statistical analysis**

52
53 All results are expressed as the mean \pm SEM. Peak deflection of the contraction after each
54
55 concentration of EOAC, NP, calcium, barium was used to construct a concentration-response
56
57 curve, and was expressed as a percentage of control contraction to a given contractile agent
58
59 obtained in the absence of EOAC or NP. The IC_{50} value, defined as the EOAC and NP
60

1
2
3 concentration ($\mu\text{g/mL}$) required producing a half maximum reduction of PHE- or KCl-
4
5 induced contractions was used to evaluate vascular sensitivity to EOAC or NP. It was
6
7 calculated calculated by interpolation from semi-logarithmic plots, and were expressed as
8
9 geometric mean (95% confidence interval). The significance ($P < 0.05$) of results was
10
11 assessed by unpaired Student's *t*-test, Mann-Whitney U-tests, and one- or two-way analysis of
12
13 variance (ANOVA), followed by Bonferroni's multiple comparison tests when appropriate.
14
15

16 17 RESULTS

18
19 The purity of NP isolated from EOAC by silica column chromatography was 98%.

20 21 Effects of EOAC on the resting tonus (Series 1)

22
23 In endothelium-containing SMA preparations, EOAC (0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$, $n = 6$) had no
24
25 significant ($P > 0.05$, one-way ANOVA) effects on resting tone (data not shown).
26
27

28 29 Relaxant effects of EOAC and NP on the sustained contraction induced by KCl or PHE 30 31 (Series 2)

32
33 At 0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$, both EOAC ($n = 4$) and NP ($n = 6$) evoked a significant and
34
35 concentration-dependent (*Figure 2a*; $P < 0.001$, one-way ANOVA) relaxation of the
36
37 endothelium-containing SMA preparations pre-contracted with 75 mM KCl with an IC_{50}
38
39 value significantly ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test) lower for EOAC (294.19 [152.80-
40
41 435.50] $\mu\text{g/mL}$) when compared to that of NP (501.27 [378.60-624.00] $\mu\text{g/mL}$). Relaxant
42
43 effects of EOAC and NP became significant at a concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ (*Figure 2a*; $P <$
44
45 0.001, one-way ANOVA and Bonferroni's test).
46
47
48

49
50 In endothelium-containing SMA preparations pre-contracted with PHE (1 μM), EOAC (0.1-
51
52 1000 $\mu\text{g/mL}$, $n = 9$) and NP (0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$, $n = 6$) also induced a similar ($P > 0.05$, Mann-
53
54 Whitney U-test) and concentration-dependent ($P < 0.001$, one-way ANOVA) relaxation with
55
56 IC_{50} values (11.07 [6.40-5.68] and 7.91 [4.08-11.7] $\mu\text{g/mL}$, respectively) significantly lower
57
58 than those obtained for relaxant K^+ -induced contractions ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test).
59
60

1
2
3 The first inhibitory effect of EOAC became significant ($P < 0.05$, one-way ANOVA and
4 Bonferroni's test) at a concentration of 3 and 10 $\mu\text{g/mL}$ for EOAC (*Figure 2b*) and NP
5 (*Figure 2c*), respectively. Maximal relaxation of the PHE-elicited contraction occurred at a
6 concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$ (*Figures 2b,2c*) while the inhibition of K^+ -induced contraction
7 was yet partial even at the highest concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$) of EOAC and NP (*Figure 2a*).
8
9

10
11 This smooth muscle-relaxing activity of EOAC and NP against PHE-evoked responses
12 remained unaltered by vascular endothelium removal (*Figures 2b,2c*) as evidenced by the
13 non-significant ($P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) differences between IC_{50} values obtained in
14 endothelium-containing and those in endothelium-denuded SMA preparations (12.43 [1.51-
15 23.25] and 13.56 [4.11-31.23] $\mu\text{g/mL}$, $n = 4$ and 4 respectively).
16
17

18
19 In order to assess the role of potassium channels in these effects, experiments have been
20 performed in PHE-contracted endothelium-containing SMA preparations incubated for 20
21 min with TEA, a nonspecific potassium channel antagonist. Under these conditions, EOAC
22 (0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$, $n = 12$) relaxed in a concentration-dependent manner the contractions
23 evoked by PHE, with an IC_{50} value of 14.57 [10.32-18.81] $\mu\text{g/mL}$. This value did not differ
24 significantly ($P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) from that obtained in the absence of TEA
25 (*Figure 2b*). Furthermore, vehicle ($n = 5$) added cumulatively in concentrations used to
26 dissolve EOAC and NP did not affect significantly ($P > 0.05$, one-way ANOVA) the PHE-
27 induced contractions (*Figure 2c*).
28
29

30 **Inhibitory effects of EOAC or NP on the contractions induced by KCl or PHE (Series 3)**

31
32 Pre-exposure of endothelium-containing SMA preparations for 5 min to a given concentration
33 (3-1000 $\mu\text{g/mL}$) of EOAC inhibited the concentration-dependent contractions induced by the
34 increasing cumulative concentrations of KCl (25-150 mM, $n = 4-8$) (*Figure 3a*) or PHE (10^{-10} -
35 3×10^{-4} M, $n = 5-7$) (*Figure 3b*). For both contractile agents, the inhibitory effects of
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 EOAC became significant ($P < 0.05$, two-way ANOVA) at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$
4
5
6 (*Figures 3a, 3b*).

7
8 **Inhibitory effects of EOAC or NP on Ca^{2+} -induced contractions in KCl-depolarized**
9
10 **preparations (Series 4)**

11
12 In SMA preparations with intact endothelium incubated in Ca^{2+} -free medium in the presence
13
14 of high KCl solution, increasing concentrations of CaCl_2 (0.1-20 mM) evoked the expected
15
16 concentration-dependent contractions ($P < 0.001$, one-way ANOVA), an effect that became
17
18 significant at a concentration of 0.5 mM ($n = 4$, $P < 0.05$, one-way ANOVA and Bonferroni's
19
20 test) and attained a maximal magnitude at 10 mM (*Figures 4a, 4b*). Contractions due to Ca^{2+}
21
22 addition were significantly ($P < 0.01$, two-way ANOVA) reduced or even abolished by
23
24 EOAC at 100 ($n = 4$) and 600 ($n = 6$) $\mu\text{g/mL}$, respectively (*Figure 4a*). Similar results were
25
26 observed for NP at 100 ($n = 6$) and 600 ($n = 6$) $\mu\text{g/mL}$ (*Figure 4b*; $P < 0.01$, two-way
27
28 ANOVA). Maximal response reached with 20 mM of CaCl_2 in the presence of the EOAC
29
30 (600 $\mu\text{g/mL}$) was of the same order of magnitude ($P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) as that
31
32 observed in the presence of NP (600 $\mu\text{g/mL}$) (*Figures 4a, 4b*).

33
34 **Effects of EOAC on barium-induced contractions in SMA preparations depolarized**
35
36 **with KCl under Ca^{2+} -free conditions (Series 5)**

37
38 In mesenteric rings incubated in Ca^{2+} -free medium in the presence of high K^+ (75 mM)
39
40 solution, increasing concentrations of BaCl_2 (0.1-20 mM, $n = 10$) evoked concentration-
41
42 dependent contractions (*Figure 5*) that became significant at a concentration of 0.5 mM ($P <$
43
44 0.05, one-way ANOVA and Bonferroni's test). This effect was significantly ($P < 0.01$, two-
45
46 way ANOVA) reduced by pre-exposure of the preparation for 5 min to OEAC 100 ($n = 7$) and
47
48 even abolished by 600 ($n = 6$) $\mu\text{g/mL}$ EOAC. Like with OEAC (600 $\mu\text{g/mL}$), the contraction
49
50 evoked by BaCl_2 was also abolished ($P < 0.01$, two-way ANOVA) by the addition of the
51
52 positive control nifedipine (1 μM , $n = 6$) in the bath (*Figure 5*).

1
2
3 **Effects of EOAC or NP on the sustained contraction induced by PDB under Ca²⁺-free**
4 **conditions (Series 6)**
5

6
7
8 In SMA preparations incubated in Ca²⁺-free medium (with 2 mM EDTA), the PKC activator
9
10 PDB (1 μM) induced a sustained contraction corresponding to 173.72 ± 9.98% of the K⁺-
11
12 induced contraction. When the contraction reached steady state, non-cumulative addition of
13
14 increasing concentrations of EOAC (10-1000 μg/mL, n = 8) significantly reduced the PDB-
15
16 induced contractions in a concentration-dependent manner (*Figure 6*; *P* < 0.001, one-way
17
18 ANOVA). The effect of EOAC became significant at 10 μg/mL (*Figure 6*; *P* < 0.001, one-
19
20 way ANOVA and Bonferroni's tests) with an IC₅₀ value of 52.66 [10.82-94.64] μg/mL.
21
22

23
24
25 **Effects of OEAC on phenylephrine-induced contractions in Ca²⁺-free medium (Series 7)**
26

27
28 When extracellular Ca²⁺ was removed by using a Ca²⁺-free solution (with 2 mM EDTA), PHE
29
30 (1 μM) induced a transient contraction which corresponded to 64.17 ± 6.35% of the PHE-
31
32 induced response under normal Ca²⁺. Pre-exposure of SMA preparations for 5 min to 600
33
34 μg/mL of EOAC (n = 7) significantly (*P* < 0.001, paired Student's *t*-test) reduced the phasic
35
36 contraction induced by PHE to 17.07 ± 1.54%.
37
38

39
40 **Effects of EOAC on caffeine-induced contraction in Ca²⁺-free medium (series 8)**
41

42
43 In this series of experiments, caffeine was used as a pharmacological tool to assess whether
44
45 EOAC is able to inhibit a contraction induced by Ca²⁺-releasable Ca²⁺ release from the
46
47 sarcoplasmic reticulum. In SMA preparations with intact endothelium maintained under
48
49 Ca²⁺-free conditions, caffeine-induced contraction remained significantly (*P* > 0.05, paired
50
51 Student's *t*-test) unaltered by EOAC (600 μg/mL, n = 6) (18.68 ± 1.09 and 29.40 ± 2.21% of
52
53 the contraction induced by 75 mM of potassium in the absence of EOAC)
54
55

56
57 ***Relaxant effects of OEAC on the sustained contractions induced by noradrenaline in***
58
59 ***mesenteric resistance arteries (Series 9)***
60

1
2
3 In mesenteric resistance arteries preparations with intact endothelium, EOAC at the same
4 concentrations (0.1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n = 8$) used in SMA preparations also relaxed the
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In mesenteric resistance arteries preparations with intact endothelium, EOAC at the same concentrations (0.1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n = 8$) used in SMA preparations also relaxed the contractions evoked by noradrenaline (1 μM) in a concentration-dependent manner (*Figure 7*, $P < 0.001$, one-way ANOVA) with an IC_{50} value of 28.76 [13.52-44.01] $\mu\text{g}/\text{mL}$. This vasorelaxant effect became significant at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Figure 7*; $P < 0.05$, one-way ANOVA and Bonferroni's test). No significant ($P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) difference was observed between the IC_{50} values in mesenteric resistance arteries and SMA preparations.

DISCUSSION

The present study showed that EOAC induced an endothelium-independent relaxation in mesenteric rings from SHRs which seems mainly attributed to the action of its main constituent, NP. It might have suggested that EOAC- or NP-induced vasorelaxant effects have been related to their putative toxic effects. However, two lines of evidences do not support this hypothesis. First, under our experimental conditions, all vasodilator responses to these two essential oils were reversible (data not shown). Second, both EOAC and NP show low toxicity, with a LD_{50} of 720 and 712 mg/kg body weight, respectively, when administered *per os* to rats [15,16]. In addition, in mesenteric resistance arteries preparations with intact endothelium, EOAC evoked concentration-dependent relaxation of the contractions evoked by NA with a pharmacological potency similar to that observed in SMA preparations. The finding corroborated our previous hypothesis that the second hypotensive response (phase 2) to i.v. EOAC in either normotensive [11] or SHRs [10] resulted, at least in part, from its direct vasodilatory effect on the peripheral smooth muscle leading to reduced peripheral vascular resistance.

In the present study, putative participation of the vascular endothelium in modulating EOAC- and NP-induced relaxation has been investigated. Our results show that the smooth muscle-

1
2
3 relaxing activity of EOAC and NP in SMA is independent on the integrity of endothelial layer
4
5 as it remained unaltered by vascular endothelium removal. This was evidenced by the non-
6
7 significant differences between IC_{50} values obtained in endothelium-containing and those in
8
9 endothelium-denuded SMA preparations pre-contracted with PHE. This finding contrasts with
10
11 that observed with EOAC in isolated aortic ring preparations from normotensive rats [12]. In
12
13 the latter preparations, concentration-relaxation curve of EOAC was slightly shifted to the
14
15 right following removal of vascular endothelium. Notwithstanding, since maximal efficacy for
16
17 the relaxant effect induced by EOAC was not changed by endothelium removal, it is
18
19 reasonable to think that its myorelaxant effects have a predominantly myogenic nature.
20
21
22
23

24 The hypothesis of a myogenic action is reinforced by the results obtained with ring
25
26 preparations depolarized with high K^+ concentrations. In the present study, EOAC and NP
27
28 inhibited the concentration-dependent contractions induced by K^+ , suggesting that they might
29
30 interfere with electromechanical coupling. Moreover, they relaxed preparations maintained in
31
32 presence of 75 mM $[K^+]$. These findings allow us to conclude that: (i) the relaxant effects of
33
34 EOAC and NP could not be explained by an intramural neuron influence on vascular smooth
35
36 cell layers because so high $[K^+]_o$ depolarizes cell membrane to approximately -20 mV [17,18],
37
38 a value that depresses action potential in neurons by slowing Na^+ channel recovery from
39
40 inactivation [19]. (ii) the inhibitory actions of EOAC and NP also could not be attributed to a
41
42 putative ability of these substances in producing K^+ -channel opening because when smooth
43
44 muscle cell is depolarized, it activates outward rectifier channels increasing K^+ conductance
45
46 and turning the transmembrane potential very close to the K^+ equilibrium potential as predicted
47
48 by the Nernst equation for a K^+ electrode [20]. Under such conditions, it is very unlikely that a
49
50 K^+ -channel opener could displace the transmembrane potential from the K^+ equilibrium
51
52 potential. This conclusion was therefore supported by the finding that pre-incubation of SMA
53
54 preparations with the non-selective potassium channel antagonism TEA was unable to alter
55
56
57
58
59
60

1
2
3 significantly the vasorelaxant effects of EOAC. Thus, in conjunction with the results obtained
4
5 in endothelium-denuded SMA, it is improbable that relaxation of KCl-induced contraction
6
7 may be due to a direct or even indirect (e.g. by means of endothelium-derived hyperpolarizing
8
9 factor- EDHF release) hyperpolarization caused by EOAC and NP.

10
11
12 Regarding the excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle, it is well known
13
14 that high KCl induces membrane depolarization, which, in turn, opens the voltage-operated
15
16 Ca^{2+} channels (VOCCs), increases Ca^{2+} influx and $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and elicits sustained contraction
17
18 following myosin light chain (MLC) phosphorylation [21]. In contrast, contractions resulting
19
20 from α_1 -adrenoceptor stimulation by PHE are biphasic: an initial phase component due to IP_3 -
21
22 induced intracellular Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum followed by a sustained phase,
23
24 which develops slowly and depends upon dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} influx through
25
26 receptor-operated channels (ROCCs).
27
28
29

30
31
32 The ability of EOAC and NP to inhibit contractions caused by activation of VOCCs in SMA
33
34 rings was investigated. The involvement of VOCCs in then mediation of the EOAC- and NP-
35
36 induced vasorelaxant effects in SMA preparations is supported by following lines of evidence.
37
38 First, EOAC and NP were able to inhibit the electromechanically KCl-induced contractions.
39
40 Second, EOAC and NP also reduced or even fully abolished the contractions induced by CaCl_2
41
42 in SMA preparations depolarized with high KCl in Ca^{2+} -free medium. Under these conditions,
43
44 the contractions induced by CaCl_2 are due exclusively to an increase in Ca^{2+} influx through
45
46 VOCCs. Finally, it is well known that Ba^{2+} is an ion that selectively passes through VOCCs
47
48 but is poorly permeable on receptor-activated Ca^{2+} influx [14]. In preparations incubated in
49
50 Ca^{2+} -free medium in the presence of high KCl (75 mM) solution, the contractile responses to
51
52 increasing concentrations of Ba^{2+} were reduced or fully abolished by EOAC, an effect that was
53
54 also observed with nifedipine. However, the great difference between the equi-effective
55
56 concentrations (EOAC was used at 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while nifedipine was used at 1 μM = 0.346
57
58
59
60

1
2
3 $\mu\text{g/mL}$) denotes the higher capacity of nifedipine to block Ca^{2+} channels. The Ca^{2+} channel
4
5 antagonist profile of the EOAC is consistent with our previous report using EOAC in aortic
6
7 preparations from normotensive rats [12]. Notwithstanding, whether either EOAC or NP
8
9 inhibit the transmembrane Ca^{2+} influx by acting directly as a channel blocker on voltage-
10
11 dependent Ca^{2+} channels is a question that requires further investigation.
12
13

14
15 Our results show that EOAC and NP were also able to interfere with pharmacomechanical
16
17 coupling. In the presence of nifedipine to remove the indirect influence produced by VOCC-
18
19 mediated Ca^{2+} influx, EOAC reduced the CaCl_2 -induced contractions in SMA preparations
20
21 pretreated with PHE under Ca^{2+} -free condition (data not shown). This finding, together with
22
23 the ability of EOAC and also NP to reduce PHE-induced contractions, suggests that they have
24
25 antispasmodic activity against contractile events mediated by Ca^{2+} entry through ROCCs. It is
26
27 noteworthy, however, the finding that the vasorelaxant action of EOAC and NP is greater in
28
29 preparations pre-contracted with PHE than with KCl, as evidenced by their respect IC_{50} values,
30
31 suggesting that these essential oils act preferentially upon cellular mechanisms that involve
32
33 plasmalemmal Ca^{2+} influx by ROCCs (pharmacomechanical coupling) in SMA preparations.
34
35 In a corollary with this, EOAC and NP were able to inhibit the contractions evoked by PHE in
36
37 a concentration-dependent manner. It might be suggested that the actions of EOAC and NP
38
39 may result of α_1 -adrenoceptor blockade, but a putative direct interaction with such receptors
40
41 could be discarded again because of the relaxing effects on the sustained contraction induced
42
43 by a high concentration of K^+ . In a recent paper [22], it was demonstrated that the typical α_1 -
44
45 adrenoceptor blocker prazosin relaxed only the PHE-induced contraction in mesenteric rings of
46
47 normotensive rats, while it was unable to reverse the contraction induced electromechanically
48
49 by K^+ . Similar results were already reported with the α_2 -adrenoceptor clonidine that was inert
50
51 against K^+ -elicited contractions [23]. Thus, since EOAC or NP almost fully relaxed the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 contractions induced by 75 mM K⁺, it is unlikely that they act as α_1 -adrenoceptor blocking
4
5 agents in SMA preparations from SHR.
6
7

