

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Efeitos de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli em endotélio dependente, mediado por receptores M3-muscarínicos e B2-bradicininérgicos, na resistência vascular periférica e seus efeitos moduladores nos canais de potássio ativados por cálcio, em leitos arteriais mesentéricos

ENAILE SALVIANO DE CARVALHO

**Dourados - MS
2018**

ENAILE SALVIANO DE CARVALHO

Efeitos de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli em endotélio dependente, mediado por receptores M3-muscarínicos e B2-bradicininérgicos, na resistência vascular periférica e seus efeitos moduladores nos canais de potássio ativados por cálcio, em leitos arteriais mesentéricos

Área do CNPq: Ciências da Saúde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros

Dourados - MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C331e Carvalho, Enaile Salviano De

Efeitos de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli em endotélio dependente, mediado por receptores M3-muscarínicos e B2-bradicininérgicos, na resistência vascular periférica e seus efeitos moduladores nos canais de potássio ativados por cálcio, em leitos arteriais mesentéricos / Enaile Salviano De Carvalho -- Dourados: UFGD, 2018.

68f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio Eduardo de Barros

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Alismataceae. 2. Tônus arteriolar. 3. Óxido nítrico. 4. prostaglandinas. 5. Vasodilatação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(s) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA POR **ENAILE SALVIANO DE CARVALHO**, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "**FARMACOLOGIA**", REALIZADA NO DIA 24 DE ABRIL DE 2018.

Ao vigésimo quarto dia do mês de abril do ano de dois mil e dezoito (24/04/2018), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Efeitos de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schlttdl) Micheli em endotélio dependente, mediado por receptores M3-muscarínicos e B2-bradicininérgicos, na resistência vascular periférica e seus efeitos moduladores nos canais de potássio ativados por cálcio, em leitos arteriais mesentéricos**" apresentada pela mestrandia ENAILE SALVIANO DE CARVALHO, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Marcio Eduardo de Barros** (Presidente/orientador), **Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso** (membro titular/externo), **Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya** (membro titular/programa) e **Dra. Joyce Alencar dos Santos** (membro titular/UFGD). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 24 de abril de 2018.

Dr. Marcio Eduardo de Barros

Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso

Dra. Joyce Alencar dos Santos Radai

Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

ATA HOMOLOGADA EM: / / , PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que me disseram que conseguiria, muito antes de eu saber que poderia.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me permitir realizar essa caminhada que tanto me ensinou.

Ao **Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros** que desde 2012 me incluiu em seus projetos e me direcionou à essa fase. Por ter me orientado desde a graduação, me apoiado nas escolhas e confiar ao me mandar para Unifesp aprender etapas que me trouxeram até aqui. Foram anos de trabalho, aprendizado e incentivo e, eu serei sempre grata por ter acreditado em mim. Não haveria mestrado sem você como orientador.

Ao “**team Arquimedes**”. À **Cleide** que me pegou pela mão e me ensinou cada etapa com a paciência de uma mãe; **Aline** que dividiu a carga de trabalho; **Rhanany** que contribuiu para que tudo desse certo; **Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior** que abraçou esse projeto, me apoiou e me “emprestou” sua equipe (Lucas, Maysa, Aniely), meus mais sinceros muito obrigada;

Ao **Prof. Dr. Jonas da Silva Mota**, que tornou cada processo mais simples e aceitou a correria de cada fase de preparação dos extratos e frações;

À **Josne, Ludimila, Débora e Carol** que me auxiliaram na primeira tentativa;

Às **Gazelas** (Carol, Laisa, Rafa e Cyntia) e **Fred** que tornaram o primeiro ano mais leve.

Às minhas amigas **Jessica, Emily e Mônica** que ouviram reclamações e amenizaram minhas dores;

Ao **Jorge** que chegou no meio da bagunça e abraçou a loucura sorrindo. Você tornou mais feliz cada dia desse último ano de mestrado;

Á **minha família** que sempre esteve comigo: para limpar rato, tabular dados, formatar gráficos, dividir as felicidades e aguentar as inúmeras incertezas. Vocês me permitem ser o meu melhor e, aceitam o pior. Se o mestrado foi possível para mim, foi porque dividiram o peso comigo. **Pai, mãe, Ná e João**, obrigada por terem continuado acreditando e, por terem pensado em planos alternativos quando precisei. **Eu amo vocês!**

EPÍGRAFE

Se você encontrar um caminho sem obstáculos,
ele provavelmente não leva a lugar nenhum

(FRANK A. CLARK)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema preferencial de associação de medicamentos, de acordo com mecanismos de ação e sinergia.....	22
Figura 2 – <i>Echinodorus grandiflorus</i> em seu habitat natural.....	25
Figura 3 – Folha de <i>E. grandiflorus</i>	26
Figura 4 – Exsicata da folha de <i>E. grandiflorus</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de Variância

AVC - Acidente Vascular Cerebral

CV - Cardiovascular

DAC - Doença Arterial Coronariana

DAP - Doença Arterial Periférica

DASH - *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (Abordagens dietéticas para parar a hipertensão)

DCNT - Doença Crônica Não Transmissível

DCV - Doença Cardiovascular

EEEG - Extrato etanólico da *Echinodorus grandiflorus*

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

HPLC - *High performance liquid chromatography* (cromatográfica líquida de alta eficiência)

IECA - Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

IC - Insuficiência Cardíaca

LOA – Lesões em Órgãos Alvo

NO – Óxido Nítrico

PA - Pressão Arterial

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAM - Pressão Arterial Média

PAS - Pressão Arterial Sistólica

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

Efeitos de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli em endotélio dependente, mediado por receptores M3-muscarínicos e B2-bradicininérgicos, na resistência vascular periférica e seus efeitos moduladores nos canais de potássio ativados por cálcio, em leitos arteriais mesentéricos

RESUMO

Echinodorus grandiflorus tem sido utilizada como agente anti-hipertensivo e diurético. No entanto, os metabólitos secundários responsáveis por essa atividade, bem como os mecanismos moleculares responsáveis por seus efeitos na resistência vascular periférica permanecem desconhecidos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar efeitos vasodilatadores e antioxidantes do extrato etanólico das folhas de *E. grandiflorus* e frações hexânica (HexFr), clorofórmica (ChlFr) e n-butanólica (ButFr) em leitos mesentéricos isolados. Inicialmente, o extrato etanólico foi obtido a partir de folhas de *E. grandiflorus* (EEEG), em seguida realizou-se fracionamento líquido-líquido e análise por cromatografia líquida de alta eficiência das preparações obtidas. O EEG e ButFr mostraram uma concentração significativa de compostos fenólicos e flavonóides com valores significativamente superior aos encontrados nas frações HexFr e ChlFr. Estes compostos foram identificados como ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e luteolina. Posteriormente, foram avaliados os efeitos vasodilatadores do EEG e frações hexânica, clorofórmica e n-butanólica nos leitos e a preparação com melhor efeito foi utilizada para análises de mecanismo *in vitro* nos leitos. A ButFr reduziu a pressão de perfusão em leitos mesentéricos isolados de forma concentração-dependente. A remoção ou inibição óxido nítrico endotelial e prostaglandina sintase por L-NAME associado à indometacina inibiu os efeitos vasodilatadores induzidos pelo EEG e ButFr. Além disso, a associação de atropina e HOE-140 inibiu totalmente o EEG e a vasodilatação induzida por ButFr. A perfusão com solução nutritiva contendo 40 mM de KCl inibiu o efeito vasodilatador de todas as doses de EEG e ButFr. Finalmente, o tratamento com tetraetilamônio bloqueou completamente a vasodilatação induzida pelo EEG ou pelo ButFr. Este estudo mostrou que o EEG e ButFr tem importantes efeitos vasodilatadores sobre os leitos arteriais mesentéricos. Aparentemente, esses efeitos são dependentes dos receptores muscarínicos M3 endoteliais e bradicininérgicos B2, induzindo a liberação óxido nítrico e prostaciclina, seguida da ativação dos canais sódio e potássio no músculo liso vascular. Este estudo abre perspectivas para o uso de EEG ou ButFr em situações onde a redução de pressão de perfusão é necessária.