8 The effects of EOAC on the contractions induced by intracellular events, such as Ca²⁺ release
9
10 from the internal stores located in sarcoplasmic reticulum, were also addressed in the present
11
12 study. To investigate this issue, experiments were performed in Ca²⁺-free KHS. Under such
13
14 condition, tension development activated by PHE should result only from Ca²⁺ released upon
15
16 activation of IP₃-sensitive Ca²⁺ channels [24]. Our results showed that PHE-induced transient
17
18 contractions in EOAC preparations were reduced by EOAC (600 μ g/mL). In contrast, in SMA
19
20 preparations maintained in Ca²⁺-free solution but stimulated by caffeine, an experimental
21
22 condition that cause Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum [25], suffered
23
24 no change in the amplitude of the caffeine-elicited transient contractions after treatment with
25
26 EOAC. Taken together, these findings suggest that EOAC is effective on contractions induced
27
28 by intracellular the increased Ca²⁺ availability caused by IP₃, but is inert against contractions
29
30 induced by the Ca²⁺-induced Ca²⁺-release pathway. This finding is in line with our previous
31
32 study showing that, in isolated aortic ring preparations from normotensive rats, EOAC did not
33
34 alter the contractions evoked by caffeine.
35
36
37
38
39

40
41 In pharmacomechanical coupling, it is well-known that receptor agonists cause smooth
42
43 muscle contraction by increasing Ca²⁺ influx, [Ca²⁺]_i and by causing Ca²⁺ sensitization [26].
44
45 Activated receptors can trigger additionally Ca²⁺ sensitizing mechanisms involving PKC that
46
47 are independent of increases in Ca²⁺ [27]. In order to evaluate the effect of EOAC on Ca²⁺
48
49 sensitivity component of contraction, precisely on PKC signaling pathway, we used PDB, a
50
51 potent-specific PKC activator [28]. PDB induced a sustained contraction of endothelium-
52
53 containing SMA preparations incubated in Ca²⁺-free medium with EDTA. This effect was
54
55 relaxed after treatment with EOAC, indicating that this essential oil may interfere with cellular
56
57 events that increase PKC-mediated Ca²⁺ sensitivity to contractile proteins.
58
59
60

1
2
3 In conclusion, EOAC has a myogenic endothelium-independent relaxant activity in SMA
4 preparations from SHRs through inhibitory actions on contractile events that include
5 intracellular pathways, more than a superficial action restricted to the membrane environment
6 such as a simple blocking activity on a given receptor or ion channel. This vasorelaxant effect
7 of EOAC appears preferential to receptor-activated pathways and is mainly attributed to the
8 action of its main constituent, NP.
9

10 11 12 13 14 15 16 17 **ACKNOWLEDGEMENTS**

18 This work was supported by the “Conselho Nacional de Pesquisa” (CNPq), “Fundação
19 Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (FUNCAP) and the
20 “Universidade Federal de Pernambuco” (UFPE). LFL Interaminense and RJB de Siqueira are
21 Ph.D. Fellowship students. Ramos-Alves FE is a Master Fellowship student.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [1] Naranjo P., Kijjoa A., Giesbrecht O.R. Gottlieb. *Ocotea quixos*, american cinnamon. J Ethnopharmacol. (1981) **4**, 233-236
- [2] Maia J.G., Zoghbi M.G., Andrade E.H. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Brazil, (2001) 186
- [3] Gottlieb O.R., Magalhães M.T. Essential oil of bark and wood of *Aniba canelilla*. Perf. Essen. Oil Res. (1960) **50**, 69-70
- [4] Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A.R., Hanson, A.D., Klee, H.J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2006) **103**, 8287-8292
- [5] Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., Mors, W.B. On the biogenesis of organic nitroderivatives and propenylbenzenes. An. Acad. Bras. Ciênc. (1961) **33**, 301-303
- [6] Oger J.M., Richomme P., Guinaudeau H., Bouchara J.P., Fournet A. *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. J. Essent. Oil Res. (1994) **6**, 493-497
- [7] Maia J.G., Sousa P.J., Fontes Júnior E.A., Santos A.M. Volatile compounds and antispasmodic activity of the stem bark oil of *Aniba canelilla*. XII Congresso Ítalo-latinoamericano de Etnomedicina, (2003) Rio de Janeiro, RJ, Brazil
- [8] da Silva J.K., Sousa P.J., Andrade E.H., Maia J.G. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. J. Agric. Food Chem. (2007) **55**, 9422-9426

- 1
2
3
4 [9] de Lima A.B., Santana M.B., Cardoso A.S., Silva J.K., Maia J.G., Carvalho J.C., Sousa
5 P.J.C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent
6 component of *Aniba canelilla* essential oil. *Phytomedicine* (2009) **16**, 555-559
7
8
9
10
11 [10] Interaminense L.F., de Siqueira R.J., Xavier F.E., Duarte G.P., Magalhães P.J., da Silva
12 J.K., Maia J.G., Sousa P.J., Leal-Cardoso J.H., Lahlou S. Cardiovascular effects of 1-
13 nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in
14 spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (2010) (doi: 10.1111/j.1472-
15 8206.2010.00891.x) [ahead of print]
16
17
18
19
20
21
22 [11] de Siqueira R.J., Macedo F.I., Interaminense L.F., Duarte G.P., Magalhães P.J., Brito
23 T.S., da Silva J.K., Maia J.G., Sousa P.J., Leal-Cardoso J.H., Lahlou S. 1-Nitro-2-
24 phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-
25 vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* (2010)
26 **638**, 90-98
27
28
29
30
31
32
33
34 [12] Lahlou S., Magalhães P.J., de Siqueira R.J., Figueiredo A.F., Interaminense L.F., Maia
35 J.G., Sousa P.J. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in
36 normotensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (2005) **46**, 412-421
37
38
39
40
41 [13] Mulvany M.J., Halpen W. Mechanical properties of vascular smooth cells in situ. *Nature*
42 (1997) **260**, 617-619
43
44
45
46 [14] Murray R.K., Kotlikoff M.I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth
47 muscle cells. *J. Physiol.* (1991) **435**, 123-144
48
49
50
51 [15] Sousa P.J.C., Araújo J.S., Pereira L.L.S. Modro M.N.R., Maia, J.G.S., Araújo M.T.F.,
52 Carvalho J.C.T., Perazzo F.F. Phytochemical and toxicological evaluations of the
53 essential oil from the bark of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. *Essen. Oil Res.* (2009) **21**,
54 381-338
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 [16] de Lima A.B. Estudo da ação antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano,
5 principal constituinte da *Aniba canelilla*. Master dissertation. Federal Univesrity of Pará
6 (2008) Belem, PA, Brazil
7
8
9
10 [17] Grafe P., Mayer C.J., Wood J.D. Synaptic modulation of calcium-dependent potassium
11 conductance in myenteric neurones in the guinea-pig. *J. Physiol.* (1980) **305**, 235-248
12
13 [18] Leal-Cardoso J.H., Lahlou S., Coelho-de-Souza A.N., Criddle D.N., Pinto Duarte G.I.,
14 Santos M.A., Magalhães P.J. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. *Can. J.*
15 *Physiol. Pharmacol.* (2002) **80**, 901-906
16
17
18 [19] Meeks J.P., Mennerick S. Selective effects of potassium elevations on glutamate
19 signaling and action potential conduction in hippocampus. *J. Neurosci.* (2004) **24**, 197-
20 206.
21
22 [20] Hodgkin A.L., Horowicz, P. The influence of potassium and chloride ions on the
23 membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol.* (1959) **148**, 127-160.
24
25 [21] Somlyo A.V., Somlyo A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in
26 vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1968) **159**, 129-145
27
28 [22] Fonseca-Magalhães P.A., Sousa D.F., de Siqueira R.J., Jorge R.J., Meneses G.C., Alves
29 R.S., Monteiro H.S., Magalhães P.J., Martins A.M. Inhibitory effects of sertraline in rat
30 isolated perfused kidneys and in isolated ring preparations of rat arteries. *J. Pharm.*
31 *Pharmacol.* (2011) **63**, 1186-1194
32
33 [23] Molin J.C., Bendhack L.M. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-
34 dependent and -independent mechanisms. *Vascul. Pharmacol.* (2004) **42**, 1-6.
35
36 [24] Islam M.O., Yoshida Y., Koga, T., Kojima M., Kangawa K., Imai S. Isolation and
37 characterization of vascular smooth muscle inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor.
38 *Biochem. J.* (1996) **316**, 295-302
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 [25] Karaki H., Weiss G.B. Calcium release in smooth muscle. *Life Sci.* (1988) **44**, 111-122.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [26] Somlyo A.P., Wu X., Walker L.A., Somlyo A.V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* (1999) **134**, 201-234
- [27] Kitazawa T., Eto M., Woodsome T.P., Brautigan D.L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 9897-9900
- [28] Yanagita T., Kobayashi H., Yamamoto R., et al. Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel alpha- and beta1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* (1999) **73**, 1749-1757

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Chemical structure of 1-nitro-2-phenylethane.

Figure 2 Relaxant effects of increasing concentrations (0.1-1000 $\mu\text{g/mL}$) of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) and its main constituent, 1-nitro-2-phenylethane (NP) on the sustained contraction induced by KCl (75 mM) or phenylephrine (PHE, 1 μM) in superior mesenteric arteries (SMA) from SHR. (a) Relaxant effects of EOAC and NP on KCl-induced contractions in SMA preparations with intact endothelium. (b) Relaxant effects of EOAC on PHE-induced contractions in SMA preparations with (E⁺) or without (E⁻) endothelium and in endothelium containing SMA preparations pretreated with tetraethylammonium (TEA, 5 mM). (c) Relaxant effects of NP on PHE-induced contractions in SMA preparations with (E⁺) or without (E⁻) endothelium and of vehicle (DMSO; 5×10^{-7} - 5×10^{-3} % v/v, n = 5) in SMA preparations with intact endothelium. Results are presented as means \pm SEM (n = 4-12 per group); *first significant effect ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Figure 3 Inhibitory effects of a given concentration (3-1000 $\mu\text{g/mL}$) of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) on the concentration-dependent contractions elicited by increasing cumulative concentrations of KCl (25-125 mM, n = 4-8 per group) (a) or phenylephrine (PHE; 10^{-10} - 3×10^{-4} M, n = 5-7 per group) (b) in superior mesenteric arteries (SMA) from SHR. Results are presented as means \pm SEM; * $P < 0.05$ by two-way ANOVA vs. SMA preparations pretreated with vehicle (control).

Figure 4 Inhibitory effects of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) (100 and 600 $\mu\text{g/mL}$) (a) and its main constituent, 1-nitro-2-phenylethane (NP) (100 and 600 $\mu\text{g/mL}$) (b) on the cumulative concentration-effect curve dependent on extracellular Ca^{2+} addition (0.1-20 mM) in endothelium-intact, KCl-depolarized superior mesenteric arteries (SMA) from SHR.

1
2
3 incubated in Ca^{2+} -free medium. Results are showed as means \pm SEM (n = 4-6 per group);
4
5 *first significant effect for control curve or for curves obtained in presence of EOAC or NP,
6
7 respectively ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test); $^{\#}P < 0.01$ by two-
8
9 way ANOVA, EOAC or NP vs. concentration-contraction curve of Ca^{2+} alone (control).
10
11

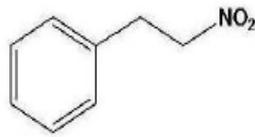
12
13
14 **Figure 5** Inhibitory effects of the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) (100 and 600
15
16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the contraction evoked by cumulative Ba^{2+} addition (0.1-20 mM) in endothelium-
17
18 intact, KCl-depolarized superior mesenteric arteries (SMA) from SHR incubated in Ca^{2+} -free
19
20 medium. Results are showed as means \pm SEM (n = 6-10 per group); *first significant effect
21
22 for control curve or for curve obtained in presence of EOAC or nifedipine ($P < 0.05$, one-way
23
24 ANOVA followed by Bonferroni's test); $^{\#}P < 0.01$ by two-way ANOVA, EOAC or nifedipine
25
26 vs. concentration-contraction curve of Ba^{2+} alone (control).
27
28
29
30

31
32
33 **Figure 6** Effects of cumulative and increasing concentrations of the essential oil of *Aniba*
34
35 *canelilla* (EOAC, 10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the sustained contractions induced by phorbol 12,13-
36
37 dibutyrate (PDB) (1 μM) in superior mesenteric arteries (SMA) from SHR maintained under
38
39 Ca^{2+} -free conditions (with 2 mM EDTA). Results are showed as means \pm SEM (n = 8); * $P <$
40
41 0.001, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.
42
43
44
45

46
47
48 **Figure 7** Relaxant effects of increasing concentrations (0.1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the essential oil
49
50 of *Aniba canelilla* (EOAC) on the sustained contraction induced by noradrenaline (1 μM) in
51
52 mesenteric resistance arteries preparations with intact endothelium from SHR (solid
53
54 triangles). The concentration-effect curve of EOAC-induced relaxation in superior mesenteric
55
56 arteries from SHR pre-contracted with phenylephrine (1 μM) (solid circles) is included
57
58 herein for comparison. Results are showed as means \pm SEM (n = 6-9 per group); *first
59
60 significant effect ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

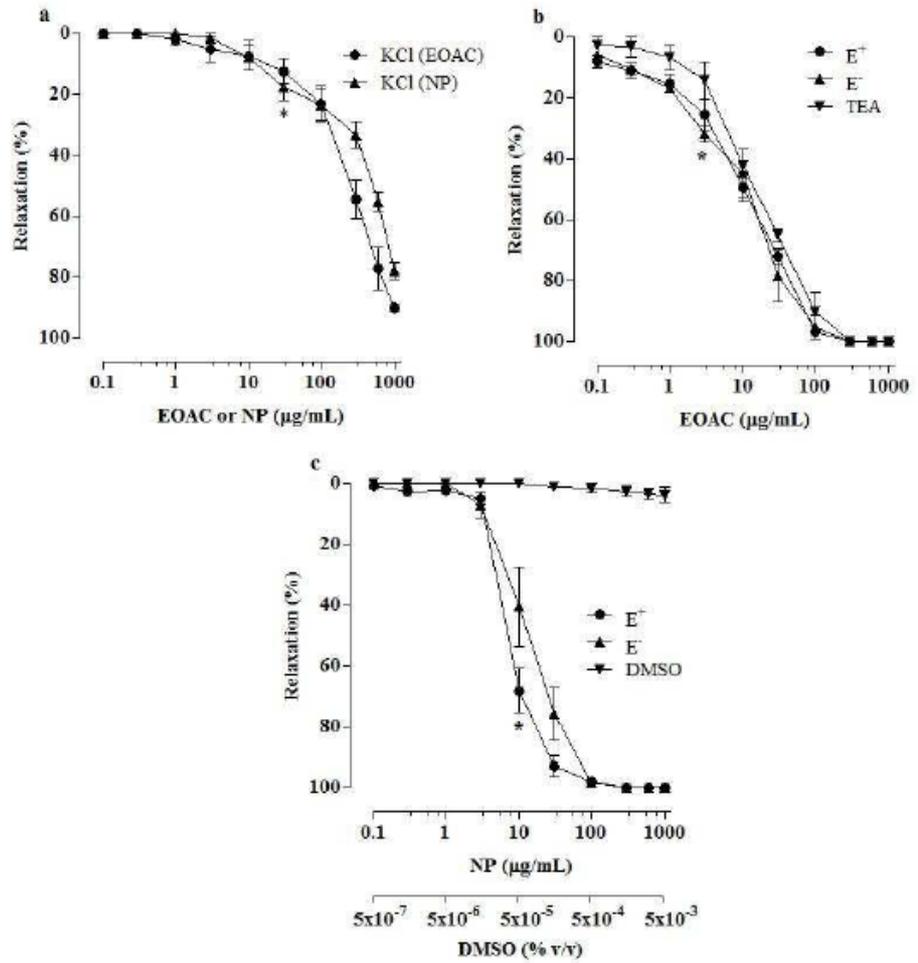
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1.



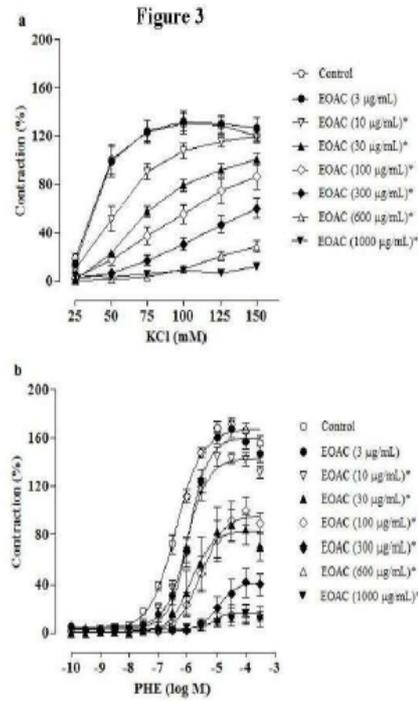
254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



212x218mm (96 x 96 DPI)

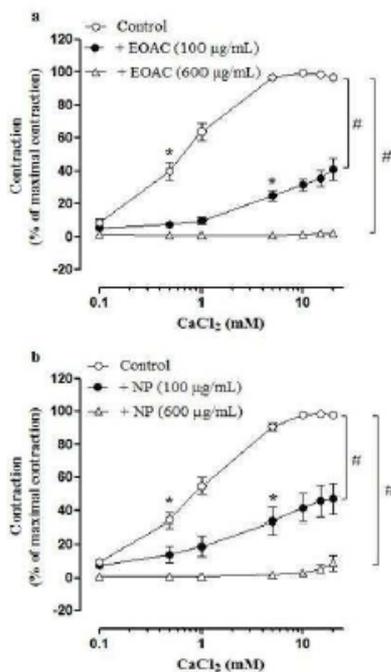
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

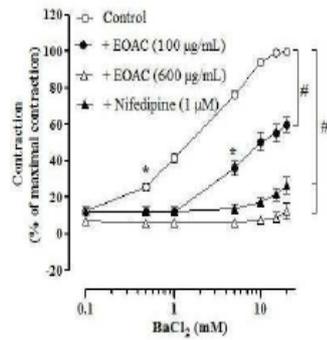
Figure 4



254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

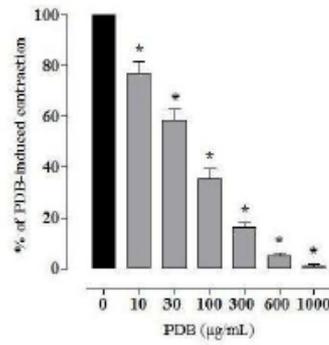
Figure 5



254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

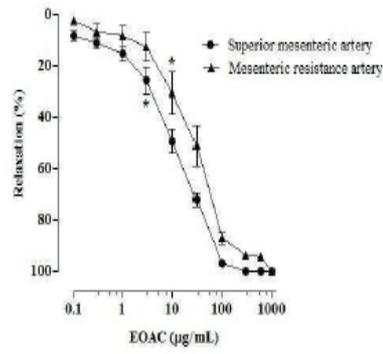
Figure 6



254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 7



254x190mm (96 x 96 DPI)



Cardiovascular Pharmacology

1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats

Rodrigo José Bezerra de Siqueira^a, Francisco Igor Bulcão Macedo^a, Leylliane de Fátima Leal Interaminense^a, Gloria Pinto Duarte^a, Pedro Jorge Caldas Magalhães^b, Teresinha Silva Brito^b, Joyce Kelly Rosário da Silva^c, José Guilherme Soares Maia^c, Pergentino José da Cunha Sousa^d, José Henrique Leal-Cardoso^e, Saad Lahlou^{e,*}

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^d Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^e Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2009

Received in revised form 6 March 2010

Accepted 31 March 2010

Available online 18 April 2010

Keywords:

1-Nitro-2-phenylethane

Aniba canelilla

Isolated thoracic aorta

Sensory C-fibers

Perineural capsaicin pretreatment

Vago-vagal reflex

(Rat)

ABSTRACT

Previously, it was shown that intravenous (i.v.) treatment with the essential oil of *Aniba canelilla* (EOAC) elicited a hypotensive response that is due to active vascular relaxation rather than to the withdrawal of sympathetic tone. The present study investigated mechanisms underlying the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the EOAC. In pentobarbital-anesthetized normotensive rats, 1-nitro-2-phenylethane (1–10 mg/kg, i.v.) elicited dose-dependent hypotensive and bradycardiac effects which were characterized in two periods (phases 1 and 2). The first rapid component (phase 1) evoked by 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) was fully abolished by bilateral vagotomy, perineural treatment of both cervical vagus nerves with capsaicin (250 µg/ml) and was absent after left ventricle injection. However, pretreatment with capsazepine (1 mg/kg, i.v.) or ondansetron (30 µg/kg, i.v.) did not alter phase 1 of the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.). In conscious rats, 1-nitro-2-phenylethane (1–10 mg/kg, i.v.) evoked rapid hypotensive and bradycardiac (phase 1) effects that were fully abolished by methylatropine (1 mg/kg, i.v.). It is concluded that 1-nitro-2-phenylethane induces a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1) that apparently results from the stimulation of vagal pulmonary rather than cardiac C-fiber afferents. The transduction mechanism of the 1-nitro-2-phenylethane excitation of C-fiber endings is not fully understood and does not appear to involve activation of either Vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors. The phase 2 hypotensive response to 1-nitro-2-phenylethane seems to result, at least in part, from a direct vasodilatory effect since 1-nitro-2-phenylethane (1–300 µg/ml) induced a concentration-dependent reduction of phenylephrine-induced contraction in rat endothelium-containing aorta preparations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aniba canelilla (H.B.K.) Mez [syn. *Aniba elliptica* A. C. Sm., *Cryptocarya canelilla* Kunth], (Lauraceae) is an aromatic plant abundant in the Amazon region, where it is commonly known as “casca-preciosa” (precious bark). This plant is an important and historically interesting species in the Amazon forest because it was confused with cinnamon trees (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) during the 1540 voyage of Pizarro and Orellana from the Andes to the Amazon estuary and during

Humbolt and Bonpland's 1800 expedition in the Orinoco River to find the “famous cinnamon” (Naranjo et al., 1981).

The trunk wood, fine stems and leaves of casca-preciosa are used as spices and ingredients for local dishes, fragrances, and cloth aromatization sachets. In folk medicine, decoctions of bark from *A. canelilla* are commonly used for their antispasmodic, digestive stimulating and carminative properties (Maia et al., 2001). Stem bark of *A. canelilla* has an essential oil content by 1% of the plant dry weight. The odoriferous principle of leaf, bark, and trunk wood of *A. canelilla* is 1-nitro-2-phenylethane (Fig. 1), also responsible for the plant's cinnamon scent (Gottlieb and Magalhães, 1960). Methyleugenol is also an important volatile constituent of the essential oil of *A. canelilla* (EOAC) (Gottlieb and Magalhães, 1960; Taveira et al., 2003). The percentage content of these two compounds is depending on the season time. In the rainy season, 1-nitro-2-phenylethane reaches values approaching 90–95%

* Corresponding author. Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700 Campus Itaperi, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 85 3101 9814; fax: +55 85 3101 9810.

E-mail address: lahlou562@gmail.com (S. Lahlou).

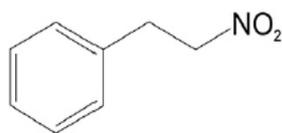


Fig. 1. Chemical structure of 1-nitro-2-phenylethane.

whereas methyleugenol remains about 5–10%. By contrast, in the dry season 1-nitro-2-phenylethane decreases to 39%, whereas methyleugenol reaches 45% (Taveira et al., 2003). 1-Nitro-2-phenylethane was also reported in the essential oil of *Ocotea pretiosa* (Gottlieb and Magalhães, 1959) and is considered to be a major contributor to tomato flavor, as are 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylethanol (Tiemann et al., 2006). Nitroderivatives found in higher plants are rare. In the case of 1-nitro-2-phenylethane, its biogenesis involves phenylalanine oxidation followed by spontaneous decarboxylation (Gottlieb et al., 1961).

Oger et al. (1994) reported fungistatic properties for bark EOAC. Furthermore, it has been reported that bark EOAC exerts relaxant effects on intestinal smooth muscle, supporting the use of the plant in folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders (Maia et al., 2003). Recently, antioxidant activity of the EOAC and 1-nitro-2-phenylethane (da Silva et al., 2007) as well as antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane (de Lima et al., 2009) have been reported.

Previously, we showed that hypotensive response to intravenous (i.v.) administration of the EOAC in normotensive rats is due to active vascular relaxation rather than withdrawal of sympathetic tone (Lahlou et al., 2005). However, little is known about the pharmacological actions of the 1-nitro-2-phenylethane. Therefore, the aim of the present study was to investigate the mechanism underlying the cardiovascular responses to i.v. injections of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the EOAC, in normotensive rats. Furthermore, *in vitro* experiments using rat isolated thoracic aorta were performed to assess whether the hypotensive response to 1-nitro-2-phenylethane could result, at least in part, from its vasodilatory effects directly upon vascular smooth muscle.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Barks of *A. canelilla* were collected during the rainy period in May, 2005, in the area of Cauaxi River, Municipality of Paragominas, southeast of Pará state, Brazil. Its identification was confirmed by Dr. da Silva M.H.L. (Department of Botanic, Emílio Goeldi Museum, Belém, Brazil). A voucher specimen (#174904) is deposited in the herbarium of Emílio Goeldi Museum, in the city of Belém, Pará State, Brazil.

2.2. Essential oil distillation

The bark was air-dried, grinded and submitted to hydrodistillation (100 g, 4 h) using a Clevenger-type apparatus. Essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and its percentage content was calculated on basis of the plant dry weight. The moisture content of samples was calculated after the phase separation in a Dean-Stark trap (5 g, 30 min) using toluene.

2.3. Essential oil fractionation and analysis

Bark wood essential oil (15 g) was submitted to fractionation in a silica gel chromatographic column using petroleum ether (isocratic elution) and thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate, 9:1) to purify the main constituent, 1-nitro-2-phenylethane. The percentage content of 1-nitro-2-phenylethane in the oil and in the purified fractions was obtained in a Thermo Focus GC/FID operated under the following conditions: WCOT DB-5 ms (30 m × 0.25 mm; 0.25 µm film thickness)

fused silica capillary column; temperature programmed, 60–240 °C (3 °C/min); injector and detector temperatures, 220 and 250 °C; carrier gas, nitrogen; injection type, splitless (2 µl, of a 1:1000 hexane solution).

2.4. Solutions and drugs

Sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) and heparin (Laboratoires Léo SA, Montigny-le-Bretonneux, France) were used as commercially available injectable solutions. Methylnatropine bromide, ondansetron, acetylcholine chloride, phenylephrine hydrochloride and capsaicin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Penicillin G benzathine salt was purchased from Lafepe (Recife, PE, Brazil). For *in vivo* experiments, 1-nitro-2-phenylethane was dissolved in Tween 80 (2%), brought to the chosen volume with sterile isotonic saline and sonicated just before use. Previous studies showed that i.v. injection of this vehicle (100 µl) had no significant effects on either baseline mean arterial pressure or heart rate over a period of 20 min (Lahlou et al., 2003, 2004, 2005). Methylnatropine bromide and ondansetron were dissolved in saline just before use and administered in a volume of 1 ml/kg body weight. Capsaicin was used for the perineural treatment of the vagus at a concentration of 250 µg/ml and prepared in 1% Tween 80, 1% ethanol and 98% saline. For i.v. injection, a solution of capsaicin at a desired concentration was prepared daily by dilution with saline on the basis of an animal's body weight. Capsazepine (Tocris, Ballwin, MO, USA) was first diluted in dimethyl sulphoxide (Sigma) to 0.1 mol/l (~37 mg/ml) and further diluted with saline containing 10% Tween 80 and 10% ethanol to a final concentration of 1 mg/ml. For *in vitro* experiments, 1-nitro-2-phenylethane was prepared directly in the perfusion medium and sonicated just before use whereas acetylcholine was first dissolved in distilled water and was brought to volume with the perfusion medium. The perfusion medium used was fresh modified Tyrode solution (pH 7.4) of the following composition (mM): NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0.98, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 11.9, and glucose 5.5.

2.5. Animals

Male Wistar rats (280–340 g) were kept under conditions of constant temperature (22 ± 2 °C) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. All animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication 85-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/index.html>). All procedures described here were reviewed by and had prior approval from local animal ethics committee.

2.6. *In vivo* experiments

2.6.1. Catheterization procedure

Rats were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg), and catheters (PE-10 fused to PE-50) were implanted in the abdominal aorta (for the recording of arterial blood pressure) and in the inferior vena cava (for drug administration) through the left femoral artery and vein, respectively. These catheters, filled with heparin–saline solution (125 IU/ml), were exteriorized at the dorsal neck level. In some animals ($n=3$), a catheter (Teflon) was inserted into the carotid artery and advanced into the left ventricle. 1-Nitro-2-phenylethane was then injected through this catheter into the left ventricle. Postoperatively, rats received an intramuscular injection of penicillin (24,000 IU). They were housed individually in plastic cages and allowed to recover for 24–48 h before any circulatory experiments.

2.6.2. Recordings of mean arterial pressure and heart rate

At the time of the experiments, the arterial catheter was connected to a blood pressure transducer coupled to a polygraph recorder. Heart

rate was obtained using a cardiometer triggered by the pressure pulses. Both signals were recorded on a Gilson model 5/6H polygraph (Gilson Medical Electronics, Middletown, WI, USA). Mean arterial pressure was calculated as diastolic + [(systolic blood pressure – diastolic blood pressure)/3].

2.6.3. Experimental design and protocols

In order to explore the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane, the following protocol was used. Before each experiment, a period of 15–20 min was allowed to obtain a stable mean arterial pressure and heart rate tracing. Baseline values of these variables were determined and their changes were measured during a 10 min post-injection period. 1-Nitro-2-phenylethane and capsaicin were injected manually as a bolus in a volume of 0.1 ml, followed by a 0.2 ml flush with physiological saline. Injection response times were measured from the end of an injection to the onset of bradycardia. Injections were separated by 10 min intervals in order to avoid tachyphylaxis. Doses of agonists and antagonists were chosen according to those recommended in the literature. For this purpose, at the time of experiment rats were again anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and this dose of anesthesia was supplemented by an additional 15 mg/kg whenever necessary to maintain abolition of pain reflex evoked by pinching the skin of the hindlimbs. A short tracheal cannula was inserted via a tracheotomy, through which rats breathed spontaneously in the supine position. Body temperature was maintained by an electric heating pad. The following series of experiments, except series 6 (conscious rats), were performed in anesthetized rats.

Series 1: This series of experiments was carried out to establish a dose–effect relationship. Each intact animal received a series of increasing bolus doses (1, 3, 5 and 10 mg/kg, $n=6$) of 1-nitro-2-phenylethane via the i.v. catheter, and time course of the changes in mean arterial pressure and heart rate was recorded. In some animals, 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) was also injected in rats before and 20 min ($n=5$) after that they had been subjected to a bilateral vagotomy performed at the cervical level.

Series 2: This series of experiments was performed to assess the role of vagal C-fiber afferents in mediation of cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane. For this purpose, we used the well-known method of bilateral perineural treatment with capsaicin (Jansc o and Such, 1983; Schelegle et al., 2000), a procedure that has been used successfully in our laboratory (de Siqueira et al., 2006), in order to produce a selective blockade of neural conduction of vagal C-fiber afferents. Briefly, having isolated both cervical vagi, we wrapped capsaicin-soaked (250 µg/ml) cotton swabs around a 2–3 mm segment of the nerves for 20 min; then we removed the swabs and irrigated the pocket with isotonic saline. Maximal changes in mean arterial pressure and heart rate elicited by 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.) were assessed before and 20 min after perineural treatment with capsaicin ($n=5$) or its vehicle ($n=5$). Abolition of the immediate hypotensive and bradycardiac reflex (vagal reflex) of i.v. capsaicin (1 µg/kg, $n=3$) was taken as criterion of successful perineural treatment with capsaicin.

Series 3: This series of experiments was carried out to determine the putative involvement of Vanilloid TPRV₁ receptor activation in the mediation of 1-nitro-2-phenylethane-induced cardiovascular changes. Therefore, each animal ($n=5$) received an injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.) and the maximal mean arterial pressure and heart rate changes were determined. Eight minutes later and 2 min before a second injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.), the competitive TPRV₁ receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.) (Malinowska et al., 2001; Smith and McQueen, 2001) or its vehicle ($n=3$) was administered and the maximal mean arterial pressure and heart rate changes

were again determined. As a control positive experiment, effects of pretreatment with capsazepine (1 mg/kg, i.v.) on the initial hypotensive and bradycardiac responses to capsaicin (1 µg/kg; i.v., $n=3$) have been also determined according to the same protocol as described above.

Series 4: This series of experiments was performed to determine the putative involvement of serotonergic (5-HT₃) receptor activation in the mediation of 1-nitro-2-phenylethane-induced cardiovascular changes. Therefore, each animal ($n=5$) received an injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.) and the maximal mean arterial pressure and heart rate changes were determined. Five minutes later and 5 min before the second injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.), the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (30 µg/kg, i.v.) (Bagchi and Deshpande, 1999) was administered and the maximal mean arterial pressure and heart rate changes were again determined. As a control positive experiment, effects of pretreatment with ondansetron (30 µg/kg, i.v.) on the initial hypotensive and bradycardiac responses to serotonin (5 µg/kg; i.v., $n=4$) were also determined according to the same protocol as described above.

Series 5: To determine the location of the afferent C-fibers endings involved in elicitation of cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane, we compared responses to left ventricular and systemic injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, $n=3$). 1-Nitro-2-phenylethane injected into the left ventricle bypasses the pulmonary circulation and presumably does not have immediate access to the pulmonary C-fibers. For this purpose, a Teflon catheter was inserted into the right carotid artery and was advanced retrogradely until its tip was positioned in the left ventricle. The position of the tip within the left ventricle was verified by measurement of left ventricular blood pressure and confirmed by postmortem examination.

Series 6: This series of experiments was performed in conscious rats in order to establish a dose–effect relationship and to assess the role of cholinergic mechanism in the mediation of 1-nitro-2-phenylethane-induced cardiovascular changes. Therefore, the time course of changes in mean arterial pressure and heart rate elicited by i.v. injections of 1-nitro-2-phenylethane (5 and 10 mg/kg) was determined in conscious rats that had been pretreated intravenously 10 min earlier with vehicle (1 ml/kg, $n=6$), or methylatropine (1 mg/kg, $n=7$) (Vasquez and Krieger, 1982). Each rat received increasing bolus doses as described previously.

2.7. In vitro experiments

Rats were stunned and then exsanguinated. Thoracic aortae were removed and immersed in perfusion medium at room temperature. After removing adhering fat and connective tissue, the aorta was cut transversally into cylindrical ring-like segments (1 mm × 5 mm) attached to steel wire triangular pieces, which were suspended in 5 ml organ baths containing continuously aerated perfusion medium at 37 °C. Endothelium-containing strips were stretched with a passive tension of 0.5 g and tension was recorded using an isometric force transducer (Grass Model FTO3, Quincy, MA) connected to a PC-based Dataq acquisition system (PM-1000, CWE Inc., Akron, OH). After an equilibration period of at least 60 min, control contractions were induced by adding 60 mM potassium chloride (KCl) to the bath. When two successive control contractions showed similar amplitude, preparations were considered to be equilibrated.

To assess the vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, preparations were exposed to increasing concentrations (1, 3, 10, 30, 100 and 300 µg/ml; $n=8$) of 1-nitro-2-phenylethane once a sustained contraction elicited by phenylephrine (1 µM) was established. Concentration–response curves to 1-nitro-2-phenylethane were determined only once in each thoracic aorta preparation and 1-nitro-2-phenylethane was directly added to the buffer solution in a

cumulative manner. Contraction data were expressed as a percentage of the phenylephrine-induced contraction.

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm S.E.M. Maximal changes (expressed as a percentage of baseline values) in mean arterial pressure and heart rate after each dose of 1-nitro-2-phenylethane were used to construct a dose–response curve. The paired Student's *t*-test was used to investigate the significance of changes in cardiovascular variables of the following: (i) i.v. administration of various drugs or their vehicles alone, and (ii) perineural treatment with capsaicin or bilateral vagotomy. The latter test was also used to assess the statistical significance of the effects of i.v. pretreatment with a capsazepine or its vehicle on the mean arterial pressure and heart rate responses to 1-nitro-2-phenylethane or capsaicin. The IC_{50} value, defined as the 1-nitro-2-phenylethane concentration (μ g/ml) required to produce half maximum reduction of phenylephrine-induced contraction, was used to evaluate vascular sensitivity to 1-nitro-2-phenylethane. It was calculated by interpolation from semi-logarithmic plots, and expressed as the geometric mean (95% confidence interval). Groups of data were compared by the Mann-Whitney *U*-test, one-way (doses) or two-way (treatment \times doses) analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's or Holm–Sidak multiple comparison tests when appropriate. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

The yield of bark EOAC was 0.6% and its GC analysis showed 71% of 1-nitro-2-phenylethane. The purity of 1-nitro-2-phenylethane isolated from EOAC by silica column chromatography was 98%.

3.1. In vivo experiments

3.1.1. Cardiovascular responses to increasing bolus intravenous doses of 1-nitro-2-phenylethane in anesthetized rats: effects of bilateral vagotomy (Series 1)

Increasing bolus injections of 1-nitro-2-phenylethane (1–10 mg/kg, i.v.) elicited dose-dependent (Fig. 3; $P < 0.01$, one-way ANOVA) hypotensive and bradycardiac effects, which became significant (Fig. 3; $P < 0.05$, Dunnett's test) at 3 mg/kg. At 5 and 10 mg/kg of 1-nitro-2-phenylethane, the hypotensive (Figs. 2A and 3A) and bradycardiac (Figs. 2B and 3B) responses to 1-nitro-2-phenylethane are biphasic. As shown in Fig. 3 (panels A and B), the first rapid component of 1-nitro-2-phenylethane-induced bradycardia and hypotension (phase 1) occurred at 1–2 and 2–3 s after injection respectively, while the second component of 1-nitro-2-phenylethane-induced bradycardia and hypotension (phase 2) occurred at 4–5 and 7–10 s after injection, respectively. The same volume of vehicle (Tween 80) did not induce any significant changes in either baseline mean arterial pressure or heart rate. Cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane both returned to baseline within 40–60 s. As shown in Fig. 3, i.v. bolus injection of the Vanilloid receptor agonist capsaicin (10 μ g/kg) led to the typical triphasic changes in blood pressure (effects a, b and c; Fig. 3C) and biphasic bradycardia (effects f and s; Fig. 3D), as found previously by others (Donnerer and Lembeck, 1982, 1983; Yeh et al., 1993; Yang et al., 1993).