Palavras-chave: Alismataceae; tônus arteriolar; óxido nítrico; prostaglandinas; vasodilatação

Endothelium-dependent effects of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli mediated by M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors on peripheral vascular resistance and its modulatory effects on calcium-activated potassium channels in mesenteric vascular beds

ABSTRACT

Echinodorus grandiflorus has been used as an antihypertensive and diuretic agent. However, the secondary metabolites responsible for this activity, as well as the molecular mechanisms responsible for its effects on peripheral vascular resistance remain unknown. The aim of this study was to evaluate the vasodilator and antioxidant effects of the ethanolic extract of the leaves of *E. grandiflorus* and hexane (HexFr), chloroform (ChlFr) and n-butanolic fractions (ButFr) in isolated perfused mesenteric beds. Initially, the ethanolic extract was obtained from *E. grandiflorus* leaves (EEEG), followed by liquid-liquid fractionation and high-performance liquid chromatography analysis of the obtained preparations. EEG and ButFr showed a significant concentration of phenolic compounds and flavonoids with values significantly higher than those found in HexFr and ChlFr fractions. These compounds were identified as caffeic acid, p-coumaric acid, ferrulic acid and luteolin. Subsequently, the vasodilating effects of EEG and hexane, chloroform and n-butanolic fractions were evaluated in the beds and the preparation with the best effect was used for analyzes of *in vitro* mechanism in the beds. ButFr reduced the perfusion pressure in concentration-dependent isolated mesenteric beds. The removal or inhibition of endothelial nitric oxide and prostaglandin synthase by L-NAME associated with indomethacin inhibited the vasodilatory effects induced by EEG and ButFr. In addition, the combination of atropine and HOE-140 completely inhibited EEG and ButFr-induced vasodilation. Infusion with nutrient solution containing 40 mM KCl inhibited the vasodilator effect of all EEG and ButFr doses. Finally, treatment with tetraethylammonium completely blocked EEG or ButFr induced vasodilation. This study showed that EEG and ButFr have important vasodilatory effects on the mesenteric arterial beds. Apparently, these effects are dependent on the endothelial and B₂ bradykininergic M₃ muscarinic receptors, inducing the release of nitric oxide and prostacyclin, followed by activation of the sodium and potassium channels in vascular smooth muscle. This study opens perspectives for the use of EEG or ButFr in situations where the reduction of perfusion pressure is necessary.

Keywords: Alismataceae; arteriolar tone; nitric oxide; prostaglandins; vasodilation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Endotélio	16
2.2 Pressão Arterial	16
2.3 Tratamento medicamentoso	17
2.3.1 Efeitos adversos	18
2.4 Doença Cardiovascular	19
2.5 Hipertensão Arterial Sistêmica	20
2.5.1 Fatores de risco	20
2.5.1.1 Idade	20
2.5.1.2 Sexo e raça	21
2.5.1.3 Excesso de peso e obesidade	21
2.5.1.4 Excesso de sal	22
2.5.1.5 Ingestão de álcool	22
2.5.1.6 Sedentarismo	22
2.5.1.7 Cessação do tabagismo	23
2.5.2 Tratamento	23
2.6 Produtos naturais	23
2.7 <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham & Schltl.) Micheli	26
2.7.1 Composição química da espécie	28
2.7.2 Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos	28
2.7.3 Aspectos Farmacológicos	29
3 OBJETIVOS	32
3.3.1 Objetivo geral	32
3.3.2 Objetivos específicos	32
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5 APÊNDICES	42
5.1 Artigo 1 Endothelium-dependent effects of <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltl.) Micheli mediated by M ₃ -muscarinic and B ₂ -bradykininergic receptors on peripheral vascular resistance and its modulatory effects on calcium-activated potassium channels in mesenteric vascular beds	43

6 ANEXOS	66
6.1 Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais	67

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam um dos maiores problemas de saúde pública não só nos países desenvolvidos, mas também nos países em desenvolvimento. De acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2011) o número de adultos hipertensos aumentou mais de 400 milhões em três décadas, sendo que 1 em cada 5 indivíduos no mundo tem pré-hipertensão e 25% dos adultos com idade superior a 25 anos é hipertenso, representando um problema global de saúde pública. Dados do Ministério da Saúde mostram que no Brasil, cerca de 30% dos óbitos estão relacionados às doenças cardiovasculares (BRASIL, 2011a). Segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) (BRASIL, 2017) o percentual de adultos (≥ 18 anos) que referiram diagnóstico médico de hipertensão arterial na capital do Mato Grosso do Sul, foi 26,3%, sendo a maioria mulheres.

Embora existam fármacos anti-hipertensivos, como diuréticos, β -bloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio e inibidores da enzima conversora de angiotensina, que são eficazes no controle da pressão arterial, eles têm seus efeitos colaterais. Fraqueza, câimbras, hipovolemia, disfunção erétil, tosse seca, hipopotassemia e intolerância à glicose são apenas alguns dos efeitos adversos possíveis. As plantas medicinais naturais podem ser fontes úteis para o desenvolvimento de agentes eficazes para hipertensão e distúrbios cardíacos hipertensivos (AISA, *et al.*, 2017).

A utilização de plantas medicinais faz parte da cultura popular desde a antiguidade. Muitos dos medicamentos que hoje são utilizados para tratamento, são provenientes de extratos vegetais. O uso da medicina tradicional e das plantas medicinais, em países em desenvolvimento, tem sido amplamente indicado para a manutenção da saúde (SOFOWORA, *et al.*, 2013). A Organização Mundial de Saúde estima que 3,5 bilhões de pessoas, façam uso de medicamentos derivados de plantas no tratamento de várias doenças.

Vários estudos farmacológicos pré-clínicos têm apresentado *Echinodorus grandiflorus* como uma espécie promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares. Dados disponíveis mostraram que diferentes preparações obtidas da espécie poderiam apresentar efeito diurético (PRANDO, *et al.*, 2015; 2016), anti-edematoso (GARCIA, *et al.*, 2010), anti-hipertensivo (PRANDO, *et al.*, 2016; LESSA, *et al.*, 2008) e efeitos vasodilatadores (TIBIRIÇÁ, *et al.*, 2007).

Contudo os mecanismos moleculares envolvidos em suas atividades vasculares permanecem obscuros. Assim, o leito arterial mesentérico perfundido foi utilizado para avaliar

a hipótese de que o extrato etanólico e as frações obtidas das folhas de *E. grandiflorus* também reduzem a resistência vascular periférica, um efeito que pode contribuir para os efeitos cardiovasculares dessa espécie. Além disso, os mecanismos envolvidos nos efeitos vasculares da fração com maior atividade também foram investigados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endotélio

O endotélio vascular até a década de 80 era considerado, uma barreira estrutural com papel de dividir a parede do vaso sanguíneo e a cavidade interna, todavia pesquisas demonstraram ser um órgão endócrino responsável por vários agentes vasoativos incluindo vasodilatadores, como óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio, e vasoconstritores, como endotelina 1, angiotensina II e tromboxano A2 (VANE *et al*, 1990).

O interior dos vasos sanguíneos, artérias, veias e as câmaras do coração, é revestido por uma camada única de células endoteliais (LE BROCCQ *et al*, 2008) capazes de proteger os tecidos e o sangue circulante (VERM *et al*, 2003) atuando com função autócrina e/ou parácrina dependendo do estímulo ao qual é exposto (MARUHASHI *et al*, 2018). Além disso, o órgão realiza papel fundamental no controle da homeostasia da vasculatura, atuando na regulação de sinais intracelulares, (LE BROCCQ *et al*, 2008), cascata de coagulação e angiogênese (SHWEIKI *et al*, 1992), permeabilidade e tonicidade vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) entre outros.