Bilateral cervical vagotomy did not affect baseline mean arterial pressure, but induced a significant ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test) increase in baseline heart rate (Table 1). However, this treatment completely abolished (Fig. 4; $P < 0.001$, paired Student's *t*-test) the first phase (phase 1) of hypotensive (Figs. 4A and 5A) and bradycardiac (Figs. 4B and 5B) responses to 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg). Bivagotomy reduced slightly but significantly ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test) the second phase of the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane (Figs. 4 and 5).

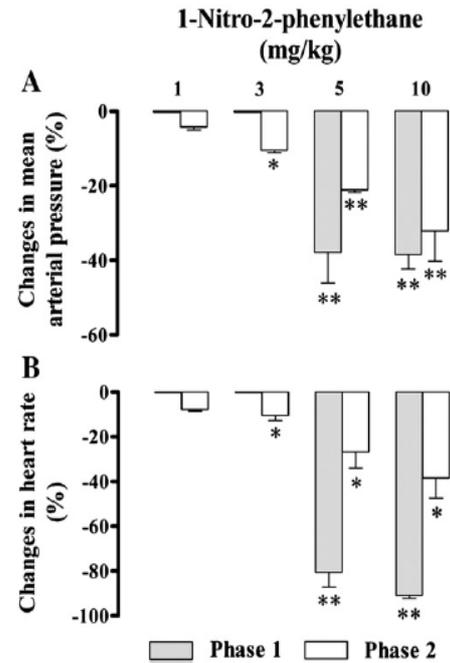


Fig. 2. Maximal decreases in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) induced by intravenous injection of 1-nitro-2-phenylethane (1–10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats. Biphasic (phases 1 and 2) hypotensive and bradycardiac effects were more evident at 5 and 10 mg/kg. Data are mean \pm S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n = 6$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by paired Student's *t*-test vs. the corresponding baseline values.

3.1.2. Effects of perineural capsaicin treatment of both vagi on maximal hypotensive and bradycardiac responses to intravenous 1-nitro-2-phenylethane (Series 2)

Perineural treatment of both vagi with capsaicin did not affect baseline mean arterial pressure and heart rate values (Table 1). In some animals ($n = 3$), the immediate hypotensive and bradycardiac responses (effects a and f, respectively) to capsaicin (1 μ g/kg, i.v.) were completely abolished 20 min after perineural treatment with capsaicin, justifying its effectiveness in blocking the vagal

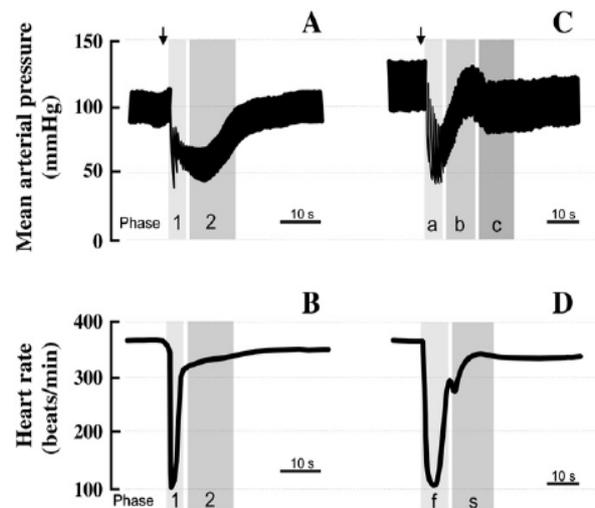


Fig. 3. Representative recordings showing changes in mean arterial pressure and heart rate induced by intravenous injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) (panels A and B, respectively) or capsaicin (10 μ g/kg) (panels C and D, respectively) in pentobarbital-anesthetized rats without any pretreatment. Arrows indicate the time of injection. a, b, c: Typical triphasic changes in blood pressure following capsaicin injection; f (fast) and s (slow): biphasic bradycardia following capsaicin injection.

Table 1
Effects of various pretreatments on basal mean arterial pressure and heart rate in anesthetized rats in which the effects of 1-nitro-2-phenylethane were investigated.

| Pretreatment | n | Mean arterial pressure (mm Hg) | | Heart rate (beats/min) | |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|-----------|------------------------|--------------------|
| | | Basal | After T | Basal | After T |
| Bivagotomy | 5 | 103.2±6.2 | 106.2±5.9 | 377±11 | 410±7 ^a |
| Perineural treatment with capsaicin | 5 | 108.8±3.9 | 111.5±5.6 | 367±15 | 370±11 |
| Capsazepine | 5 | 100.1±4.5 | 90.1±6.1 | 369±29 | 392±21 |
| Ondansetron | 5 | 104.6±5.8 | 99.6±6.5 | 300±26 | 308±28 |

T, Treatment. Data are the means ± S.E.M.

^a $P < 0.05$ compared with respective basal values.

sensory C-fiber-mediated reflex responses. Phase 1 of hypotensive (Figs. 5C and 6A) and bradycardiac (Figs. 5D and 6B) responses elicited by 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.) was completely abolished ($P < 0.001$, paired Student's *t*-test) after perineural treatment with capsaicin. As was observed in bivagotomized rats, phase 2 of the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane was slightly but significantly (Figs. 5 and 6; $P < 0.05$, paired Student's *t*-test) reduced following perineural treatment with capsaicin. Both phases 1 and 2 responses to 1-nitro-2-phenylethane recovered in ~1 h and were not significantly altered after perineural treatment with capsaicin's vehicle.

It is noteworthy that when two subsequent injections of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.; $n = 5$) separated by a 10 min interval were performed in the same animal, the magnitude of the initial (phase 1) hypotensive response was -35.6 ± 3.5 vs. $-40.3 \pm 3.2\%$ (for the first and second injections, respectively) and that of the bradycardiac effect was -83.4 ± 4.2 vs. $-84.4 \pm 2.7\%$ (for the first and second injections, respectively). There are no statistical differences in the magnitude of the two injections for either hypotensive or

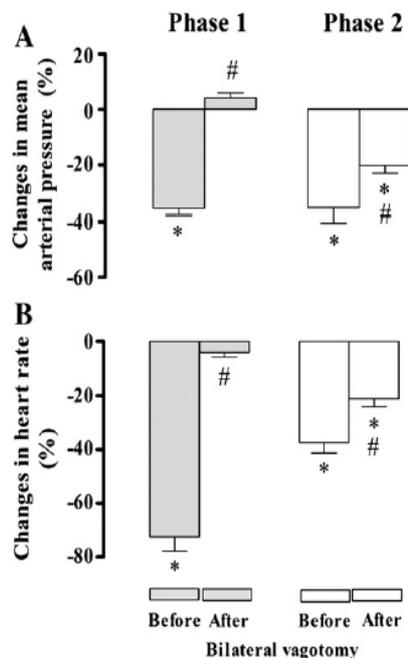


Fig. 4. Maximal changes in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) elicited by intravenous administration of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats before or after bilateral vagotomy at cervical level. Phase 1 hypotensive and bradycardiac effects elicited by 1-nitro-2-phenylethane were completely abolished by bivagotomy. Data are mean ± S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n = 5$ rats per group). * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ by paired Student's *t*-test vs. the baseline values and the corresponding responses before bivagotomy.

bradycardiac effects. The same was true for phase 2 of hypotensive (-34.5 ± 6.5 vs. $-37.5 \pm 4.7\%$ for the first and second injections, respectively) and bradycardiac (-38.6 ± 7.2 vs. $-40.3 \pm 4.1\%$ for the first and second injections, respectively) responses. In this experiment, baseline mean arterial pressure and heart rate were 102.3 ± 4.3 mm Hg and 364 ± 7 beats/min.

3.1.3. Effects of intravenous pretreatment with capsazepine on the hypotensive and bradycardiac responses to 1-nitro-2-phenylethane (Series 3)

The selective Vanilloid receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.) given alone had no effects on baseline mean arterial pressure and heart rate values (Table 1). This dose of capsazepine significantly ($P < 0.01$) reduced, by nearly 60–68%, the initial hypotensive (-11.8 ± 3.3 vs. $-30.1 \pm 2.3\%$ for capsazepine- and vehicle-pretreated rats, respectively) and bradycardia (-24.5 ± 7.7 vs. $-77.2 \pm 5.4\%$ for capsazepine- and vehicle-pretreated rats, respectively) responses to capsaicin (1 µg/kg, i.v.; $n = 3$). In this experiment with capsaicin, mean arterial pressure and heart rate were 110.0 ± 3.0 mm Hg and 341 ± 19 beats/min, respectively, before and 109.2 ± 4.8 mm Hg and 370 ± 22 beats/min, respectively, after capsazepine pretreatment. Magnitude of 1-nitro-2-phenylethane-induced phases 1 and 2 hypotensive (Fig. 7A) and bradycardiac (Fig. 7B) responses was not significantly altered by i.v. pretreatment with capsazepine or with capsazepine's vehicle ($n = 3$, data not shown).

3.1.4. Effects of intravenous pretreatment with ondansetron on the hypotensive and bradycardiac responses to 1-nitro-2-phenylethane (Series 4)

Pretreatment with i.v. ondansetron had no significant effects on baseline mean arterial pressure and heart rate values (Table 1). Neither phase 1 nor phase 2 of hypotensive (Fig. 8A) and bradycardiac (Fig. 8B) responses to 1-nitro-2-phenylethane was altered by pretreatment with ondansetron (30 µg/kg, i.v.). In control experiments, this dose of ondansetron fully abolished the well-known reflex bradycardiac ($-59.1 \pm 10.8\%$, baseline heart rate = 360 ± 30 beats/min) and depressor ($-38.1 \pm 11.0\%$, baseline mean arterial pressure = 107.7 ± 5.9 mm Hg) responses elicited by serotonin (10 µg/kg, i.v.).

3.1.5. Cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane injected into the left ventricle in anesthetized rats (Series 5)

When injected directly into the left ventricle via the carotid arterial catheter with intact vagi, 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, $n = 3$) did not evoke the rapid hypotension (Fig. 5E) and bradycardia (Fig. 5F) (phase 1) elicited by the same dose (10 mg/kg) after i.v. injection 30 min earlier. However, left ventricular injection of 1-nitro-2-phenylethane also induced delayed systemic hypotension ($-29.1 \pm 2.8\%$, baseline mean arterial pressure = 96 ± 6 mm Hg) (Fig. 5E) and bradycardia ($-36.0 \pm 2.3\%$, baseline heart rate = 407 ± 7 beats/min) (Fig. 5F) that occurred with the same latency (7.7 ± 0.3 and 4.3 ± 0.7 s, respectively) when compared to that observed for the hypotension and bradycardia (phase 2) elicited by i.v. 1-nitro-2-phenylethane (~7–8 and ~5–6 s, respectively).

3.1.6. Effects of intravenous pretreatment with methylatropine on the hypotensive and bradycardiac responses to 1-nitro-2-phenylethane in conscious rats (Series 6)

In conscious rats, average baseline values of mean arterial pressure and heart rate before any treatment were 126.1 ± 4.1 mm Hg and 387 ± 15 beats/min, respectively (pooled data from 13 rats). Neither baseline mean arterial pressure nor heart rate values are significantly changed following i.v. administration of vehicle or 1-nitro-2-phenylethane at the lowest dose of 1 mg/kg (data not shown). However, injection of bolus doses (5 and 10 mg/kg) of 1-nitro-2-phenylethane evoked significant (Fig. 9; $P < 0.01$, unpaired Student's *t*-test) and monophasic decreases in mean arterial pressure and

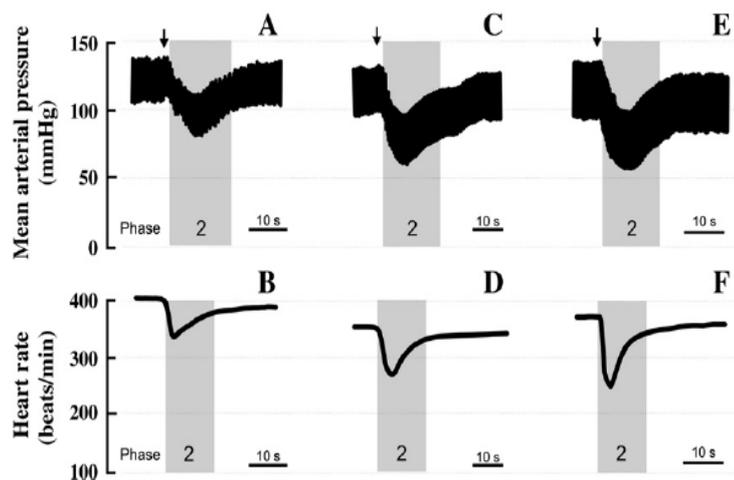


Fig. 5. Representative recordings showing changes in mean arterial pressure and heart rate induced by intravenous injection of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats that have been submitted to bilateral vagotomy at cervical level (panels A and B, respectively) or to perineural pretreatment of both cervical vagi with capsaicin (250 µg/ml) (panels C and D, respectively). Panels E and F correspond to representative recordings showing changes in mean arterial pressure and heart rate evoked by 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) injected into the left ventricle. Note that phase 1 hypotensive and bradycardiac reflex responses to 1-nitro-2-phenylethane were absent following all treatments. Arrows indicate the time of injection.

heart rate which occurred within about 1–3 s after the injection of 1-nitro-2-phenylethane. Pretreatment with methylatropine (1 mg/kg, i.v.) increased significantly ($P < 0.01$) the baseline heart rate (462 ± 14 vs. 375 ± 21 beats/min) without affecting baseline mean arterial pressure (117.5 ± 2.5 vs. 118.3 ± 1.7 mm Hg). The decreases in mean arterial pressure and heart rate evoked 1-nitro-2-phenylethane (5 and 10 mg/kg, i.v.) were fully abolished by methylatropine pretreatment (Fig. 9). Under these conditions, a significant (Fig. 9; $P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test) pressor component was unmasked for the doses of

5 (12.5 ± 5.8 mm Hg) and 10 (25.0 ± 5.9 mm Hg) mg/kg of 1-nitro-2-phenylethane.

3.2. In vitro experiments

In endothelium-containing aorta preparations, 1-nitro-2-phenylethane (1–300 µg/ml) inhibited the phenylephrine-induced contraction in a concentration-dependent manner ($P < 0.001$, one-way ANOVA) with an IC_{50} (geometric mean \pm 95% confidence

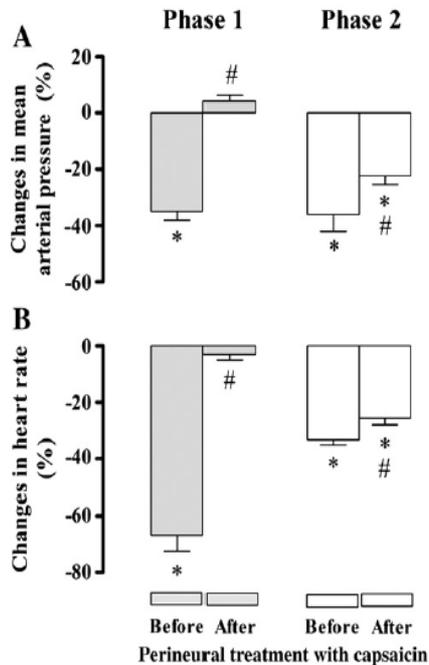


Fig. 6. Maximal changes in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) elicited by intravenous administration of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats before or 20 min after perineural treatment of both cervical vagi with capsaicin (250 µg/ml). Phase 1 hypotensive and bradycardiac effects elicited by 1-nitro-2-phenylethane were completely abolished after perineural treatment with capsaicin. Data are mean \pm S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n = 5$ rats per group). * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ by paired Student's *t*-test vs. the baseline values and the corresponding responses before perineural treatment with capsaicin, respectively.

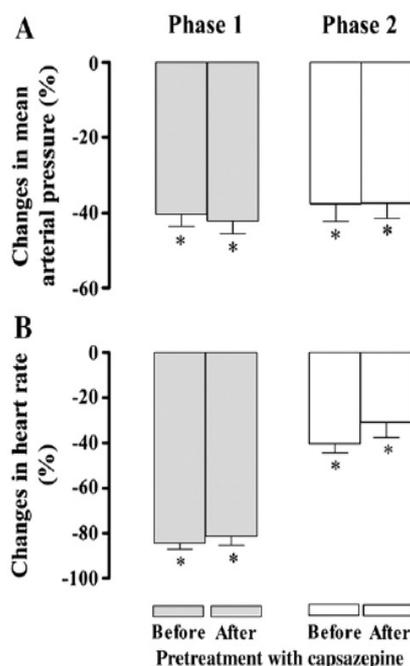


Fig. 7. Maximal decreases in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) elicited by intravenous (i.v.) administration of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats before or 2 min after i.v. pretreatment with capsazepine (1 mg/kg). Neither phase 1 nor phase 2 hypotensive and bradycardiac effects elicited by 1-nitro-2-phenylethane were significantly altered by capsazepine pretreatment. Data are mean \pm S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n = 5$ rats per group). * $P < 0.01$ by paired Student's *t*-test vs. the corresponding baseline values.

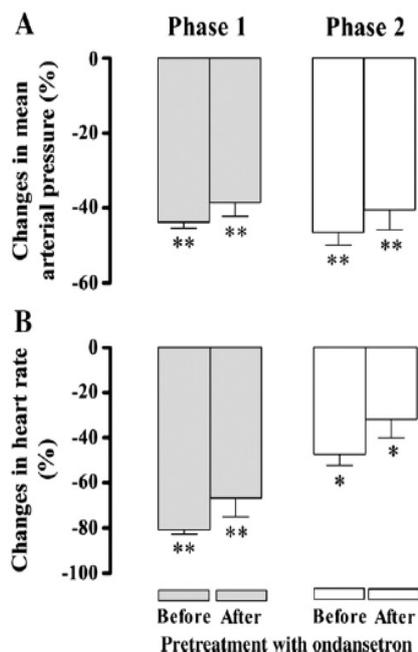


Fig. 8. Maximal decreases in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) elicited by intravenous (i.v.) administration of 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg) in pentobarbital-anesthetized rats before or 5 min after i.v. pretreatment with ondansetron (30 µg/kg). Neither phase 1 nor phase 2 hypotensive and bradycardiac effects elicited by 1-nitro-2-phenylethane were significantly altered by ondansetron pretreatment. Data are mean \pm S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n=5$ rats per group). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ by paired Student's *t*-test vs. the corresponding baseline values.

interval) value of 60.1 (37.7–95.9) µg/ml. The first inhibitory effect of 1-nitro-2-phenylethane became significant at a concentration of 30 µg/ml ($P<0.05$, Holm–Sidak's test) while its maximal relaxation effect ($3.4\pm 3.1\%$ of the phenylephrine-induced contraction) occurred at a concentration of 300 µg/ml. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane are reversible after wash out.

4. Discussion

Baseline mean arterial pressure and heart rate values of anesthetized, normotensive rats were of the same order of magnitude as those previously reported in the same preparation (Lahlou et al., 2005; de Siqueira et al., 2006). In this study, i.v. administration of higher doses (5 and 10 mg/kg) of 1-nitro-2-phenylethane induced two periods of hypotension and bradycardia. Initially a rapid bradycardia (onset time of 1–2 s) occurred coincidentally (onset time of 2–3 s) with an arterial hypotension (phase 1) and then, a delayed decrease in blood pressure associated with a second bradycardia (phase 2). All these effects are reversible excluding therefore the possibility that they might have been related to a putative toxic effect of 1-nitro-2-phenylethane. To the best of our knowledge, this is the first time that such cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane have been reported in normotensive rats.

Previous studies (Donnerer and Lembeck, 1982, 1983; Yeh et al., 1993; Lo et al., 1994) have shown that the initial hypotension (effect a, Fig. 3C) and fast bradycardiac (effect f, Fig. 3D) responses to capsaicin are mediated by a vagal reflex involving capsaicin-sensitive fibers. The intermediate slight increase in blood pressure (effect b) is due to capsaicin-induced direct vasoconstriction while the delayed hypotensive response (effect c) is also mediated by capsaicin-sensitive sensory C-fibers. In anesthetized rats pretreated with vehicle, the time to occurrence of the phase 1 reductions in heart rate and mean arterial pressure elicited by 1-nitro-2-phenylethane (10 mg/kg, i.v.) was 1–2 and 2–3 s, respectively. These responses occurred as rapidly as the vago-vagal reflex responses elicited by i.v. capsaicin (Donnerer and

Lembeck, 1982; Yeh et al., 1993; Lo et al., 1994) or the 5-HT₃ receptor agonist serotonin (Whalen et al., 2000). Therefore, we investigated the possibility that 1-nitro-2-phenylethane could induce a capsaicin- or serotonin-like bradycardiac and depressor reflex.

The present study focused on the initial and rapid bradycardia that occurred concomitantly with the initial hypotension (phase 1). These 1-nitro-2-phenylethane-induced initial hypotension and bradycardia were fully abolished in bivatogomized, anesthetized rats. Following pretreatment of conscious rats with i.v. methylatropine, a peripheral non-selective muscarinic receptor antagonist, 1-nitro-2-phenylethane-induced bradycardia was abolished whereas the hypotension was not only completely abolished, but even converted to a pressor response. This pressor component evidenced in methylatropine-pretreated conscious rats may mask phase 2 of 1-nitro-2-phenylethane-induced cardiovascular responses seen in anesthetized rats and therefore it is responsible for the monophasic nature of the 1-nitro-2-phenylethane-induced cardiovascular effects in vehicle-pretreated, conscious rats (Fig. 9). At the present moment, the mechanism by which 1-nitro-2-phenylethane evoked such a pressor effect in methylatropine-pretreated rats is unclear and requires further investigation. Nevertheless, the present *in vitro* data suggest that such a pressor effect could not be caused by a vasoconstriction action of 1-nitro-2-phenylethane since contractile responses to phenylephrine in rat endothelium-containing aorta preparations were not enhanced by 1-nitro-2-phenylethane at any concentration studied. Our data indicate that 1-nitro-2-phenylethane-induced phase 1 hypotensive and bradycardiac responses are mediated by a vagal reflex and an efferent cholinergic mechanism. Furthermore, perineural treatment with capsaicin of both cervical vagi, which has been demonstrated to selectively block the conduction of C-fiber afferents (Jancsó and Such, 1983; Schelegle et al., 2000, the present study), fully prevented the phase 1 bradycardia and

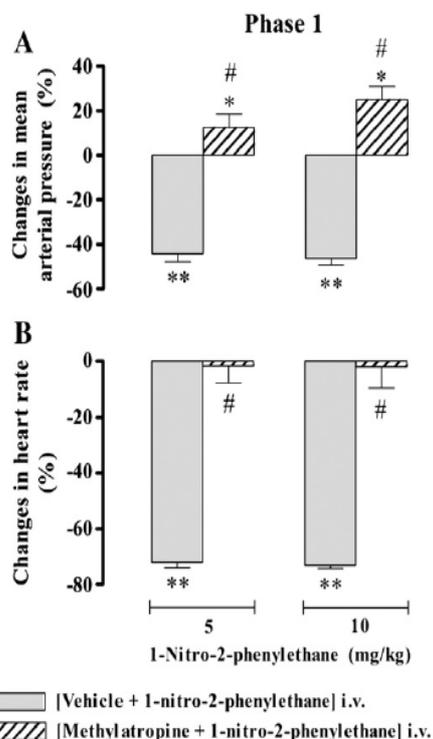


Fig. 9. Maximal changes in mean arterial pressure (A) and heart rate (B) elicited by intravenous (i.v.) administration of 1-nitro-2-phenylethane (5 and 10 mg/kg) in conscious normotensive rats pretreated with vehicle or methylatropine (1 mg/kg, i.v.). Data are mean \pm S.E.M. and expressed as percentage of baseline ($n=5-6$ rats per group). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ by paired Student's *t*-test vs. the corresponding baseline values; # $P<0.001$ by Mann–Whitney *U*-test with respect to vehicle-pretreated rats.

hypotension evoked by 1-nitro-2-phenylethane. Taken together, these findings suggest that i.v. treatment with 1-nitro-2-phenylethane stimulates vagal sensory C-fibers to elicit vago-vagal reflex decreases in heart rate and blood pressure. One may suggest that 1-nitro-2-phenylethane activates vagal sensory C-fibers indirectly via its metabolites. However, this hypothesis seems unlikely because the latency of the 1-nitro-2-phenylethane-induced reflex response is too short to be the result of a metabolic pathway and/or a secondary effect of the release of other substances by 1-nitro-2-phenylethane.

To examine the origin of the 1-nitro-2-phenylethane-induced reflex, we compared the cardiovascular responses to 1-nitro-2-phenylethane injected into the left ventricle to those elicited by i.v. injections of 1-nitro-2-phenylethane. When 1-nitro-2-phenylethane was injected into the left ventricle, the rapid bradycardia and hypotension reflex (phase 1) was absent in all animals studied. In contrast, this injection also induced delayed systemic hypotension and bradycardia that occurred with the same latency when compared to that observed for the hypotension and bradycardia (phase 2) elicited by i.v. 1-nitro-2-phenylethane. We conclude, therefore, that 1-nitro-2-phenylethane-induced initial bradycardia and hypotensive effects (phase 1) is not due to a reflex originating from the heart but seems to result from stimulation of pulmonary C-fiber afferents. It is known that activation of these afferents by various chemical agents induces the transient systemic hypotension that accompanies the reflex bradycardia (Dawes and Comroe, 1954; Coleridge and Coleridge, 1984; Brugere et al., 1986).

There are several substances that when administered intravenously, are capable of inducing reflex bradycardia and hypotension. These substances are from different chemical classes and include serotonin, hypertonic solutions, veratridine, phenylbiguanide and capsaicin. An attempt has been made to examine the receptor specificity of the 1-nitro-2-phenylethane-induced bradycardiac and depressor reflex. Our results suggest that Vanilloid TPRV₁ receptors are not involved in the mediation of 1-nitro-2-phenylethane-induced phase 1 vagus reflex, as it remained unchanged by the TPRV₁ receptor antagonist capsazepine (Bevan et al., 1992; Szallasi and Blumberg, 1999). Furthermore, the vago-vagal reflex evoked by 1-nitro-2-phenylethane is not mediated by activation of 5-HT₃ receptors and/or secondary to release of endogenous 5-HT because it was unaffected by the pretreatment with the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron. The dose of ondansetron used herein was able to completely abolish the bradycardiac and depressor reflex elicited by i.v. 5-HT. At the present time, we have no clues regarding the nature of receptors present on sensory vagal afferents that initiate the 1-nitro-2-phenylethane-induced reflex activity involving vagal afferent and efferent nerve fibers. Further experiments are necessary to address this issue.

It is unlikely that the blockade of 1-nitro-2-phenylethane phase 1 responses by perineural treatment with capsaicin is due to tachyphylaxis because no tolerance was observed in the cardiovascular effects of i.v. 1-nitro-2-phenylethane when injected at 10 min intervals. It is of interest to note that the phase 2 bradycardiac and hypotensive responses to 1-nitro-2-phenylethane were slightly but significantly reduced following bilateral vagotomy or after perineural treatment with capsaicin of both vagus nerves to block the conduction of C-fibers. This indicates that part of this phase 2 response appears to be mediated partially through activation of afferent vagal C-fibers. The remaining phase 2 hypotensive response to i.v. 1-nitro-2-phenylethane seems to result from a direct vasodilatory effect of 1-nitro-2-phenylethane on the peripheral smooth muscle. This hypothesis is supported by the findings that (i) 1-nitro-2-phenylethane induces a reversible and concentration-dependent vasodilatation on phenylephrine-precontracted isolated rat endothelium-containing thoracic aorta preparations, (ii) a hypotensive response was also observed after left ventricle injection of 1-nitro-2-phenylethane and could not be completely abolished by either bilateral vagotomy or perineural

treatment with capsaicin of both vagus nerves, and finally (iii) 1-nitro-2-phenylethane-induced phase 2 hypotension was more potent on diastolic arterial blood pressure (Fig. 5) suggesting that it is most likely due to the decrease in the peripheral vascular resistance. The origin of the remaining bradycardia after bilateral vagotomy and perineural treatment with capsaicin seems to result from a direct muscarinic-like action of 1-nitro-2-phenylethane on sinoatrial node M₂-muscarinic receptors since it was not observed in rats pretreated with the peripheral muscarinic receptor antagonist methylatropine.

It is concluded that i.v. treatment of pentobarbital-anesthetized, normotensive rats with 1-nitro-2-phenylethane induces a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1) that appears initiated in pulmonary rather than cardiac vagal afferent fibers. The transduction mechanism of the 1-nitro-2-phenylethane excitation of C-fiber endings is not fully understood and seems not to involve the activation of either Vanilloid TPRV₁ or 5-HT₃ receptors located on vagal sensory nerves. *In vitro* data suggest that the phase 2 hypotensive response to i.v. 1-nitro-2-phenylethane resulted, at least in part, from a direct vasodilatory effect of 1-nitro-2-phenylethane on the peripheral smooth muscle.

Acknowledgements

This work was supported by the "Conselho Nacional de Pesquisa" (CNPq), "Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (FUNCAP) and the "Universidade Federal de Pernambuco" (UFPE). Expert reviewing of the manuscript by Dr. Steven D. Aird (UMUC Asia, Biology, Okinawa-ken, Japan) is gratefully acknowledged. The authors also thank Dr. Andreilina Noronha Coelho-de-Souza (Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil) for kindly providing us with capsaicin and Carlos Antônio de Barros Correia Junior for technical assistance. RJB de Siqueira, LFL Interaminense and JK da Silva are Ph.D. fellowship students. TS de Brito is a PIBIC/CNPq fellow.

References

- Bagchi, S., Deshpande, S.B., 1999. Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom-induced augmentation of cardiac reflexes is mediated through the involvement of peripheral 5-HT₃ and central 5-HT_{1A} receptor subtypes. *Toxicol.* 37, 1697–1709.
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., Yeats, J.C., 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107, 544–552.
- Brugere, S., Saavedra, A., Penna, M., 1986. Cardiorespiratory inhibitory reflex induced by intravenous administration of acetaldehyde in rats. *Alcohol* 3, 317–322.
- Coleridge, J.C.G., Coleridge, H.M., 1984. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99, 1–110.
- da Silva, J.K., Sousa, P.J., Andrade, E.H., Maia, J.G., 2007. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9422–9426.
- Dawes, G.S., Comroe Jr., J.H., 1954. Chemoreflexes from the heart and lungs. *Physiol. Rev.* 34, 167–201.
- de Lima, A.B., Santana, M.B., Cardoso, A.S., da Silva, J.K., Maia, J.G.M., Carvalho, J.C., Sousa, P.J., 2009. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent component of *Aniba canelilla* essential oil. *Phytomedicine* 16, 555–559.
- de Siqueira, R.J., Leal-Cardoso, J.H., Couture, R., Lahlou, S., 2006. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 238–247.
- Donnerer, J., Lembeck, F., 1982. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 320, 54–57.
- Donnerer, J., Lembeck, F., 1983. Capsaicin-induced reflex fall in rat blood pressure is mediated by afferent substance P-containing neurones via a reflex centre in the brain stem. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 324, 293–295.
- Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., 1959. Occurrence of 1-nitro-2-phenylethane in *Ocotea pretiosa* and *Aniba canelilla*. *J. Org. Chem.* 24, 2070–2071.
- Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., 1960. Essential oil of bark and wood of *Aniba canelilla*. *Perf. Essen. Oil Rec.* 50, 69–70.
- Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., Mors, W.B., 1961. On the biogenesis of organic nitroderivatives and propenylbenzenes. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 33, 301–303.
- Janscó, G., Such, G., 1983. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. *J. Physiol.* 341, 359–370.
- Lahlou, S., Interaminense, L.F., Leal-Cardoso, J.H., Duarte, G.P., 2003. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-

- ol in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 323–330.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhães, P.J., Leal-Cardoso, J.H., Duarte, G.P., 2004. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oil, in normotensive rats. *Life Sci.* 74, 2401–2412.
- Lahlou, S., Magalhães, P.J.C., de Siqueira, R.J., Figueiredo, A.F., Interaminense, L.F., Maia, J.G., Sousa, P.J.C., 2005. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 412–421.
- Lo, Y.-C., Yeh, J.-L., Wu, J.-R., Yang, J.-M., Chen, S.-J., Chen, I.-J., 1994. Autonomic and sensory cardiovascular activities of nonivamide: intrathecal administration of clonidine. *Brain Res. Bull.* 35, 15–22.
- Maia, J. G., Zoghbi, M. G., Andrade, E. H., 2001. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém (Brazil): Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, pp. 186.
- Maia, J.G., Sousa, P.J., Fontes Júnior, E.A., Santos, A.M.S., 2003. Volatile compounds and antispasmodic activity of the stem bark oil of *Aniba canelilla*. XII Congresso Italo-latinoamericano de Etnomedicina, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- Malinowska, B., Kwolék, G., Göthert, M., 2001. Anandamide and methanandamide induce both Vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 364, 562–569.
- Naranjo, P., Kijjoa, A., Giesbrecht, A., Gottlieb, O.R., 1981. *Ocotea quixos*, American cinnamon. *J. Ethnopharmacol.* 4, 233–236.
- Oger, J.M., Richomme, P., Guinaudeau, H., Bouchara, J.P., Fournet, A., 1994. *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res.* 6, 493–497.
- Schelegle, E.S., Chen, A.T., Loh, C.Y., 2000. Effects of vagal perineural capsaicin treatment on vagal efferent and airway neurogenic responses in anesthetized rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 11, 1–16.
- Smith, P.J.W., McQueen, D.S., 2001. Anandamide induces cardiovascular and respiratory reflexes via vasosensory nerves in the anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 134, 655–663.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159–212.
- Taveira, F.S., de Lima, W.N., Andrade, E.H., Maia, J.G., 2003. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 69–75.
- Tiemán, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A.R., Hanson, A.D., Klee, H.J., 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8287–8292.
- Vasquez, E.C., Krieger, E.M., 1982. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 15, 377–387.
- Whalen, E.J., Johnson, A.K., Lewis, S.J., 2000. Functional evidence for the rapid desensitization of 5-HT(3) receptors on vagal afferents mediating the Bezold-Jarisch reflex. *Brain Res.* 873, 302–305.
- Yang, J.-M., Wu, S.-N., Chen, I.-J., 1993. Spinal adenosine modulates capsaicin-induced depressor reflex: involvement of adenosine A₂ receptor. *Gen. Pharmacol.* 24, 961–970.
- Yeh, J.-L., Lo, Y.-C., Wang, Y., Chen, I.-J., 1993. Cardiovascular interactions of nonivamide, glyceryl nonivamide, capsaicin analogues, and substance P antagonist in rats. *Brain Res. Bull.* 30, 641–648.

6. DISCUSSÃO

A administração do OEAC nas doses de 10 e 20 mg/kg e, do seu principal constituinte o NF (5 e 10 mg/kg), induziram dois períodos de hipotensão e bradicardia em ratos anestesiados. Inicialmente uma rápida bradicardia (tempo de latência 1-1,5 s) que ocorreu coincidentemente (tempo de latência 1,5-2,5 s) com uma hipotensão arterial (fase 1), seguida de redução da PA que estava associada com uma bradicardia secundária (fase 2) aos 4-8 s e 3-6 s após a administração, respectivamente. Todos esses efeitos foram reversíveis, excluindo a possibilidade de que poderiam estar relacionado a um suposto efeito tóxico do OEAC ou do NF.

Em SHRs a administração do OEAC e do NF induziu uma hipotensão e bradicardia inicial (fase 1) que foram completamente abolidas pela bivagotomia, sugerindo que este efeito tenha uma origem reflexa vagal. Como o óleo e o seu constituinte possuem um perfil de resposta semelhante à CAP e a serotonina, cuja administração induz uma hipotensão e bradicardia reflexa, foi investigado se OEAC e o NF agiria via fibras aferentes vagais do tipo C, uma vez que estudos prévios (DONNERER; LEMBECK, 1982, 1983; YEH et al., 1993; LO et al., 1994) têm demonstrado que a CAP induz uma hipotensão inicial e uma rápida bradicardia e que esses efeitos seriam mediados pelo reflexo vagal, envolvendo as fibras sensíveis à CAP. Tal efeito é muito semelhante aquele induzido pelo OEAC e pelo NF.

A CAP induz um ligeiro aumento da PAM que é ocasionado por sua ação direta no sistema vascular ocasionando a vasoconstrição, enquanto a resposta

hipotensora tardia é também mediada pelas fibras-C sensíveis à CAP. Em ratos anestesiados pré-tratados com veículo, o tempo de ocorrência da fase 1 com a redução da FC e da PAM induzida pelo OEAC e NF (10 mg/kg, i.v.) foi de 1-2 s e 2-3 s, respectivamente. Esta resposta ocorreu rapidamente, similar a resposta reflexa vago-vagal induzida pela CAP i.v.

Uma vez que as respostas cardiovasculares da fase 1, induzida pelo OEAC e NF, ocorreram tão rapidamente como a conhecida resposta reflexa vago-vagal, provocada pela administração de CAP (DONNERER; LEMBECK, 1982; YEH et al., 1993; LO et al., 1994) ou pelo agonista serotoninérgico do receptor 5-HT₃ (WHALEN et al., 2000), foi necessário avaliar a participação dessas fibras na resposta induzida pelo OEAC e NF. Para isso, foi realizado o tratamento perineural dos nervos vagos com CAP (que é capaz de bloquear seletivamente as fibras-C aferentes de condução) (JANSCÓ; SUCH, 1983; SCHELEGLE et al., 2000), verificando-se que a hipotensão e bradicardia da fase 1, induzida pelo OEAC e NF foi abolida. Esses achados corroboram a hipótese de que o OEAC e NF, i.v., estimula as fibras-C sensoriais vagais por induzir o reflexo vago-vagal diminuindo a FC e a PA. Foi descartada a possibilidade de que o bloqueio da fase 1, induzida pelo OEAC e NF, em animais que receberam o tratamento perineural com CAP seja devido a taquifilaxia, pois não ocorreu tolerância nos efeitos cardiovasculares provocados pelo OEAC e NF i.v., quando administrados em intervalos de 10 min.