Desse modo, pesquisas com metodologias que mimetizam a função endotelial em humanos tem sido têm sido realizada com o objetivo de avaliar a atuação endotelial na fisiopatologia dos problemas cardiovasculares e os riscos associados a eles (LUDMER *et al*, 1986; CELERMAJER *et al*, 1992; KUVIN *et al*, 2003; IDEI *et al*, 2013). Estas técnicas medem a capacidade da artéria se dilatar em resposta à infusão intra-arterial de vasodilatadores dependentes do endotélio ou hiperemia reativa através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, que não demonstraram ser o mediador da vasodilatação (MARUHASHI *et al*, 2018).

2.2 Pressão Arterial

A pressão arterial (PA) é definida como a pressão que o sangue exerce contra a parede das artérias e é dada pelo resultado do débito cardíaco e resistência vascular periférica. Ou seja, são obtidas duas pressões, a máxima ou sistólica (PAS) que acontece com a contração do coração e, a mínima ou diastólica (PAD) que ocorre com o relaxamento. O valor de referência da pressão cardíaca é 120/80 mm Hg (SBC, 2016). As lesões de órgãos-alvo (LOA) e doenças

associadas devem ser investigadas. Os valores de referência de acordo com a classificação da pressão arterial estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação da pressão arterial de acordo com a aferição casual ou no consultório a partir dos 18 anos de idade

Classificação	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Normal	≤ 120	≤ 80
Pré-hipertensão	121-139	81-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Quando a PAS e a PAD situam-se em categorias diferentes, deve-se classificar de acordo com a maior.		

Considera-se hipertensão sistólica isolada se PAS ≥ 140 e PAD < 90, devendo a mesma ser classificada em estágios 1, 2, e 3.

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016

O débito cardíaco é determinado pelo volume sistólico e frequência cardíaca e, é influenciado pelo volume sanguíneo e pelo sistema nervoso autônomo (MAYET; HUGHES, 2003). Enquanto a resistência vascular é dependente do diâmetro vascular, que por sua vez sofre influência da inervação simpática e fatores endócrinos, como vasoconstritores e vasodilatadores, com destaque para o óxido nítrico (NO), formado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A ativação simpática proporciona o aumento da secreção de renina pelas células justa-glomerulares (KURTZ, 2011), aumento da frequência cardíaca e contratilidade através dos receptores β_1 e aumento da resistência vascular através dos receptores α_1 , enquanto a ativação parassimpática leva à diminuição da frequência cardíaca pelos receptores M2 (SEIDEL; SCHOLL, 2017).

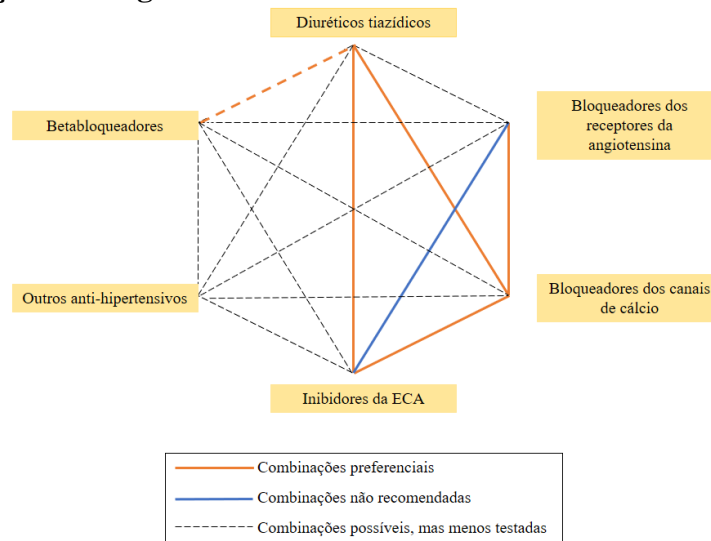
Uma rede de receptores monitora os níveis pressóricos, podendo ocasionar uma elevação da liberação de vasopressina (ADH) do hipotálamo, assim como alterações na atividade simpática e parassimpática. Gerando um controle da PA por mecanismos de curto ou longo prazo (GUYTON, 1972). O órgão mais importante no controle da pressão a longo prazo é o rim (GUYTON, 1991) através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), apoiado pelo fato de ser alvo de drogas anti-hipertensivas de primeira linha, como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonistas dos receptores de angiotensina 1 (JAMES *et al*, 2014).

2.3 Tratamento medicamentoso

O tratamento medicamentoso para HAS pode se basear em monoterapia ou associação de diferentes medicamentos (Figura 1). Inicialmente, é preferível as classes de diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) e bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II (CHENG, *et al*, 2017; DORRESTEIJN, *et al*, 2013).

De acordo com a SBC (2016) um medicamento para ser indicado deverá, preferencialmente quando tiver demonstrado a capacidade de reduzir a morbimortalidade CV, for eficaz por via oral e bem tolerado, quando puder ser utilizado no menor número de ingestão de comprimido por dia e iniciado com as menores doses efetivas, além de poder ser usado em associação. Deve também ser passível de ser utilizado por um período mínimo de quatro semanas, antes de modificações, salvo em situações especiais e com controle de qualidade em sua produção.

Figura 1 – Esquema preferencial de associação de medicamentos, de acordo com mecanismos de ação e sinergia



Fonte: Adaptado de Journal of Hypertension, 2007 *apud* Brasil, 2016

2.3.1 Efeitos adversos

Apesar dos benefícios estabelecidos com o tratamento anti-hipertensivo, os efeitos adversos também têm sido documentados, ainda que na maior parte dos casos a HAS possa ser tratada com segurança, os resultados indesejáveis são relativamente frequentes e são capazes de afetar de forma considerável a qualidade de vida dos indivíduos que fazem uso da medicação

(CURB, *et al*, 1985). Os principais efeitos adversos associados as classes dos medicamentos consistem em fraqueza, hipovolemia, câimbras, disfunção erétil, intolerância à glicose, broncoespasmo, hipopotassemia e hipomagnesemia, bradicardia, sonolência, sedação, boca seca, fadiga (SBC, 2016).

2.4 Doença Cardiovascular

De acordo com a World Health Organization (WHO, 2017) as doenças cardiovasculares (DCV) são caracterizadas por um grupo de distúrbios no coração e vasos sanguíneos, sendo eles:

- a) Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS);
- b) Doença Arterial Coronariana (DAC);
- c) Doença Cerebrovascular (DC);
- d) Doença Arterial Periférica (DAP);
- e) Insuficiência Cardíaca (IC);
- f) Doença Cardíaca Reumática (DCR);
- g) Doença Cardíaca Congênita (DCC);
- h) Cardiomiopatias.

As DCV são a principal causa de morte mundial. Em 2015 levou a óbito cerca de 17,7 milhões de pessoas, representando mais de 30% dos valores globais, sendo que a DAC foi responsável por mais de 40% e os acidentes vasculares cerebrais (AVC) por mais de 35%. No Brasil, o problema também é a maior causa de mortes, totalizando 20% dos casos, especialmente em indivíduos maiores de 30 anos, devido ao descontrole dos fatores de risco (MANSUR; FAVARATO, 2012; FORD, *et al*, 2007). Segundo Mansur et al (2016) a cada 100 mil habitantes, 372 pessoas morreram por DCV em 2012, sendo que no Mato Grosso do Sul, a cada 100 mil habitantes, 274,3 morrem dessa doença (BRANT, *et al*, 2017) e em Dourados, as doenças do sistema circulatório levaram a mortalidade de 28,3% em 2008 (BRASIL, 2011a).

Grande parte das DCV poderiam ser evitadas, se houvesse prevenção dos fatores de risco comportamentais, como dieta inadequada, excesso de peso, sedentarismo, uso de tabaco e consumo excessivo de álcool. Além disso, deve-se fazer o controle medicamentoso de doenças que representam risco de infartos e AVC, como diabetes, hipertensão arterial e dislipidemia (WHO, 2017).

Existem outros fatores que induzem a riscos de desenvolvimento de DCV, que são reflexos do ambiente social, econômico e cultural, como pobreza, estresse, envelhecimento da população, urbanização e fatores hereditários (WHO, 2017).

2.5 Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), usualmente conhecida como pressão alta, é um quadro clínico multifatorial definido pelo aumento dos níveis de pressão ≥ 140 e/ou 90 mm Hg. A elevação constante dos níveis pressóricos afeta não apenas o coração, mas também cérebro e rins. A doença integra o grupo de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que caracterizam a síndrome metabólica, assim como a dislipidemia, obesidade, intolerância à glicose e diabetes mellitus, causando alterações funcionais e/ou estruturais nos órgãos-alvo (LEWINGTON, *et al*, 2003; WEBER, *et al*, 2014).

A HAS age de forma independente na morte súbita, acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), IC, DAP e doença renal crônica (DRC), fatal e não fatal (SBC, 2016). Somente na última década o número de pessoas diagnosticadas como hipertensão aumentou 14,2% (BRASIL, 2017), sendo que 32% de indivíduos adultos e mais de 60% dos idosos são hipertensos, contribuindo em mais da metade dos óbitos por DCV (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015). De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016) os casos de óbito têm diminuído ao longo dos anos, exceto por doenças hipertensivas que aumentou entre 2002 e 2009.

2.5.1 Fatores de risco

Em todo o mundo, estima-se que a HAS a cause 7,5 milhões de mortes, correspondendo cerca de 12,8% do total de todas as mortes (WHO, 2018a), por isso o controle dos fatores de risco é necessário para prevenir esse desfecho. As situações que influenciam no desenvolvimento da doença acontecem isoladas ou em conjunto, que podem ser modificáveis como excesso de peso e obesidade, ingestão de sal, consumo de álcool, inatividade física, tabagismo, fatores socioeconômicos ou em causas que não se pode evitar como idade, sexo, etnia e genética.

2.5.1.1 Idade

Existe associação direta com o processo de envelhecimento e a prevalência de pressão alta, como consequência da rigidez arterial, porque com o passar dos anos naturalmente ocorrem mudanças estruturais e funcionais nos vasos (MEEKS, 2002). Com o aumento da expectativa de vida da população e, conseqüentemente do número de idosos nos últimos anos (IBGE, 2010) observa-se aumento dos casos de hipertensão, estudos demonstram que mais de 90% dos indivíduos que estão livres de hipertensão aos 55 anos de idade irão desenvolver a doença durante o restante da vida útil (LIONAKIS, *et al*, 2012). Uma revisão sistemática com meta-análise realizada por Picon, *et al* (2013) com mais de 13 mil indivíduos idosos no Brasil, demonstrou que 68% deles são hipertensos.

2.5.1.2 Sexo e raça

De acordo com a WHO (2018a) a prevalência de HAS em ambos os sexos foi mais maior na África (46%) e, a menor prevalência ocorreu na região das Américas (35%). Contudo, nessa região houve diferença significativa entre a prevalência da doença nos homens (39%), enquanto que nas mulheres (32%). Em todas as regiões da WHO, os homens têm uma prevalência ligeiramente maior de pressão arterial elevada do que as mulheres.

No entanto, dados mostram que a elevação da pressão arterial é mais frequente nas mulheres, após o período de menopausa, quando a produção de estrógenos, alteração dos níveis lipídicos, ganho de peso e sedentarismo começam a mudar o quadro cardioprotetor (GORGUI, *et al*, 2014). De acordo com pesquisa brasileira realizada no pelo Vigitel, a prevalência de HAS auto referida em indivíduos brasileiros com 18 aos ou mais, é maior entre o sexo feminino (27,5%) e entre os negros (49,3%), seguidos pelos pardos (38,2%) e brancos (30,3%) (PICON *et al*, 2013) (BRASIL, 2017).

2.5.1.3 Excesso de peso e obesidade

A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016, no geral, cerca de 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos em 2016 (WHO, 2018b). O excesso de peso, especialmente quando associado ao aumento da adiposidade visceral, é uma das principais causas da HAS representando 65-75% das causas primárias. Estudos clínicos indicam que a manutenção de um índice de massa corporal <25 kg/m² é efetiva na prevenção primária da hipertensão e que a perda de peso reduz a PA na maioria dos pacientes hipertensos (HALL, *et al*, 2015).

Os mediadores da função renal anormal e o aumento da pressão arterial durante o desenvolvimento da hipertensão na obesidade incluem 1) compressão física dos rins pela gordura e ao redor dos rins, 2) ativação do SRAA) e 3) aumento atividade do sistema nervoso simpático (HALL, *et al*, 2014).

2.5.1.4 Excesso de sal

O consumo aumentado de sódio, comum entre os brasileiros, é responsável pela retenção hídrica e conseqüentemente o aumento do fluxo sanguíneo, associando-se diretamente a eventos cardiovasculares e renais (HE; MACGREGOR, 2010; ZHAO *et al*, 2011). O aumento da reabsorção de sódio tubular renal prejudica a pressão da natriurese e desempenha um papel importante no início da hipertensão da obesidade.

2.5.1.5 Ingestão de álcool

A ingestão crônica de bebidas alcoólicas eleva os níveis pressóricos de forma consistente (KLATSKY; FRIEDMAN; ARMSTRONG, 1986; BRIASOULIS; AGARWAL; MESSERLI, 2012). De acordo com Singh, *et al* (2017) embora o consumo de álcool não tenha sido significativamente associado ao estado da hipertensão, a taxa de hipertensão foi maior entre os usuários de álcool.

2.5.1.6 Sedentarismo

Existe atualmente no mundo uma pandemia de inatividade física que se associam a 5,3 milhões de mortes por ano (LEE, *et al*, 2012) e que representam um fator de risco para o desenvolvimento de DCNT's. Diretrizes atuais recomendam o aumento da atividade física como forma de prevenir e controlar a hipertensão. Com base nessas estimativas, a inatividade física contribuiu para 1 a 4% do total dos custos diretos com assistência médica (DING DING, *et al*, 2016).

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) apontam que indivíduos insuficientemente ativos (adultos que não atingiram pelo menos 150 minutos semanais de atividade física considerando o lazer, o trabalho e o deslocamento) representaram 46,0% dos adultos, sendo o percentual significativamente maior entre as mulheres (51,5%). Houve diferença nas frequências de insuficientemente ativos entre faixas etárias, com destaque para

idosos (62,7%) e para adultos sem instrução e com nível de escolaridade fundamental incompleto (50,6%) (MALTA, *et al*, 2015).

2.5.1.7 Cessação do tabagismo

De forma aguda, o tabagismo eleva os níveis pressóricos devido ao estímulo do sistema nervoso simpático, enquanto que de forma crônica a literatura ainda não estabelece de forma clara uma relação direta entre esses dois fatores (VIRDIS, *et al*, 2010). No entanto o hábito de fumar afeta o controle da doença (DE GIUSTI, *et al*, 2012), quando há desconhecimento do quadro (GUESSOUS, *et al*, 2012) e quando existe interrupção do tratamento medicamentoso (MION, *et al*, 2010).