Inicialmente, pensamos que o OEAC e NF agiriam em receptores para CAP (TRPV₁) ou para serotonina (5-HT₃), uma vez que a ativação desses produz o reflexo de Bezold-Jarisch. No entanto, nossos resultados mostram que eles não estão envolvidos na mediação do efeito reflexo, uma vez que as repostas

cardiovasculares mantiveram-se inalteradas pelo uso do antagonista do receptor $TRPV_1$, a capsazepina (BEVAN et al., 1992; SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Ainda, pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor $5-HT_3$, o ondansetron, foi observado que não houve alteração dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo OEAC e NF. A dose de ondansetron aqui utilizada foi capaz de abolir completamente o efeito depressor e a bradicardia reflexa provocada pela administração de 5-HT i.v. Até o momento, não é conhecida a natureza dos receptores aferentes vagais que iniciam a atividade reflexa do OEAC e do NF, portanto outros experimentos são necessários para explicitar esse mecanismo.

Em 2006, em nosso laboratório foi estudado os efeitos cardiovasculares do OECZ e de seus principais constituintes, o anetol e o estragol, e foi verificado que semelhante ao OEAC, o OECZ induzia um efeito reflexo na fase 1. Na época foi sugerido que este efeito é de origem reflexa e que o OECZ estaria atuando em receptores $TRPV_1$ uma vez que o pré-tratamento com capsazepina foi capaz de abolir o efeito da fase 1. No entanto, diferente do OEAC e do NF, o OECZ induziu um efeito pressor na fase 2 que parece ser decorrente de um efeito direto sobre o sistema vascular, efeito este ocasionado pela inibição da produção endotelial de ON (de SIQUEIRA et al., 2006).

Após o pré-tratamento de ratos SHR acordados com metilatropina i.v. (um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos periféricos), as respostas cardiovasculares da fase 1, induzidas pelo NF, foram abolidas. Entretanto, um componente pressor foi evidenciado, podendo mascarar a fase 2 da resposta cardiovascular induzida pelo NF quando os ratos estão anestesiados e, portanto, seja responsável pela natureza monofásica da resposta induzida pelo NF em ratos

acordados, pré-tratados com veículo. Este mecanismo ainda não está claro e requer investigações futuras. Não obstante, os dados atuais *in vitro* sugerem que o efeito pressor não pode ser ocasionado pela ação vasoconstritora do NF, uma vez que a resposta contrátil à FEN, em preparações de mesentérica contendo endotélio, não foi intensificada pelo NF em nenhuma das concentrações estudadas. Esses dados indicam que o efeito hipotensor e bradicardizante da fase 1, induzida pelo OEAC e do NF, são mediados por um reflexo vagal e um mecanismo colinérgico.

Por outro lado, é conhecido que a resposta mediada pelos baroreceptores para o estímulo vasodepressor é alterada em ratos anestesiados com pentobarbital (BEDRAN-DE-CASTRO et al., 1990; BARRINGER; BUNAG, 1990), logo é possível que a regulação reflexa intacta, observada em ratos acordados, possa mascarar a fase 2 da resposta cardiovascular, induzida por NF, observada em ratos anestesiados.

A possibilidade de que as fibras C sensoriais vagais pudessem ser ativadas indiretamente, através de metabólitos do OEAC e NF, parece improvável, pois a latência da resposta reflexa é muito curta para resultar de uma via metabólica e /ou efeito secundário à liberação de outras substâncias.

Para examinar a origem reflexa induzida pelo OEAC e NF, foi comparado as respostas cardiovasculares induzidas pelos mesmos, quando administrados diretamente no ventrículo esquerdo, com a resposta produzida pela administração i.v. Quando o OEAC e o NF foram administrado no ventrículo esquerdo, a bradicardia rápida e a hipotensão reflexa (fase 1) foi ausente. Entretanto, esta administração induziu uma hipotensão sistêmica e uma bradicardia tardia, que ocorreu com a mesma latência, quando comparado à observada para hipotensão e

bradicardia (fase 2) provocada pela administração i.v. do OEAC e NF. Concluímos, portanto, que o OEAC e o NF induzem inicialmente uma bradicardia e uma hipotensão (fase 1), que não é devida a um reflexo proveniente do coração, mas parece resultar da estimulação das fibras-C aferentes pulmonares.

É interessante notar que a resposta hipotensora e bradicardizante da fase 2, induzida pelo OEAC e NF, foram significativamente reduzidas após a bivagotomia ou após o tratamento perineural dos nervos vagos com CAP. Isso indica que a resposta da fase 2 é parcialmente mediada pela ativação das fibras-C aferentes vagais. No entanto, a resposta residual hipotensora parece resultar de um efeito direto do OEAC e NF na musculatura lisa vascular. Esta hipótese é corroborada por várias observações: i) a resposta hipotensora também foi observada após a administração do OEAC e NF no ventrículo esquerdo e não foi completamente abolida pela bivagotomia ou tratamento perineural dos nervos vagos com CAP; ii) o OEAC e o NF induz uma hipotensão na fase 2 mais potente sobre a pressão arterial diastólica, sugerindo que é provavelmente devido à diminuição da RVP, fato este corroborado pelo estudo de preparações vasculares *in vitro*, onde o OEAC e o NF induziu um vasorrelaxamento concentração-dependente; iii) a origem da bradicardia remanescente após bivagotomia e tratamento perineural dos nervos vagos com CAP, parece resultar de uma relação direta do OEAC e do NF em receptores muscarínicos tipo M_2 no nodo sinoatrial, uma vez que não foi observado em ratos pré-tratados com metilatropina .

Para avaliar o mecanismo de ação do efeito vasorrelaxante do OEAC e NF foram realizados experimentos *in vitro*. Estes estudos mostraram que o OEAC e o NF induzem um efeito vasorrelaxante em preparações de artéria mesentérica

superior e nas artérias mesentéricas de resistência em ratos SHRs. Este efeito poderia ser proveniente da sua toxicidade, porém essa hipótese foi descartada, pois em nossas condições experimentais todas as respostas vasodilatadoras foram reversíveis (dados não mostrados). Ademais, o OEAC e o NF apresentaram baixa ordem toxicidade ($DL_{50} = 720$ e 712 mg/kg via oral, respectivamente) (de LIMA, 2008; SOUSA et al., 2009).

A influência do endotélio foi avaliada na resposta vasorrelaxante induzida pelo OEAC e NF. Para isto, a resposta relaxante para o óleo e para o constituinte foram comparadas na presença e na ausência do endotélio. O OEAC e o NF foram capazes de relaxar as preparações pré-contraídas com FEN com valores semelhantes de IC_{50} para as preparações com endotélio intacto e para aquelas sem endotélio. Isto sugere que tanto o OEAC como o NF atue independente da integridade do endotélio. Contudo, estudos prévios realizados em nosso laboratório, utilizando ratos normotensos mostraram que o efeito vasorrelaxante induzido pelo OEAC era dependente da integridade do endotélio (LAHLOU et al., 2005).

Para avaliar se o OEAC era capaz de alterar o tônus vascular *in vitro*, foram adicionados ao tônus basal concentrações crescentes do OEAC, constatando-se que o tônus basal não era alterado pelo óleo, o que sugere que o OEAC não exerce efeito sobre o tônus basal.

Uma das formas de promover o relaxamento independente da integridade do endotélio seria a ativação de canais para K^+ presentes na musculatura lisa (DORA; GARLAND, 2001; COLEMAN et al., 2004). Esses canais estão relacionados diretamente com a PA e com o tônus vascular (TAYLOR et al., 2003; KOHLER; RUTH, 2010). Os canais para K^+ ajudam a determinar o potencial de membrana em

repouso, como também regula o volume celular. Sabe-se que a alta concentração de KCl induz uma despolarização da membrana, ocasionando a abertura dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCCs), aumentando o influxo de Ca^{2+} e conseqüentemente uma contração sustentada (SOMLYO et al., 1968). Portanto, foi investigada a participação desses canais na resposta vasorrelaxante induzida pelo OEAC e pelo NF, verificando que foram capazes de inibir a contração induzida pelo KCl, o que sugere que possam interferir no acoplamento eletromecânico. Ademais, o relaxamento mantido na presença de KCl 75 mM permitem concluir que o efeito relaxante do OEAC e do NF não poderia ser explicado pela influência do neurônio intramural na camada das células vasculares da musculatura lisa, pois altas concentrações de K^+ despolariza a membrana celular a um potencial de membrana de cerca de -20mV (GRAFE et al., 1980 ; LEAL- CARDOSO et al., 2002). Esta voltagem deprime o potencial de ação em neurônios (MEEKS; MENNERICK, 2004). Ainda, as ações inibitórias do OEAC e do NF podem não ser atribuídas a capacidade em abrir os canais para K^+ , pois quando a célula da musculatura lisa é despolarizada ocorre ativação dos canais retificadores de entrada para K^+ provocando aumento da condutância deste íon e tornando o potencial de membrana próximo ao potencial de equilíbrio como descrito pela equação de Nernst para o K^+ . Nestas condições é improvável que a abertura do canal para K^+ possa deslocar o potencial de membrana do potencial de equilíbrio. Esta conclusão é apoiada pelos resultados que mostram que a pré-incubação da artéria mesentéricas superior com TEA não alterou o efeito vasorelaxante do OEAC.

O OEAC mostrou maior potência farmacológica para inibir a contração induzida por FEN do que em relaxar a contração sustentada KCl ($\text{IC}_{50} = 20,7 \pm 4,77$

$\mu\text{g/ml}$ versus $294,19 \pm 44,42 \mu\text{g/ml}$, respectivamente). Esta observação sugere que o OEAC parece agir preferencialmente através da entrada de Ca^{2+} na célula pelo do acoplamento farmacomecânico. O íon Ca^{2+} é um importante mensageiro intracelular, sendo fundamental nos mecanismos de excitação e contração da musculatura lisa do miocárdio e dos vasos (OIGMAN; FRITSCH, 1998). A utilização de drogas bloqueadoras de canais para Ca^{2+} são utilizadas para o tratamento da hipertensão arterial a mais de três décadas, no entanto a busca de novos antagonistas para Ca^{2+} continua sendo investigada por possibilitar um emprego mais apropriado desses fármacos (RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001).

Para investigar em que tipo de canal o OEAC estaria atuando por interferir na entrada de Ca^{2+} na célula, realizamos o protocolo com o BaCl_2 que pode ser utilizado como indício de que tipo de canal o VOOC ou ROOC o OEAC estaria atuando. O BaCl_2 é permeável apenas em canais do tipo VOOC, e a adição do BaCl_2 em meio sem Ca^{2+} , pré-incubado com o OEAC ou com a nifedipina foi capaz de abolir a contração induzida por este íon. Todavia, as concentrações efetivas não são equipotentes (OEAC foi utilizada na concentração de $600 \mu\text{g/mL}$ enquanto a nifedipina foi usada na concentração de $1 \mu\text{M} = 0,346 \mu\text{g/mL}$). Este perfil do OEAC como antagonista dos canais para Ca^{2+} , é similar aos dados observados previamente em preparações de aorta oriundas de ratos normotensos (LAHLOU et al. 2005).

Provavelmente o OEAC possa estar atuando através da inibição do influxo de Ca^{2+} via canais para cálcio do tipo ROOC. Pois os resultados mostram que o OEAC foi capaz de interferir no acoplamento farmacomecânico, através da inibição da curva de FEN ($10^{-10} \text{ M} - 10^{-5} \text{ M}$). Sabe-se que a ligação da FEN ao receptor provoca

um estímulo que resulta em ativação de PLC, através da proteína G ligado ao GTP (Gs). A PLC, uma vez ativada, atua no PIP₂ originando o IP₃ e o DAG (JAMES; DOWNES, 1997). O IP₃ atua nos estoques intracelulares de Ca²⁺ induzindo a liberação deste íon, levando à contração muscular. Além disso, os receptores ativados podem desencadear mecanismos adicionais de sensibilização de Ca²⁺ envolvendo a PKC que são independentes do aumento da concentração desse íon (KITAZAWA et al., 2000).

Para avaliar o efeito do OEAC sobre a sensibilidade dos componentes contráteis ao Ca²⁺, mais precisamente na sinalização da PKC, foi utilizado o PDB, um potente ativador específico da PKC (YANAGITA et al., 1999). A contração induzida pelo PDB na artéria mesentérica superior, foi reduzida na presença do OEAC (IC₅₀ foi de 52,66 ± 16,26 µg/mL), mostrando que o OE é capaz de atuar na sensibilidade das proteínas contráteis, porém a sua potência é maior através do acoplamento farmacomecânico.

Com o objetivo de avaliar se o OEAC poderia interferir na saída de Ca²⁺ do RS, através da atuação do IP₃ (ISLAM et al., 1996), foi utilizada uma elevada concentração de FEN em meio livre de Ca²⁺ que provocou uma contração (resultante da liberação do Ca²⁺ presente no RS ativado pelo IP₃) a qual foi inibida pela incubação com o OEAC. Em semelhantes condições experimentais, utilizou-se cafeína, e neste caso, o OEAC foi incapaz de inibir a contração. Resultados semelhantes foram encontrados em preparações de aorta oriundas de ratos normotensos expostos ao OEAC (LAHLOU et al., 2005), sugerindo que este óleo atue inibindo de forma relativamente seletiva a liberação de Ca²⁺ via IP₃, mas é ineficaz nas contrações induzidas pela via Ca²⁺ induzindo liberação de Ca²⁺.

Em artérias de resistência, o efeito vasorrelaxante do OEAC possui um perfil similar a resposta das artérias de condutância, contribuindo com a hipótese de que o efeito vasorrelaxante do óleo possa causar uma redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, ocasionar uma redução da PA.

Em conjunto, os resultados sugerem que os efeitos cardiovasculares induzido pelo OEAC, é atribuído aos efeitos do seu principal constituinte o NF, uma vez que seu segundo constituinte, o ME, não poderia mediar à resposta hipotensora vagovagal e bradicardizante (fase 1). Foi demonstrado que em ratos anestesiados bivagotomizados, o ME provocou uma redução da bradicardia sem afetar a hipotensão (LAHLOU et al., 2004).

7. CONCLUSÃO

O tratamento i.v. com o OEAC e NF em elevadas doses (10 e 20 mg/kg) e (5 e 10 mg/kg), respectivamente, em ratos anestesiados com pentobarbital induz uma bradicardia e um reflexo depressor vago-vagal (fase 1) que aparentemente é resultado da estimulação das fibras C aferentes pulmonares. Porém o mecanismo de transdução de excitação destas fibras não é totalmente compreendido e parece não envolver a ativação dos receptores TPRV₁ ou dos receptores 5-HT₃, localizados em nervos sensoriais vagais. A segunda resposta hipotensora (fase 2) para o OEAC e NF parece ser resultado, pelo menos em parte, de um efeito vasodilatador direto na musculatura lisa vascular.

Os dados *in vitro* sugerem que o OEAC tem uma atividade miogénica relaxante independente da integridade do endotélio em preparações de artéria mesentérica superior de SHR através de ações inibitórias em eventos contráteis que incluem a via intracelular, além de efeitos sobre a membrana envolvendo o bloqueio da atividade de um receptor ou canal iónico. Este efeito vasorrelaxante do OEAC parece ser preferencialmente ativado pela via de ativação por receptor. Todos os efeitos *in vivo* e *in vitro* reportados para o OEAC são principalmente atribuídos a ação do seu principal constituinte, o NF.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; JAVED, S.; BHANDARI, U. Antiapoptotic potential of herbal drugs in cardiovascular disorders: an overview. **Pharm Biol.**, v. 48, n. 4, p. 358-374, 2010.

ALBUQUERQUE, A. A. C. **Efeitos farmacológicos do óleo essencial do *Croton zehntneri*** Pax et. Hoffm. (Dissertação (Mestrado)). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, Fortaleza, 1982.

ARCH, J. R. Do low-affinity states of beta-adrenoceptors have roles in physiology and medicine? **Br J Pharmacol.**, v. 5, n. 143, p. 517-518, 2004.

ARNT, R. Tesouro verde. **Exame**, São Paulo, v. 35, n.9, p. 52-64, 2001.

ASNAASHARI, S.; DELAZAR, A.; HABIBI, B.; VASFI, R.; NAHAR, L.; HAMEDEYAZDAN, S.; SARKER, S. D. Essential oil from *Citrus aurantifolia* prevents ketotifen-induced weight-gain in mice. **Phytother Res.**, v. 24, n. 12, p. 1893-1897, 2010.

ATALA, M. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Polymorphisms of the adrenergic receptor and the influences on cardiovascular regulation and diseases. **Rev Bras Hipertens.**, v.14, n. 4, p. 258-264, 2007.

BAGCHI, S.; DESHPANDE, S. B. Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) venom-induced augmentation of cardiac reflexes is mediated through the involvement of peripheral 5-HT₃ and central 5-HT_{1A} receptor subtypes. **Toxicon.**, v. 37, p. 1697–1709, 1999.

BALÁZ, A. Role of phytotherapy in the prevention and treatment of obesity. **Orv Hetil.**, v. 151, n. 19, p. 763-773, May 2010.

BARJA, F.; MATHISON, R.; HUGGEL, H. Substance P-containing nerve fibres in large peripheral blood vessels of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 229, n. 2, p. 411-422, 1983.

BARRINGER, D.L.; BUNAG, R.D. Differential anesthetic depression of chronotropic baroreflexes in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 15, p. 10–15, 1990.

BARROS, C. F.; CALLADO, C. H.; COSTA, C. G.; PUGIALLI, H. R. L.; CUNHA, M.; MARQUETE, O. Madeiras da Mata Atlântica. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, 1º ed., p. 86, 1997.

BATATINHA, M. J. M.; DE SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri*: Possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **J Ethnopharmacol.**, v. 45, p. 53–57, 1995.

BEDRAN-DE-CASTRO, M.T.; FARAH, V.M.; KRIEGER, E.M. Influence of general anesthetics on baroreflex control of circulation. **Braz J Med Biol Res.**, v. 23, p. 1185–1193, 1990.

BENALLA, W.; BELLAHCEN, S.; BNOUHAM, M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. **Curr Diabetes Rev.**, v. 6, n. 4, p. 247-254, 2010.

BEN-ARYE, E.; ATTIAS, S.; TADMOR, T.; SCHIFF, E. Herbs in hemato-oncological care: an evidence-based review of data on efficacy, safety, and drug interactions. **Leuk Lymphoma.**, v. 51, n. 8, p. 1414-1423, 2010.

BENHAM, C. D.; HESS, P.; TSIEN, R. W. Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. **Circ Res.**, v. 61, n. 2, October 1987.

BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I. F.; RANG, H. P.; SHAH, K.; WALPOLE, C. S.; YEATS, J. C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **Br J Pharmacol.**, v. 107, n. 2, p. 544-552, 1992.

BEZERRA, M. A. C. ***Alpinia speciosa* Schum: estudo de frações fixas e óleo essencial.** (Dissertação de Mestrado em Farmacologia). UFC, Fortaleza, 1994.

BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; FONTELES, M. C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia Speciosa* on rat ileum. **Phytother Res.**, v. 14, p. 1-3, 2000.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 8, p. 281-286, 2004.

BOLTON, T. B.; GORDIENKO, D. V.; PUCOVSKÝ, V.; PARSONS, S.; POVSTYAN, O. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. **Novartis Found Symp.**, v. 246, p. 154-227, 2002.

BRAIN, S. D.; COX, H. M. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. **Br J Pharmacol.**, v. 147, p. 202-211, 2006.

BRISTOW, M. R.; GINSBURG, R.; UMANS, V.; FOWLER, M.; MINOBE, W.; RASMUSSEN, R.; ZERA, P.; MENLOVE, R.; SHAH, P.; JAMIESON, S.; STINSON, E. B. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. **Circ Res.**, v. 59, n. 3, p. 297-309, 1983.