2.5.2 Tratamento

A abordagem terapêutica da PA elevada inclui medidas não medicamentosas e o uso de fármacos anti-hipertensivos, a fim de reduzir a PA, proteger órgãos-alvo, prevenir desfechos CV e renais (MANCIA, *et al*, 2013; JAMES, *et al* 2014). Medidas não medicamentosas têm se mostrado eficazes na redução da PA, apesar de limitadas pela perda de adesão a médio e longo prazo. A decisão terapêutica deve basear-se não apenas no nível da PA, mas considerar também a presença de fatores de risco, LOA e/ou DCV estabelecida.

De acordo com a SBC o tratamento não medicamentoso da pressão alta baseia-se em controle do peso corporal, atividades físicas regulares, medidas nutricionais, como a dieta *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), abandono do tabagismo, controle do estresse (SBC, 2016). Porém alternativas baseadas em produtos naturais podem auxiliar no tratamento da HAS.

2.6 Produtos naturais

Os usos mais antigos relatados sobre medicina e plantas medicinais advém da China e Egito (ASSAD, 2005), mas a função terapêutica de produtos naturais é conhecida desde a mais remota antiguidade. Até o início do século XIX as plantas e seus extratos eram largamente utilizados como recurso para tratamento pela medicina convencional. De acordo com Atanasov e colaboradores (2015) o desenvolvimento da indústria farmacêutica proporcionou diversos medicamentos com funções semelhantes aos compostos de plantas medicinais.

A procura por novas alternativas aumentou a busca por plantas medicinais na última década como substituição de produtos sintéticos (FRISHMAN, *et al*, 2009; SUSALIT, *et al.*, 2011; TABASSUM; AHMAD, 2011). Nos países desenvolvidos 70% das pessoas procuram tratamento na Medicina Complementar e Alternativa (CAM) e esses números tem aumentado segundo a WHO (2008).

A justificativa para o uso desses produtos não é surpreendente, considerando que eles contêm diversos de componentes bioativos com aplicações terapêuticas (PAN, *et al*, 2013). Na verdade, produtos naturais realmente forneceram um ponto de partida para a síntese de mais de 50% dos medicamentos farmacêuticos atualmente utilizados (PAN, *et al*, 2013).

A efetividade desses produtos não pode ser negligenciada, uma vez que medicamentos utilizados atualmente tiveram como ponto de partida plantas, como por exemplo a efedrina (de *Ephedra sinica*), aspirina (de *Salix alba*), reserpina (de *Rauwolfia serpentina*) e taxol (de *Taxus brevifolia*) (FRISHMAN, *et al*, 2009). Vale lembrar que os fitoterápicos são fundamentais em práticas tradicionais como medicina chinesa, ayurvéida e unani tibb. No Brasil algumas espécies já são descritas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, com referência sobre o modo de preparo, indicações e contra-indicações e descritas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennis). Os produtos naturais com indicação diurética e anti-hipertensiva estão descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Anti-hipertensivos e diuréticos de acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira

Produto	Nome popular	Modo de usar	Indicações	Contraindicações
<i>Allium sativum</i> L.	Alho	Tintura	Coadjuvante no tratamento de hiperlipidemia, hipertensão arterial leve, dos sintomas de gripes e resfriados e auxiliar na prevenção da aterosclerose	Não usar em pessoas com gastrite, úlceras gastroduodenais, hipotensão arterial e hipoglicemia. Não usar em casos de tratamento com anti-hipertensivos e warfarina. Não usar em casos de hemorragia e tratamento com anticoagulantes
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burt & Smith	Colônia	Tintura	Diurético e anti-hipertensivo nos casos de hipertensão arterial leve	Não usar em gestantes, lactantes, lactentes, crianças menores de dois anos, alcoolistas e diabéticos. No tratamento com o extrato hidro alcoólico foi observado o aumento de transaminases e HDL
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	Chapéu-de-couro	Infusão	Diurético leve e anti-inflamatório	Não usar em pessoas com Insuficiências renal e cardíaca. Não utilizar em caso de tratamento com anti-hipertensivos.
<i>Arctium lappa</i> L.	Bardana	Decocção	Antidispéptico, diurético e anti-inflamatório	Doses excessivas podem interferir na terapia com hipoglicemiantes. Deve ser evitado o uso durante a gravidez e lactação.
<i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg	Dente-de-leão	Infusão	Antidispéptico, aperiente e diurético	Não usar em pessoas com gastrite, úlcera gastroduodenal, cálculos biliares, obstrução dos ductos biliares e do trato intestinal. O uso pode provocar hipotensão arterial.
<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra	Tintura	Antidispéptico, antiflatulento, antiemético, diurético e antiaterosclerótico. Coadjuvante no tratamento de hipercolesterolemia leve a moderada e da síndrome do intestino irritável	Não usar em gestantes, lactantes, crianças menores de dois anos, alcoolistas, diabéticos e pessoas com cálculos biliares e obstrução dos ductos biliares. Não usar em caso de tratamento com anticoagulantes. Evitar o uso em pessoas com hipersensibilidade à alcachofra ou plantas da família Asteraceae. Em casos raros podem ocorrer distúrbios gastrintestinais, incluindo diarreia, náuseas e pirose
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Quebra-pedra	Tintura	Litíase urinaria e diurético	Não utilizar em gestantes. Concentrações acima das recomendadas podem causar diarreia e hipotensão arterial.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2011b

2.7 *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli

No Brasil várias espécies medicinais são usadas com função diurética, entre elas a *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (Figura 2), pertencente à família Alismataceae, constituída de aproximadamente 14 gêneros e 80 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Dentre as espécies mais conhecidas e utilizadas no país estão a *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, as quais possuem características botânicas e propriedades medicinais semelhantes e são denominadas de “chapéu-de-couro” (VAZ, 2015).

Figura 2 – *Echinodorus grandiflorus* em seu habitat natural



Fonte: o autor (2018)

A *E. grandiflorus* é nativa do sul do México até o Brasil e, encontradas em regiões alagadas e de solo úmido (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2016) com folhas simples, coriáceas, cordiformes, com base cordada e ápice agudo a arredondado submersas, flutuantes ou emergentes e inflorescências que duram aproximadamente 30 dias (Figura 3 e 4) (BRASIL, 2010).

Figura 3 – Folha de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schtdl.) Micheli



Fonte: o autor (2018)

Figura 4 – Exsicata da folha de *E. grandiflorus*



Fonte: o autor (2018)

A espécie é identificada por vários sinônimos: *Alisma grandiflorum* Cham. et Schlecht., *Alisma floribundum* Seub., *E. argentinensis* Rataj, *E. sellowianus* Buchenau, *E. floribundus* (Seub.) Seub., *E. grandiflorus* var. *aureus* Fassett, *E. muricatus* Griseb., *E. grandiflorus* var. *longibracteatus* Rataj, *E. grandiflorus* var. *ovatus* Micheli, *E. longicapus* Arechav., *E. muricatus* Griseb., *E. muricatus* Wood. et Schery (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2016). Popularmente é conhecida como: “chapéu-de-couro, aguapé, chá-de-campanha, chá-do-

brejo, chá-de-pobre, chá-mineiro, congonha-do-brejo, erva-do-brejo, erva-do-pântano” (LORENZI; MATOS, 2008).

2.7.1 Composição química da espécie

Tanaka *et al* (1997) em seu estudo isolaram o ácido equinóico, um metabólito cembranóide que se encontra nas frações não polares das folhas da planta. Um estudo brasileiro em uma análise fitoquímica da fração hexânica demonstrou presença de ácido equinoico, enquanto orientina, isorientina, isovitexina e ácido ferúlico foram prevalentes nas frações polares da espécie (PIMENTA, *et al.*, 2002). A Farmacopeia Brasileira (2010) relata 2,8% de derivados do ácido o-hidroxicinâmico, expressos como verbascosídeo como conteúdo químico da *E. grandiflorus*, apesar da informação na literatura técnica que descreve o isolamento e a caracterização de uma ampla variedade de metabólitos secundários.