BRUGERE, S.; SAAVEDRA, A.; PENNA, M. Cardiorespiratory inhibitory reflex induced by intravenous administration of acetaldehyde in rats. **Alcohol.**, v. 3, p. 317-322, 1986.

BURNSTOCK, G. The non-adrenergic non cholinergic nervous system. **Arch Int Pharmacodyn.**, v. 1, p. 280, 1986.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, n. 2, p.179-189, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American: a personal view. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J. B. YUNES, R. A. Medicamentos fitoterápicos. In: Plantas medicinais sob a ótica da química moderna. **Chapecó: Editora Argos.**, p. 297-315, 2001.

CAPASSO, F.; GAGINELLA, T. S; GRANDOLINI, G.; IZZO, A. A. A quick reference to herbal medicine. **Phytotherapy**, Berlin, 2003.

CAPUTI, L.; APREA, E. Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. *Recent Pat Food Nutr Agric.*, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2011.

CHANG, S. T. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Pest Manag Sci.**, v. 3, n. 65, p. 339-343, 2009.

CHAPLEAU, M. W.; HAJDUCZOOK, G.; ABBOUND, F. M. Peripheral and central mechanisms of baroreflex resetting. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 15, p. 31-43, 1989.

CHAPLEAU, M. W.; CUNNINGHAM, J. T.; SULLIVAN, M. J.; WACHTEL, R. E.; ABBOUND, F. M. Structural versus functional modulation the arterial baroreflex. **Hypertens.**, v. 26, p. 341-347, 1995.

CHAPLEAU, M. W.; MEYRELLES, S. S.; MA, X.; ABBOUND, F. M. Mechanisms determining sensitivity of baroreceptor afferents in health and disease. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 940, p. 1-19, 2001.

CHEHREGANI, A.; MOHSENZADEH, F.; MIRAZI, N.; HAJISADEGHIAN, S.; BAGHALI, Z. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tripleurospermum disciforme* in three developmental stages. **Pharm Biol.**, v. 48, n. 11, p. 1280-1284, 2010.

CHEN, S. R.; ZHANG, L.; MACLENNAN, D. H. Characterization of a Ca^{2+} binding and regulatory site in the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 32, p. 23318-26, 1992.

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; LIN, C. Y.; CHEN, P. S.; HUANG, C. G.; CHEN, W, J.; CHANG, S. T. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Pest Manag Sci.**, v. 65, n. 3, p. 339-343, 2009.

COELHO-DE-SOUZA, A. N. **Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso.** (Dissertação de Doutorado) UFC, Fortaleza, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother Res.**, v. 11, p. 299-304, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytother Res.**, v. 12, p. 189-194, 1998.

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, n. 9, p. 641-649, 2004.

CORRÊA, C. C.; ALVES, A. F. Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. In: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Rio Branco.

COTECCHIA, S. The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. **J Recept Signal Transduct Res.**, v. 30, n. 6, p. 410-419, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de *Croton*. **Cienc Cult.**, v. 30, p. 326-327, 1978.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Estudo de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. **Cienc Cult.**, v. 28, p. 180, 1976.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Projeto integrado de Química e Farmacologia. **Relatório de Atividades**, p. 227, 1980.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. **J Nat Prod.**, v. 44, p. 509-632, 1981.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc Cult.**, v. 29, p. 445, 1977.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J.A.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc Cult.**, v. 29, p. 445, 1997 (Abstract).

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p. 221-230, 2006.

da SILVA, J.K.; SOUSA, P.J.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. **J Agric Food Chem.**, v. 55, p. 9422-9426, 2007.

DALY, C. J.; MCGRATH, J. C. Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of b-adrenoceptors and its relevance to drug action. **Trends in Pharm Sci.**, v. 32, n. 4, 2011.

de LIMA, A. B. Estudo da ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla*. Master dissertation. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

de LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A.S.; DA SILVA, J. K.; MAIA, J. G.; CARVALHO, J. C.; SOUSA, P. J. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomed.** v. 16, n. 6-7, p. 555-559, 2009.

de SIQUEIRA, R.J.B.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci.**, v. 78, p. 2365-2372, 2006a.

de SIQUEIRA, R. J. B.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COUTURE, R.; LAHLOU, S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 33, p. 238-247, 2006b.

de SMET, P. A. Herbal remedies. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 2046–2056, 2002.

de SOUSA, A. A.; SOARES, P.M.; DE ALMEIDA, A. N.; MAIA, A. R.; DE SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 130, n. 2, p. 433-436, 2010.

DESSY, C.; MONIOTTE, S.; GHISDAL, P.; HAVAUX, X.; NOIRHOMME, P.; BALLIGAND, J. L. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. **Circ.**, v. 24, n. 110, p. 948–954, 2004.

DI RIENZO, M.; PARATI, G.; CASTIGLIONI, P. Baroreflex contribution to blood pressure and heart rate oscillations: time scales, time-variant characteristics and nonlinearities. **Philos Transact A Math Phys Eng Sci.**, v. 13, n. 367, p. 1301-1318, 2009.

DONNERER, J.; LEMBECK, F. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. **Naunyn Schm Arch Pharmacol.**, v. 320, p. 54–57, 1982.

DONNERER, J.; LEMBECK, F. Capsaicin-induced reflex fall in rat blood pressure is mediated by afferent substance P-containing neurones via a reflex centre in the brain stem. **Naunyn Schm Arch Pharmacol.**, v. 324, p. 293–295, 1983.

DORA, K. A.; GARLAND, C. J. Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K^+ in the rat isolated mesenteric artery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 280, n. 6, p. 2424-2429, 2001.

DRUMMOND, H. A.; PRICE, M. P.; WEISH, M. J.; ABOUD, F. M. Molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer. **Neuron**, v. 21, p. 1435-1441, p. 1998.

DRUMMOND, H. A.; WEISH, M. J.; ABOUD, F. M. ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 940, p. 42-47, 2001.

EGLER, R. M.; HEDGE, S. S.; WATSON, N. Muscarinic receptor and smooth muscle function. **Pharmacol Rev.**, v. 48, n. 4, p. 532-556, 1996.

EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M. M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C.; STROSBERG, A. D. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. **Sci**, v. 245, p. 1118–1121, 1989.

ERNST, E. Are herbal medicines effective? **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v. 42, p.157-159, 2004.

FARACI, F. M.; SOBEY, C. G. Potassium channels and the cerebral circulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 23, p. 1091–1095, 1996.

FELDBERG, W.; GUERTZENSTEIN, P. G. Vasodepressor effects obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain stem. **J Physiol.**, v. 258, n. 2, p. 337-355, 1976.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol.**, v. 93, n. 3, p. 515-524, 1988.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, Campinas, v. 7, 2006.

FRANÇA, I. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, n. 2, p. 210-218, 2008.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein Kinase. **Adv Pharmacol.**, v. 26, p. 115-70, 1994.

FRANKENFELD, C. L.; CERHAN, J. R.; COZEN, W.; DAVIS, S.; SCHENK, M.; MORTON, L. M.; HARTEGE, P. Dietary flavonoid intake and non-Hodgkin lymphoma risk. **Am J Clin Nutr.**, v. 87, p. 1439-1445, 2008.

FREDRIKSSON, R.; LAGERSTROM, M. C.; LUNDIN, L. G.; SCHIOTH, H. B. The g-proteincoupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. **Mol Pharmacol.**, v. 63, p. 1256-1272, 2003.

FREISE, F. W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. **Perfum Essent Oil Res.**, v. 26, p. 219-220, 1935.

FROSCH, P. J.; JOHANSEN, J. D.; MENNÉ, T.; PIRKER, C.; RASTOGI, S. C.; ANDERSEN, K. E.; BRUZE, M.; GOOSSENS, A.; LEPOITTEVIN, J. P.; WHITE, I. R. Further important sensitizers in patients sensitive to fragrances. **Contact Dermatitis.**, v. 47, n. 5, p. 279-287, 2002.

FURCHGOTT, R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 24, p. 175-197, 1984.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 228, p. 373-376, 1980.

GALITZKY, J.; REVERTE, M.; PORTILLO, M.; CARPENE, C.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Coexistence of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines. **Am J Physiol.**, v. 264, p. E403-E412, 1993.

GAUTHIER, C.; LEBLAIS, V.; MONIOTTE, S.; LANGIN, D.; BALLIGAND, J. L. The negative inotropic action of catecholamines: role of beta3-adrenoceptors. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 9, n.78, p. 681-690, 2000.

GAUTHIER, C.; TAVERNIER, G.; CHARPENTIER, F.; LANGIN, D.; LE MAREC, H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. **J Clin Invest.**, v. 98, n. 2, p. 556-562, 1996.

GOLLASCH, M.; LOHN, M.; FURSTENAU, M.; NELSON, M. T.; LUFT, F. C.; HALLER, H. Ca^{2+} channels, Ca^{2+} sparks, and regulation of arterial smooth muscle function. **Z Kardiol.**, v. 2, p. 15-29, 2000.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist Analyst.**, v. 49, p. 114, 1960.

GOZE, I.; ALIM, A.; CETINUS, S. A.; CETIN, A.; DURMUS, N.; ATAS, A. T.; VURAL, N. In vitro antimicrobial, antioxidant, and antispasmodic activities and the composition of the essential oil of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letswaart. **J Med Food.**, v. 13, n. 3, p. 705-9, 2010.

GRASSI, G. Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 15, n. 5, p. 513-519, 2004.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxing responses of rotundifolone in rats. **Planta Med.**, v. 68, p. 700-704, 2002.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, p. 1881-1887, 2004a.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxing effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomed.**, v. 11, p. 490-497, 2004b.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 11° Ed. Elsevier, 2006.

HAI, C. M.; MURPHY, R. A. Ca^{+2} , crossbridge phosphorylation and contraction. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 285-298, 1989.

HAIBARA, A. S.; SANTOS, R. A. S. Descobrimiento e importância dos barorreceptores. **Rev Bras Hipertens.**, v. 7, p. 113-115, 2000.

HAMMER, R.; GIACHETTI, A. Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2. Biochemical and functional characterization. **Life Sci.**, v. 31, p. 2991-2998, 1982.

HARBORNE, J. B. Ecological Biochemistry. **London: Academic.** 1993

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

HOLZER, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 143-200, 1991.

HOLZER, P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, v. 121, p. 49-146, 1992.

INTERAMINENSE, L. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Planta Med.**, v. 71, p. 376-378, 2005.

INTERAMINENSE, L. F. L.; JUCÁ, M. D.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Pharmacological evidence of calcium channel blockade by the essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aorta rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 21, n. 5, p. 497-506, 2007.

IRIGOYEN, M. C.; LACCHINI, S.; De ANGELIS, K.; MICHELINI, L. C. Fisiopatologia da hipertensão: O que avançamos? **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 1, p. 20-45, 2003.

ISHIKAWA, T.; HUME, J. R.; KEEF, K. D. Regulation of Ca²⁺ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v. 73, n. 6, p. 1128-1137, 1993.

ISLAM, M. O.; YOSHIDA, Y.; KOGA, T.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; IMAI, S. Isolation and characterization of vascular smooth muscle inositol 1,4,5-triphosphate receptor. **Biochem J.**, v. 316, p. 295-302, 1996.

ITOH, T.; KURIYAMA, H.; UENO, H. Mechanisms of the nitroglycerine-induced vasodilation in vascular smooth muscles of the rabbit and pig. **J Physiol.**, v. 343, p. 233-252, 1983.

ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Two new diarylheptanoids from *Alpinia officinarum* Hance. **Chem Pharm Bull.**, v. 29, p. 2383-2385, 1981.

JACKSON, W. F.; BOERMAN, E. M.; LANGE, E. J.; LUNDBACK, S. S.; COHEN, K. D. Smooth muscle α_1D -adrenoceptors mediate phenylephrine-induced vasoconstriction and increases in endothelial cell Ca²⁺ in hamster cremaster arterioles. **Br J Pharmacol.**, v. 155, n. 4, p. 514-524, October 2008.

JACOBS, M. B. Root beer flavor components. **Amer Perf Essent Oil Rev.**, v. 51, p. 55- 57, 1948.

JAMES, S. R.; DOWNES, C. P. Structural and mechanistic features of phospholipases C: effectors of inositol phospholipid-mediated signal transduction. **Cell Signal**, v. 9, p. 329-336, 1997.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br J Pharmacol.**, v. 31, p. 138-151, 1967.

JANSCÓ, G.; SUCH, G. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. **J Physiol.**, v. 341, p. 359-370, 1983.

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci.**, v. 42, p. 111-122, 1988.

KAUMANN, A. J.; PREITNER, F.; SARSERO, D.; MOLENAAR, P.; REVELLI, J. P.; GIACOBINO, J. P. (-)-CGP12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. **Mol Pharmacol.**, v. 53, n. 4, p. 670-675, 1998.

KAUMANN, A. J.; MOLENAAR, P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. **Naunyn Schm Arch Pharmacol.**, v. 355, p. 667-681, 1997.

KERSTEN, M. S.; DENNIS, W. M.; STEPHEN, B. L. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. **Annu Rev Pharmacol and Toxicol.**, v. 43, p. 381-411, 2003.

KING, R. A. The role of polyphenols in human health. **CSIRO-Human Nutrition**, p. 85-89, 1999.

KINNMANN, E.; LEVINE, J. D. Involvement of the sympathetic postganglionic neuron in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in the rat. **Neurosci**, v. 65, n. 1, p. 238-291, 1995.

KIRSTEIN, S. L.; INSEL, P.A. Autonomic Nervous System Pharmacogenomics: a progress report. **Pharmacol Rev.**, v. 56, n. 1, p. 31-52, 2004.

KITAZAWA, T.; ETO, M.; WOODSOME, T.P.; BRAUTIGAN, D.L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **J Biol Chem.**, v. 275, p. 9897-9900, 2000.

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

KLAYMAN, D. L. *Qinghaosu* (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Sci.**, v. 228, p. 1049-1055, 1985.

KNOT, H. J.; NELSON, M. T. Regulation of arterial diameter and wall $[Ca^{2+}]$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. **J Physiol.**, v. 508, p. 199–209, 1998.

KOHLER, R.; RUTH, P. Endothelial dysfunction and blood pressure alterations in K⁺-channel transgenic mice. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 696-676, 2010.

KOPP, U. C.; CICHA, M. Z.; SMITH, L. A. Dietary sodium loading increases arterial pressure in afferent renal-denervated rats. **Hypertens.**, v. 42, p. 968-973, 2003.

KORNET, L.; HOEKS, A. P.; JANSSEN, B. J.; HOUBEN, A. J.; DE LEEUW, P. W.; RENEMAN, R. S. Neural activity of the cardiac baroreflex decreases with age in normotensive and hypertensive subjects. **J Hypertens.**, v. 23, n. 4, p. 815-823, 2005.

KRAUHS, J. M. Structure of rat aortic baroreceptors and their relationship to connective tissues. **J Neurocytol.**, v. 8, p. 401-414, 1979.

KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circ Res.**, v. 15, p. 511-521, 1964.

LAHLOU, S.; PINTO DUARTE, G.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MAGALHÃES, P. J. C.; CUNHA, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Papel do sistema nervoso autônomo nos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* em atos normotensos, açodados. In, Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil. pp. 107, 1996a.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAIA, M. B. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; PINTO DUARTE, G. Avaliação dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Coton nepetaefolius* em ratos com hipertensão DOCA-sal, acordados. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil, pp. 107, 1996b.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; PINTO DUARTE, G. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 65, p. 553-557, 1999.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Med.**, v. 66, p. 138-143, 2000.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-FILHO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; TOSCANO, C. F. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 67, p. 638-643, 2001.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 715-720, 2002a.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. C. J.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Involvement of the nitric oxide in the mediation of the hypotensive action of the essential oil of *Mentha x villosa* in normotensive conscious rats. **Planta Med.**, v. 68, p. 694-699, 2002b.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 80, p. 1125-1131, 2002c.

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A. B.; FONTELES, C. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 68, p. 1097-1092, 2002d.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 17, p. 323-330, 2003.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H., DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sci.**, v. 74, p. 2401-2412, 2004a.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L. F. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many essential oils, in normotensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 4, p. 250-257, 2004b.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MORAIS, S. M.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 31, p. 219-225, 2004c.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; de SIQUEIRA, R. J. B.; FIGUEIREDO, A. F.; INTERAMINENSE, L. F.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 46, p. 412-421, 2005.

LANDS, A. M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J. P.; LUDUENA, F. P.; BROWN, T. G. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, v. 214, n. 88, p. 597-598, 1967.

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2.ed. Rio de Janeiro, **Record**, 1993.

LE BOURHIS, B. Recherches préliminaires sur le métabolisme du trans-anéthole. **Ann Biol Clin.**, v. 26, p. 711-715, 1968.

LE BOURHIS, B. Identification de quelques métabolites du trans-anéthole chez l'Homme, le Lapin et le Rat. **Ann Pharm Fran.**, v. 28, p. 355-361, 1970.

LE MOAN, G. Les aromatisants: problèmes toxicologiques posés par leur emploi. **Aliment Et Vie.**, v. 61, p. 121-160, 1973.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An Acad Bras Cienc.**, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.

LEE, S. K.; SIRAJUDEEN, K. N.; SUNDARAM, A.; ZAKARIA, R.; SINGH, H. J. Effects of antenatal, postpartum and post-weaning melatonin supplementation on blood pressure and renal antioxidant enzyme activities in spontaneously hypertensive rats. **J Physiol Biochem.**, v. 67, n. 2, p. 249-257, June 2011.

LEHMANN, H. U.; HOCHREIN, H.; WITT, E.; MIES, H. W. Hemodynamic effects of calcium antagonists Review. **Hypertension**, v. 11, p. 66-73, 1983.

LEIFERT, W. R.; MAHINDA, Y. A. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutr Res.**, v. 28, n. 11, p. 729-737, 2008.

LEVY, M. N.; SWARTZ, P. J. Vagal control of the heart: experimental basis and clinical application. **Futura Publishing Company, Inc.**, v. 7, p. 173-205, 1994.

LIMA, C. C.; CRIDDLE, D. N.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MONTE, F. J. Q.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta Med.**, v. 66, n. 5, p. 408-411, 2000.

LIMA, M. P.; SILVA, T. M.; SILVA, J. D.; B. ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. H. Essential oil composition of leaf and fine stem of Aniba canelilla (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 329-330, 2004.

LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T. L.; TAYLOR, A. E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{+2} by cAMP in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 399-407, 1990.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). **Phytother Res.**, v. 13, n. 6, p. 540-542, September 1999.

LO, Y.C.; YEH, J.L.; WU, J.R.; YANG, J.M.; CHEN, S.J.; CHEN, I.J. 1994. Autonomic and sensory cardiovascular activities of nonivamide: intrathecal administration of clonidine. **Brain Res. Bull.**, v. 35, p. 15-22, 1994.

LOHMANN, S. M.; VAANDRAGER, A. B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, H. R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends Biochem Sci.**, v. 8, p. 307-312, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto plantarum**, São Paulo, 2002.

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

MACIEL, M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAEDA, A.; KUBO, T.; MISHINA, M.; NUMA, S. Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **FEBS Lett.**, v. 239, p. 339-342, 1988.

MARK, E.; DUNLAP, M. D. Cardiopulmonary baroreflexes. **Hypertension primer.**, v. 39, p. 123-125, 2008.