O espectro de metabólitos secundários encontrados em *E. grandiflorus* é bastante variado e influenciado principalmente pela área de coleta e técnicas de extração. Vários estudos fitoquímicos indicam a existência de múltiplas classes de metabólitos secundários em diferentes preparações obtidas desta espécie, especialmente compostos fenólicos, incluindo uma grande quantidade de flavonoides como isorientina, isovitexina, swertia-japonina, swertisina e ácidos fenólicos chicóricos, caféicos e ferúlicos, foram descritos em folhas de *E. grandiflorus* (GARCIA *et al*, 2010; MARQUES *et al*, 2017; BRUGIOLO *et al*, 2009, GARCIA *et al*, 2010, PRANDO *et al*, 2015).

2.7.2 Aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos

A espécie *E. grandiflorus* é amplamente utilizada como medicina tradicional no Brasil para fins primariamente relacionados à hipertensão (TIBIRIÇÁ, *et al.*, 2007; LORENZI; SOUSA, 2008; PRANDO, *et al.*, 2015), condições anti-inflamatórias (BEVILAQUA; NEDEL, 2003; DUTRA, *et al.*, 2006; BRUGLIOLO, *et al.*, 2011; DIAS, *et al.*, 2013; GARCIA, *et al.*, 2010, 2016b) e depuração corporal (CORREA, 1984; SILVA, *et al.*, 1994; ALVES, *et al.*, 2011). Além do efeito diurético moderado (BOTREL, *et al.*, 2006; PRANDO, *et al.*, 2015; PRANDO, *et al.*, 2016) frequentemente relatado pelos usuários desta espécie vegetal, é empregada pela população, também para infecção urinária, anemia, ácido úrico e laxante (CAETANO, *et al.*, 2014). Em estudo realizado por de Medeiros e colaboradores (2013) e Garlet e Irgang (2001) em uma revisão de estudos etnobotânicos, encontrou como outras aplicações para a espécie, como para afinar o sangue, cálculo renal, muco na bexiga, cistite, diabetes,

digestiva, doença de chagas, dor, perda de peso, inflamação, limpeza da pele, indigestão, problemas estomacais, problemas hepáticos, problemas na bexiga problemas e reumatismo. Além de efeitos antiaterosclerótico (LORENZI; SOUSA, 2008), contra doenças hepáticas, dores associadas a hérnia, problemas renais e atrite (LORENZI; MATOS, 2002) e, a infusão das raízes auxiliam em casos de inflamação da bexiga (LORENZI; MATOS, 2002).

2.7.3 Aspectos Farmacológicos

Devido ao aumento dos efeitos adversos de drogas sintéticas, a coadministração de outras drogas e os altos custos da farmacoterapia convencional, há um interesse crescente em usar plantas medicinais para serem usadas como medicina alternativa complementar no tratamento de diferentes doenças (MORADI *et al.*, 2016). Na literatura, extratos brutos e frações de folhas de *E. grandiflorus* mostraram propriedades potenciais úteis no tratamento de muitas condições. O material vegetal mais comum usado é composto pelas partes aéreas e folhas, que são geralmente usadas nas preparações medicinais (Quadro 3).

Quadro 3 – Estudos farmacológicos da *Echinodorus grandiflorus*

Preparação	Metodologia	Resultados	Referência
Extrato hidralcoólico das partes aéreas	Estudo sobre o efeito antinociceptivo e compostos marcadores selecionados em onze extratos de diferentes locais	O extrato demonstrou atividade antinociceptiva, presença de isovitexina e pode atuar em sinergia com os demais compostos ou não, como responsável pela atividade antinociceptiva.	STRADA, <i>et al.</i> , 2017
Extrato etanólico e hexânico das folhas	Os extratos foram utilizados em ensaios enzimáticos para avaliar seu potencial inibitório contra α -amilase, α -glicosidase e lipase, bem como seus antioxidantes e capacidades anti-glicação	O extrato etanólico inibiu a atividade da lipase e apresentou alta capacidade antioxidante e anti-glicação. Apresentam potencial para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 devido às suas atividades inibitórias mais altas contra a α -amilase, α -glicosidase e lipase, bem como pela capacidade antigênica e antioxidante.	FRANCO, <i>et al.</i> , 2017
Extrato etanólico das folhas	Os efeitos diuréticos do extrato etanólico por via oral foram comparados com hidroclorotiazida em um tratamento prolongado por 7 dias. O volume urinário, sódio, potássio, cloreto, conteúdo de bicarbonato, pH e densidade. Foram avaliados	O extrato etanólico causou um aumento na diurese comparável à droga hidroclorotiazida em ratos. A administração intraduodenal do extrato também foi capaz de induzir efeitos anti-hipertensivos hipotensivos e significativos em ratos.	PRANDO <i>et al.</i> , 2016

	em amostra coletada em 24 h por 7 dias.		
Extrato hidro alcoólico das folhas a 70%, fração enriquecida em flavonoides	Modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos. Camundongos previamente imunizados foram tratados por os com solução salina (grupo controle) e amostras 40 min antes e 3 e 6 h após o desafio com antígeno na articulação do joelho	O extrato etanólico e a fração rica em flavonoides contribuem para a diminuição do processo inflamatório, reduzindo significativamente o recrutamento de neutrófilos	GARCIA <i>et al.</i> , 2016b
Extrato etanólico das folhas	A avaliação da atividade diurética aguda dos extratos através da relação entre o fluxo sanguíneo cortical renal e o efeito hipotensivo utilizando ratos Wistar machos normotensos foi realizada nos modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	A fração de etanol também foi capaz de aumentar o fluxo sanguíneo renal e reduzir a pressão arterial e o estresse oxidativo em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	PRANDO <i>et al.</i> , 2015
Extrato aquoso das folhas	A atividade antioxidante foi avaliada em tecido hepático tratado com azida de sódio na presença ou ausência de extrato aquoso por ensaios de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.	A infusão de folhas pode prevenir danos aos lipídios e às proteínas induzidas pelo oxidante de azida de sódio	LUNARDI <i>et al.</i> , 2014
Extrato aquoso das folhas	Camundongos foram sensibilizados intraperitonealmente e desafiados por via nasal com ovalbumina. O tratamento com extrato foi iniciado no dia 32 e concluído no dia 40. Oito horas após as avaliações do último desafio, de soro, lavado broncoalveolar e tecido pulmonar foram realizados.	O tratamento oral com o extrato reduziu o número de células totais e eosinófilos em lavado broncoalveolar. Os níveis de mediadores da inflamação foram diminuídos no tecido pulmonar após um tratamento oral	BRUGIOLO <i>et al.</i> , 2011
Extrato hidro alcoólico das folhas a 50%	O extrato hidroalcoólico foi avaliado pela análise da densidade capilar estrutural e funcional da pele, músculo esquelético e coração em animais SHR. Ratos SHR receberam doses diferentes de extrato por 28 dias por gavagem.	Potenciais propriedades anti-hipertensivas e micro circulatórias	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2011
Extrato hidro alcoólico das folhas a 50% e 70%; extrato aquoso das folhas, fração	Efeito anti-edematogênico foi avaliado no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos	Inibição dos mediadores da biossíntese responsáveis pela inflamação. As frações enriquecidas em diterpenos e	GARCIA <i>et al.</i> , 2010

diclorometano, fracções enriquecidas contendo diterpenos, flavonoides, ácido hidroxicinâmico e ácido tartárico		flavonoides foram as amostras mais potentes. Uma inibição significativa foi observada pelo extrato hidro alcoólico 50% e 70%	
Extrato etanólico das folhas	Estudo anti-hipertensivo por injeção intraperitoneal de extrato em doses crescentes em ratos hipertensos	Efeito anti-hipertensivo significativo através de alterações na liberação de óxido nítrico (NO), e pela estimulação de receptores muscarínicos e fator ativador de plaquetas (PAF)	LESSA <i>et al.</i> , 2008
Extrato aquoso das folhas	Estudo do vasodilatador <i>in vitro</i> em anéis isolados de aorta de coelho e em rim isolado de coelho	O efeito de vasodilatação observado é dependente do endotélio, e o efeito mediado pelo receptor de NO e PAF	TIRIBIÇÁ <i>et al.</i> , 2007
Extrato metanólico	A atividade analgésica periférica foi demonstrada pela observação dos efeitos inibitórios em um teste de formalina	Propriedades analgésicas no sistema nervoso central e periférico	DUTRA <i>et al.</i> , 2006
Extrato aquoso das folhas a 10%	Extrato aquoso de folhas 10% foi diluído para 5% e administrado oralmente em camundongos na dose de 5% do peso do animal. O volume urinário foi verificado após 60, 120, 180 e 240 min.	Diurese significativa	CARDOSO <i>et al.</i> , 2003
Extrato metanólico, n-hexânico e aquoso das folhas	Atividade hipotensiva em ratos Wistar anestesiados com pentobarbital sob ventilação mecânica controlada em modelo de hipertensão induzido pela L-NAME	Efeito hipotensivo reversível e dose-dependente	BARROS, <i>et al.</i> , 1999
Extrato hidro alcoólico das folhas a 50%	Os ratos receberam doses orais de 40ml/ kg de extrato por gavagem.	Diurese significativa	RIBEIRO <i>et al.</i> , 1998
Extrato n-hexânico, metanólico e fração aquosa	Atividade hipotensiva em ratos Wistar anestesiados com pentobarbital sobre ventilação mecânica controlada em modelo de hipertensão induzido pela L-NAME	Efeitos hipotensores reversíveis e dose-dependentes significativos	PIRELLA <i>et al.</i> , 1998

Fonte: o autor (2018)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do extrato etanólico e frações, obtidas a partir das folhas de *E. grandiflorus*, na redução da resistência vascular periférica em modelo *in vitro*.

3.2 Específicos

Preparar extrato etanólico e frações hexânica, clorofórmica e n-butanólica a partir de folhas de *E. grandiflorus*;

Realizar a caracterização fitoquímica do extrato etanólico e frações de *E. grandiflorus*;

Avaliar os mecanismos responsáveis pelos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico perfundido isolado;

Avaliar possíveis efeitos vasodilatadores do extrato etanólico e frações hexânica, clorofórmica e n-butanólica nos leitos.

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas vasodilatadoras na melhor fração no tônus arteriolar mesentérico.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISA, R.; YU, Z.; ZHANG, X.; MAIMAITIYIMING, D.; HUANG, L.; HASIM, A.; JIANG, T.; DUAN, M. The Effects of Aqueous Extract from *Nardostachys chinensis* Batalin on Blood Pressure and Cardiac Hypertrophy in Two-Kidney One-Clip Hypertensive Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

ASSAD, A.L.D.; FERRO, A.F.P. Biodiversidade e sua utilização na Geração de Fitoterápicos. **Fármacos & Medicamentos**, v. 37, 2005.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E.M; LINDER,, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

BARROS, W. M. de. Efeito do extrato hidroetanólico dos rizomas da *Simaba ferrugínea* ST. Hil. (SIMAROUBACEAE), sobre o comportamento e reprodução de ratas da Linhagem Wistar. Tese de Doutorado. São Paulo-SP: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. 2007.

BARROS, Z.A; PIMENTA, D.S; FIGUEIREDO, M.R; TIBIRIÇA, E. Efeitos hemodinâmicos do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos normotensos e hipertensos. In: XVI Reunião Anual da FeSBE, 1999. Caxambú, MG. **Resumos da XVI Reunião Anual da FeSBE**, Caxambú, MG. p. 202.

BEVILAQUA, G. A. P; NEDEL, J. L. Caracterização morfofisiológica e padrões protéicos de genótipos de chapéu-de-couro. **Rev Bras Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 215-220, 2003

BOTREL, R. T, RODRIGUES, L. A.; GOMES, L. J.; CARVALHO, D. A.; FONTES, M. A. L. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Bot Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 143-156, Mar, 2006.

BRANT, L. C. C.; NASCIMENTO, B. R.; PASSOS, V. M. A.; DUNCAN, B. B.; BENSENÖR, I. J. M.; MALTA, D. C.; SOUZA, M. F. M.; ISHITANI, L. H.; FRANÇA, E.; OLIVEIRA, M. S.; MOONEY, M.; NAGHAVIL, M.; ROTH, G.; RIBEIRO, A. L. P. Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: estimativas do Estudo Carga Global de Doença. **Rev bras epidemiol.**, São Paulo, v. 20, supl. 1, p. 116-128, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011b. 126p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf Acesso em jan. 2018.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v.2, 904p. 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf> Acesso em dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. 2017. 160 p.

BRASIL. Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM Consolidação da base de dados de 2011. Coordenação Geral de Informações e Análise Epidemiológica – CGIAE. 2011a. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/Consolida_Sim_2011.pdf. Acesso em jan, 2018.

BRIASOULIS, A.; AGARWAL, V.; MESSERLI, F.H. Alcohol consumption and risk of hypertension in men and women: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Hypertens**, v. 14, n. 11, p.792-796, 2012.

BRUGIOLO, A.S.; ALVES, C.C.; GOUVEIA, A.C.; DIAS, A.T.; RODRIGUES, M.F.; PACÍFICO, L.G.; AARESTRUP, B.J.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; TEIXEIRA, H.C.; GAMEIRO, J.; FERREIRA A.P. Effects of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* on the immune response in ovalbumin-induced pulmonary allergy. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 106, n. 6, p. 481-488, 2011.

BRUGIOLO, S.S.S. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso liofilizado de chapéu-decouro (*Echinodorus grandiflorus*) em ratas prenhes. Tese de Doutorado. Juiz de Fora-MG: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

CAETANO, R. S; SOUZA, A. C. R; FEITOZA, L. F. O uso de plantas medicinais utilizadas por frequentadores dos ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho - RO. **Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014.

CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* [Cham. e Schl] Mitch., Alismataceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.84, n.1, p.5-7, 2003.

CASTELO BRANCO, A.C.S. DINIZ, M.F.F.M., ALMEIDA, R.N.A., SANTOS, H.B.S., OLIVEIRA, K.M. RAMALHO, J.A., DANTAS, J.G. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **R bras ci Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; GOOCH, V. M.; SPIEGELHALTER, D. J.; MILLER, O. I.; SULLIVAN, I. D.; LLOYD, J. K.; DEANFIELD, J. E.; Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, v.340, p. 1111–1115, 1992.

CHENG, C.J.; RODAN, A.R.; HUANG, C.L. Emerging Targets of Diuretic Therapy. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 102, n. 3, p.420-435, 2017.

CONCEIÇÃO, F. G. Efeitos anti-hipertensivos e microcirculatórios do extrato hidroalcoólico de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) em ratos espontaneamente hipertensos. Rio de Janeiro. 59p. **Msc in Sciences**. Trabalho de conclusão de curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro-RJ: Instituto Oswaldo Cruz. 2011.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.

CURB, J. D; BORHANI, N. O; BLASZKOWSKI, T. P; ZIMBALDI, N; FOTIU, S; WILLIAMS, W. Long-term Surveillance for Adverse Effects of Antihypertensive Drugs. **JAMA**, n.22, v. 253, p. 3263-3268, 1985.

DE GIUSTI, M; DITO, E; PAGLIARO, B; BUROCCHI, S; LAURINO, F. I; TOCCI, G. A survey on blood pressure levels and hypertension control in a sample of the Italian general population. **High Blood Press Cardiovasc Prev**, v. 10, n. 3, p. 129-135, 2012.