MAGALHÃES, P. J. C. **Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaia.** (Dissertação de Mestrado) UFC, Fortaleza, 1997.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother Res.**, v. 12, p. 172-177, 1998a.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRUZ, G. M. P.; BABADOPULOS, R. F. A. L.; ALBUQUERQUE, A. A. C.; BORGES, G. C. O.; CRIDDLE, D. N.; LAHLOU, S.; DUARTE, G. P.; LEAL-CARDOSO, J. H. Efeito do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (OECN) sobre a aorta isolada de ratos normotensos e hipertensos. In: XIII Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brasil. pp. 109, 1998b.

MAGALHÃES, P. J. C. **Estudo farmacológico do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* Baill sobre o músculo liso traqueal e vascular e sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celíaco.** (Dissertação de Doutorado) UFC, Fortaleza, 2002.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; VASCONCELOS DOS SANTOS, M. A.; PRADINES, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Plant Med.**, v. 69, p. 874-877, 2003.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 18, p. 539-546, 2004.

MAGGI, C. A.; MELLI, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Gen Pharmacol.**, v. 19, p. 1-43, 1988.

MAGGI, C. A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. **J Autonom Pharmacol.**, v. 11, p.173-208, 1991.

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog Neurobiol.**, v. 45, p. 91-98, 1995a.

MAGGI, C. A. The mammalian tachykinin receptors. **Gen Pharmacol.**, v. 26, p. 911-944, 1995b.

MAIA, J. G.; ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. H. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém (Brazil): Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeld. 186, 2001.

MALINOWSKA, B.; KWOLEK, G.; GÖTHERT, M. Anandamide and methanandamide induce both vallinoid VR1- and cannabinoid CB1 receptor mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. **Naunyn Schm Arch Pharmacol.**, v. 364, p. 562-569, 2001.

MARQUES, C.A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 195-206, 2001.

MATOS, M. J. A.; FERNANDES, A. Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste. Convênio BNBCNPq-UFC, 1975-1978.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. In: Edições UFC, Fortaleza, CE. Brazil, p.127, 1994.

MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. M. Guia Fitoterápico. Ceará. Governo do Estado do Ceará, 2001.

MCCALL, R. B.; GEBBER, G. L.; BARMAN, S. M. Spinal interneurons in the baroreceptor reflex arc. **Am J Physiol.**, v. 232, n. 6, p. 657-665, 1977.

MCDANIEL, N. L.; REMBOLD, C. M.; RICHARD, H. M.; MURPHY, R. A. Cyclic AMP relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell Ca²⁺ concentration. **J Physiol.**, v. 439, p. 147-160, 1991.

MEEHAN, A. G. ; KREULEN, D. L. A capsaicin-sensitive inhibitory reflex from the colon to mesenteric arteries in the guinea-pig. **J Physiol.**, v. 448, p. 153-159, 1992.

MELDRUM, E.; PARKER, P. J.; CAROZZI, A. PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1092, p. 49-71, 1991.

MENDONÇA, V. L. M. **Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum.** (Dissertação de Mestrado). UFC, Fortaleza, 1989.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

MICHELINI, L. C. Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: Ayres MM. Fisiologia. **Guanabara Koogan**; Rio de Janeiro; p. 571-593, 2008.

MOLENAAR, P.; CHEN, L.; SEMMIER, A. B.; PARSONAGE, W. A.; KAUMANN, A. J. Human heart beta-adrenoceptors: beta1-adrenoceptor diversification through 'affinity states' and polymorphism. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 34, n. 10, p. 1020-1028, 2007.

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

MONTANARI, I. Plantas medicinais. Campinas, 2002. Disponível em: <www.cpqba.unicamp.br>

MOURA, R. S.; EMILIANO, A. F.; 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, p. 288-294, 2005.

MULDERRY, P. K.; GHOTEI, M. A.; RODRIGO, J.; ALLEN, J. M.; ROSENFELD, M. G.; POLAK, J. M.; BLOOM, S. R. Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. **Neurosci.**, v. 14, p. 947-954, 1985.

MULVANY, M. J. Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. **J Hypertens Suppl.**, v. 11, n. 5, p. 7-12, 1993.

MULVANY, M. J.; HALPER, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ. Res.**, v. 41, p. 19-26, 1977.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J Physiol.**, v. 259, p. 3-18, 1990.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod.**, v. 3, n. 70, p. 461-477, 2007.

NISHIMURA, J. Topics on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 102, n. 1, p. 27-31, 2006.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. Aniba canelilla (H.B.K.) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **J Essential Oil Res.**, v. 6, n. 5, p. 493-497, 1994.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Antagonistas de canais de cálcio. **HiperAtivo**, v. 2, p. 104-109, 1998.

OLIVER, B. Medicinal Plants in Nigeria. Nigerian College of Arts, Science and Technology, Ibadan, Nigeria. 1960.

OLIVER E, MARTÍ D, MONTÓ F, FLACCO N, MORENO L, BARETTINO D, IVORRA MD, D'OCÓN P. The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. **J Pharmacol Exp Ther.** 328 (3):982-990, 2009.

OSSWALD, W.; GUIMARAES, S. Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, v. 96, p. 53-122, 1983.

OSTOPOVICI-HALIP, L.; CURPAN, R.; MRACEC, M.; BOLOGA, C. G. Structural determinants of the alpha2 adrenoceptor subtype selectivity. **J Mol Graph Model.**, v. 29, n. 8, p. 1030-8, August 2011.

PADILHA DE PAULA, J.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p. 253-260, 2003.

PADWAL, R.; STRAUS, S. E.; MCALISTER, F. A. Evidence based management of hypertension. Cardiovascular risk factors and their effects on the decision to treat hypertension: evidence based review. **BMJ.**, v. 322, p. 977-980, 2001.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Vascular smooth muscle contraction mechanisms. **Rev Bras Hipertens.**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PALMER, M. E.; HALLER, C.; MCKINNEY, P. E. Adverse events associated with dietary supplements: an observational study. **Lancet.**, v. 36, p.101-106, 2003.

PEREIRA, S. B.; GAVA, I. A.; GIRO, C.; MESQUITA, E. T. Adrenergic Receptor Polymorphisms in Heart Failure: what can Genetics Explain? **Arq Bras Cardiol.**, v. 94, n. 6, p. 841-849, 2010.

PEREZ, M. I.; LINDEN, W.; PERRY, T. JR.; PUIL, L. J. ; WRIGHT, J. M. Failure of psychological interventions to lower blood pressure : a randomized controlled trial. **Open Med.**, v. 9, n. 2, p. 92-100, 2009.

PEREZ, M. I.; MUSINI, V. M. Pharmacological interventions for hypertensive emergencies: a Cochrane systematic review. **J Hum Hypertens.**, v. 22, n. 9, p. 596-607, 2008.

PINTO, A. C. O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CECCATTO, V. M.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomed.**, v. 16, n. 12, p. 1151-1155, 2009.

PITT, B. Evaluation of Losartan in the Elderly (ELITE) Trial: clinical implications. **Eur Heart J.**, v. 18, n. 8, p. 1197-1199, 1997.

PITT, B.; POOLE-WILSON, P. A.; SEGAL, R.; MARTINEZ, F. A.; DICKSTEIN, K.; CAMM, A. J. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. **Lancet.**, v. 355, n. 9215, p. 1582-1587, 2000.

POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. **Ministério da Saúde**, Brasília-DF, 2006.

POPESCU, L. M.; FORIL, C. P.; HINESCU, M.; PANOIU, C.; CINTEZA, M.; GHERASIM, L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{+2} -extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol.**, v. 34, n. 10, p. 1857-1860, 1985.

POST, S. R.; HAMMOND, H. K.; INSEL, P. A. Beta-Adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 343-360, 1999.

PSATY, B. M.; LUMLEY, T.; FURBERG, C. D.; SCHELLENBAUM, G.; PAHOR, M.; ALDERMAN, M. H.; WEISS, N. S. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. **JAMA**, v. 289, n. 19, p. 2534-2544, 2003.

RALEVIC, V. Endothelial nitric oxide modulates perivascular sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 1, p. 19-28, 2002.

RAPAPORT, R. M.; WALDMAN, S. A.; SCHWARTZ, K.; WINQUIST, R. J.; MURAD, F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 115, p. 219-229, 1985.

REUTER, J.; MERFORT, I.; SCHEMPP, C. M. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. **Am J Clin Dermatol**, v. 11, n. 4, p. 247-267, 2010.

RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M. N. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 114-124, 2001.

RIEGGER, G. A.; STEILNER, H.; HAYDUK, K.; LIEBAU, G. Captopril in the long-term treatment of essential hypertension: changes in the renin-angiotensin-aldosterone system. **Am J Cardiol**, v. 49, n. 6, p. 1555-1557, 1982.

RINALDI, G.; GINGOLANI, H. Relationship between baseline blood pressure and blood pressure decrease after calcium channel blockers in conscious rats. **Can J Cardiol**, v. 10, n. 7, p. 743-747, 1994.

ROBERTSON, B. E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol**, v. 265, p. 299-303, 1993.

ROSA, M. L.; ROSSI, C. M.; BAIANO, A.; CRISTOFARO, A. Comparative effects of chronic ACE inhibition and AT1 receptor blocked losartan on cardiac hypertrophy and renal function in hypertensive patients. **J Human Hypert**, v. 16, p. 133-140, 2002.

ROZEC, B.; GAUTHIER, C. β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. **Pharmacol Ther.**, v. 111, p. 652–673, 2006.

RYALL, R. W. Modulation of cholinergic transmission by substance P. **Ciba Found Symp.**, v. 91, p. 267-280, 1982.

SADOSHIMA, J.; AKAIKE, N.; KANAIDE, H.; NAKAMURA, M. Cyclic AMP modulates Ca^{2+} -activated K^+ channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. 754–759, 1988.

SARSERO, D.; RUSSELL, F. D.; LYNHAM, J. A.; RABNOTT, G.; YANG, I.; FONG, K. M.; LI, L.; KAUMANN, A. J.; MOLENAAR, P. (–)-CGP 12177 increases contractile force and hastens relaxation of human myocardial preparations through a propranolol-resistant state of the beta 1-adrenoceptor. **Naunyn Schm Arch Pharmacol.**, v. 367, n. 1, p. 10–21, 2003.

SCHELEGLE, E.S.; CHEN, A.T.; LOH, C.Y. Effects of vagal perineural capsaicin treatment on vagal efferent and airway neurogenic responses in anesthetized rats. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.** v. 11, p. 1-16, 2000.

SCHIFFRIN, E. L.; DENG, L. Y.; LAROCHELLE, P. Prospective study of the effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a beta blockader on the structure and function of resistant arteries in mild essential hypertension. **Arch Mal Coeur Vaiss.**, v. 87, n. 8, p. 979-981, 1994.

SEN, P.; HO, M. S.; NG, S. K.; YOSIPOVITCH, G. Contact dermatitis: a common adverse reaction to topical traditional Chinese medicine. **Int J Dermatol.**, v. 49, n. 11, p. 1255-1260, 2010.

SHARIFIFAR, F.; YASSA, N.; MOZAFFARIAN, V. Bioactivity of major components from the seeds of *Bunium persicum* (Boiss.) Fedtch. Pak. **J Pharm Sci.**, v. 23, n. 3, p. 300-304, 2010.

SILANO, M.; DE VINCENZI, M.; DE VINCENZI, A.; SILANO, V. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia**, v. 75, p. 107-116, 2004.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, p. 387-415, 1999.

SMALL, K. M.; MCGRAW, D. W.; LIGGETT, S. B. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 381–411, 2003.

SMITH, P. J. W.; MCQUEEN, D. S. Anandamide induces cardiovascular and respiratory reflexes via vasosensory nerves in the anaesthetized rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, p. 655–663, 2001.

SOARES de MORA, R.; COSTA, V. F. S.; SOUZA, M. A.; KOVARY, K.; GUEDES, D. C.; OLIVEIRA, E. P. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **J Pharm Pharmacol.**, v. 54, p. 1515-1520, 2002.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SOUSA, P. J. C. Estudo farmacológico do óleo essencial da *Mentha villosa* e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrintestinais de cobaia e pressão arterial de rato. (Dissertação de Mestrado). UFC, Fortaleza, 1999.

SOUSA, P. J. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; OLIVEIRA, V. S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Braz J Med Biol Res.**, v. 30, p. 787-791, 1997.

SOUSA, P. J.; GONÇALVES, P. A.; TRABULO, M.; MARQUES, H.; MARTO, N.; BRITO, J.; MACHADO, F. P.; ROQUETTE, J. Hypertrophic cardiomyopathy-two atypical forms diagnosed by cardiac CT. **Rev Port Cardiol.**, v. 28, p. 867-875, 2009.

SOUSA, P. J. C.; ARAÚJO, J. S.; PEREIRA, L. L. S.; MODRO, M. N. R.; MAIA, J. G. S.; ARAÚJO, M. T. F.; CARVALHO, J. C. T.; PERAZZO, F. F. Phytochemical and toxicological evaluations of the essential oil from the bark of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. Essen. **Oil Res.**, v. 21, p. 381-338, 2009.

STRUIJKER, B. H.; NOBLE, J. L.; MESSING, M. W.; HUIJBERTS, M. S.; LE NOBLE, F. A.; VAN ESSEN, H. The microcirculation and hypertension. **J Hypertens Suppl.**, v. 10, n. 7, p. 147-156, 1992.

STUMPE, K. O. Antihypertensive therapy: new strategies beyond blood pressure control. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 20, n. 6, p.1-4, 1992.

SUMNER, M. D.; ELLIOTT-ELLER, M.; WEIDNER, G.; DAUBENMIER, J. J.; CHEW, M. H.; MARLIN, R.; RAISIN, C. J.; ORNISH, D. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. **Am J Cardiol.**, v. 96, p. 810-814, 2005.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev.**, v. 51, p. 159-212, 1999.

TAVARES, A.; PLAVNIK, F. L. Inibidores do sistema simpático. **HiperAtivo**, v. 2, p. 91-96, 1998.

TAYLOR, M. S.; BONEY, A. D.; GROSS, T. S.; ECKMAN, D. M.; BRAYDEN, J. E.; BOND, C. T.; ADELMAN, J. P. NELSON, M. T. Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. **Circ Res.**, v. 93, n. 2, p. 124-131, 2003.

THOREN, P. Role of cardiac C-fibers in cardiovascular control. **Physiol Biochem Pharmacol.**, v. 86, p. 1-94, 1979.

TAVEIRA, F. S. N.; de LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 69-75, 2003.

TOM, E. N.; DEMOUGEOT, C.; MTOPI, O. B.; DIMO, T.; DJOMENI, P. D.; BILANDA, D. C.; GIRARD, C.; BERTHELOT, A. The aqueous extract of *Terminalia superba* (Combretaceae) prevents glucose-induced hypertension in rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 828-833, 2010.

TRAUSTADO, T.; DAVIES, S. S.; STOCK, A. A. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. **J Nutr.**, v. 139, p. 1896-1900, 2009.

TSURU, H.; NORIAKI, T.; HIRAI, T. Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.88, p. 9 - 13, 2002.

TWORT, C. H.; VAN BREEMEN, C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 62, n. 5, p. 961-964, 1988.

VALE, N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, n. 3, p. 368-380, 2002.

VASQUEZ, E. C.; KRIEGER, E. M. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in the rat. **Braz J Med Biol Res.**, v. 15, n. 6, p. 377-387, 1982.

VEIGA JR, V. F.; PINTOL, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.3, 2005.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIROL, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2. 2006.

WANG, Y.; WANG, D. H. Neural Control of Blood Pressure: Focusing on Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves. **Cardiovasc Haematol Disord Drug Targets.**, v. 7, n. 1, p. 37-46, 2007.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advan. Physiol. Educ.**, v. 27, p. 201- 206, 2003.

WELLMAN, G. C.; NELSON, M. T. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺ sensitive ions channels. **Cell Calcium**, v. 34, p. 211-229, 2003.

WERFF, H. W. D.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, p. 419 – 432, 1996.

WHALEN, E.J.; JOHNSON, A.K.; LEWIS, S.J. Functional evidence for the rapid desensitization of 5-HT(3) receptors on vagal afferents mediating the Bezold–Jarisch reflex. **Brain Res.**, v. 873, p. 302–305, 2000.

WILLIAMS, S. M. Endophenotypes, heritability, and underlying complexity in hypertension. **Am J Hypertens.**, v. 23, n. 8, p. 819, 2010.

WORKMAN, A. J. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 381, n. 3, p. 235-249, 2010.

WRIGHT, J. M.; LEE, C. H.; CHAMBERS, G. K. Systematic review of antihypertensive therapies: does the evidence assist in choosing a first-line drug? **CMAJ.**, v. 161, n. 1, p. 25-32, 1999.

WRIGHT, J. M.; MUSINI, V. M. First-line drugs for hypertension. **J Med São Paulo.**, v. 128, n. 47, 2010.

YAMAGUCHI, O.; KANESHIRO, T.; SAITOH, S.; ISHIBASHI, T.; MARUYAMA, Y.; TAKEISHI, Y. Regulation of coronary vascular tone via redox modulation in the alpha 1-adrenergic-angiotensin-endothelin axis of the myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 296, n. 1, p. 226-232, 2009.

YANAGITA, T.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, R.; TAKAMI, Y.; YOKOO, H.; YUHI, T.; NAKAYAMA, T.; WADA, A. Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel alpha- and beta 1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. **J Neurochem.**, v. 73, n. 4, p. 1749-1757, 1999.

YANG, D; LUO, Z; MA, S; WONG, W. T.; MA, L.; ZHONG, J.; HE, H.; ZHAO, Z.; CAO, T.; YAN, Z.; LIU, D.; ARENDSHORST, W. J.; HUANG, Y.; TEPEL, M.; ZHU, Z. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. **Cell Metab.**, v. 12, n. 2, p. 130-141, 2010.

YEH, J.L.; LO, Y.C.; WANG, Y.; CHEN, I.J. Cardiovascular interactions of nonivamide, glyceryl nonivamide, capsaicin analogues, and substance P antagonist in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 30, p. 641-648, 1993.

ZENG, J.; JIA, M.; RAN, H.; TANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, X.; WANG, H. YANG, C.; ZENG, G. Fixed-combination of amlodipine and diuretic chronotherapy in the treatment of essential hypertension: improved blood pressure control with bedtime dosing-a multicenter, open-label randomized study. **Hypertens Res.**, v. 34, n. 6, p. 767-772, 2011.

ZHENG, M.; HAN, Q.; XIAO, R. Distinct β -adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. **Acta Physiologica Sinica**, v. 56, n. 1, p. 1-15, 2004.

ZHOU, S.; KOH, H. L.; GAO, Y.; GONG, Z. Y.; LEE, E. J. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life Sci.**, v. 74, n. 8, p. 935-968, 2004.

ZHOU, S. F.; XUE, C. C.; YU, X. Q.; WANG, G. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. **Curr Drug Metab.**, v. 8, n. 6, p. 526-553, 2007.

ZHOU, L. ; ZHANG, P. ; CHENG, Z. ; HAO, W.; WANG, R. ; FANG, Q. ; CAO, J. M. Altered circadian rhythm of cardiac β 3-adrenoceptor activity following myocardial infarction in the rat. **Basic Res Cardiol.**, v. 106, n. 1, p. 37-50, 2011.