DE LUCA V.; SALIM, V.; ATSUMI, S.M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658–1661, 2012.

DE MEDEIROS, P. M; LADIO, A. H; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: a macroscale investigation based on available literature. **J Ethnopharmacol**, v. 150, n. 2, p. 720-746, 2013.

DING, D; LAWSON, K. D; KOLBE-ALEXANDER, T. L; FINKELSTEIN, E. A; KATZMARZYK, P. T; PRATT, W. V. M. The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. **Lancet**, v. 388, v. 10051, p. 1311-1324, 2016.

DORRESTEIJN, J.A.; SCHROVER, I.M.; VISSEREN, F.L.; SCHEFFER, P.G.; OEY P.L.; DANSER, A.H.; SPIERING, W. Differential effects of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition, sympathoinhibition and diuretic therapy on endothelial function and blood pressure in obesity-related hypertension: a double-blind, placebo-controlled cross-over trial. **J Hypertens.**, v. 31, n. 2, p.393-403,2013.

DUTRA, R.C.; TAVARES, C.Z.; FERRAZ, S.O.; SOUSA, O.V.; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Rev bras Farmacogn**, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.

FORD, E.S., AJANI, U.A.; CROFT, J.B.; CRITCHLEY, J.A.; LABARTHE, D.R.; KOTTKE T.E.; GILES, W.H.; CAPEWELL, S. Explaining the decrease in US deaths from coronary disease, 1980-2000. **N Engl J Med**, v. 35, n. 23, p.2388–2398, 2007.

FRANCO, R. R; SILVA CARVALHO, D; DE MOURA, F. B. R; JUSTINO, A. B, SILVA, H. C. G; PEIXOTO, L. G; ESPINDOLA, F. S. Evaluation of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activities of some medicinal plants used in type-2 Diabetes Mellitus and its anti-glycation and antioxidant roles. **J Ethnopharmacol**, v. 215, p. 140-146, 2017.

FRISHMAN, W.H.; BERAVOL, P.; CAROSELLA, C. Alternative and complementary medicine for preventing and treating cardiovascular disease. **Dis Mon**, v. 55, n.3, p. 121-199, 2009.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p.373-376, 1980.

GARCIA, E.D.E.F.; DE OLIVEIRA, M.A.; CANDIDO, L.C.; COELHO, F.M.; COSTA, V.V.; QUEIROZ-JUNIOR C.M.; BOFF, D.; AMARAL, F.A.; DE SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. Effect of the Hydroethanolic Extract from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and a Fraction Enriched in Flavone-C-Glycosides on Antigen-Induced Arthritis in Mice. **Planta Med**, v. 82, n. 5, p.407-413, 2016a.

GARCIA, E.D.E.F.; DE OLIVEIRA, M.A.; DOURADO, L.P.; DE SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. In Vitro TNF- α Inhibition Elicited by Extracts from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and Correlation with Their Phytochemical Composition. **Planta Medica**, v. 82, n. 4, p.337-343, 2016b.

GARCIA, E.F. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

GARLET, T. M. B; IRGANG, E. E. *Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, SP; v. 4, n.1, p. 9-18, 2001.

GORGUI J.; GORSHKOV, M.; KHAN, N.; DASKALOPOULOU, S.S. Hypertension as a risk factor for ischemic stroke in women. **Can J Cardiol**, v. 30, n. 7, p.774-782, 2014.

GUESSOUS, I; BOCHUD, M; THELER, J. M; GASPOZ, J. M; PECHERE-BERTSCHI, A. 1999-2009. Trends in prevalence, unawareness, treatment and control of hypertension in Geneva, Switzerland. **PLoS One**, v. 7, n.6, e39877, 2012.

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, p. 1813-1816, 1991.

GUYTON, A. C.; COLEMAN, T. G.; COWLEY, A. V. JR.; SCHEEL, K. W.; MANNING, R. D. JR.; NORMAN, R. A. JR. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **Am J Med**, v. 52, p. 584-594, 1972.

HALL, J.E.; CARMO, J.M.; SILVA, A.A.; JUNCOS, L.A.; WANG, Z.; HALL, M.E. Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 18, n.7, p.75-88, 2014.

HALL, J.E.; CARMO, J.M.; SILVA, A.A.; WANG, Z.; HALL, M.E. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 991-1006, 2015.

HE, F.J.; MACGREGOR, G.A. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 5, p. 363-82, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (BGE). Sinopse do censo demográfico, 2010. Disponível em <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/>>. Acesso em jan. 2018.

IDEI, N.; UKAWA, T.; KAJIKAWA, M.; IWAMOTO, Y.; FUJIMURA, N.; MARUHASHI, T.; MIKAMI, S.; MATSUMOTO, T.; KIHARA, Y.; CHAYAMA, K.; NOMA, K.; NAKASHIMA, A.; TAKAYANAGI, T.; MORIMOTO, H.; TSUJI, T.; HIGASHI, Y. A novel noninvasive and simple method for assessment of endothelial function: enclosed zone flow-mediated vasodilation (ezFMD) using an oscillation amplitude measurement. **Atherosclerosis**, v. 229, p. 324–330, 2013.

JAMES, P. A.; OPARIL, S.; CARTER, B. L.; CUSHMAN, W. C.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; HANDLER, J.; LACKLAND, D. T.; LEFEVRE, M. L.; MACKENZIE, T. D.; OGEDEGBE, O.; SMITH, S. C. JR.; SVETKEY, L. P.; TALER, S. J.; TOWNSEND, R. R.; WRIGHT, J. T. JR.; NARVA, A. S.; ORTIZ, E. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v. 311, p. 507-520, 2014.

JAMES, P.A.; OPARIL, S.; CARTER, B.L.; CUSHMAN, W.C.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; HANDLER J.; LACKLAND, T.; LEFEVRE, M.L.; MACKENZIE, T.D.; OGEDEGBE, O.; SMITH, S.C.JR.; SVETKEY L.P.; TALER, S.J.; TOWNSEND, R.R.; WRIGHT, J.T. JR.; NARVA, A.S.; ORTIZ, E. Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v. 311, n. 5, p.507-520, 2014.

KLATSKY, A.L.; FRIEDMAN, G.D.; ARMSTRONG, M.A. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. **Circulation**. v. 73, n. 4, p.628-36, 1986.

KURTZ A. Renin release: sites, mechanisms, and control. **Annu Rev Physiol**, v. 73, p. 377-399, 2011.

KUVIN, J. T.; PATEL, A. R.; SLINEY, K. A.; PANDIAN, N. G.; SHEFFY, J.; SCHNALL, R. P.; KARAS, R. H.; UDELSON, J. E. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. **Am Heart J**, v. 146, p. 168–174, 2003.

LE BROcq, M.; LESLIE, S. J.; MILLIKEN, P.; MEGSON, I. L. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 9, p. 1631-74, 2008.

LEE, I. M. SHIROMA, E. J.; LOBELO, F.; PUSKA, P.; BLAIR, S. N.; KATZMARZYK, P. T. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet**, v. 380, p. 219–229, 2012.

LESSA, M.A., ARAÚJO, C.V., KAPLAN, M.A., PIMENTA, D., FIGUEIREDO, M.R., TIBIRIÇÁ, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 22, n. 2, p.161–168, 2008.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH N, P.R.; COLLINS, R. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual bloodpressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, n. 9349, p.1903-13, 2002; Erratum in: *Lancet*. v. 61, n. 936, p.1060, 2003.

LIONAKIS, N; MENDRINOS, D; SANIDAS, E; FAVATAS, G; GEORGOPOULOU, M. Hypertension in the elderly. **World J Cardiol**, v. 4, n. 5, p. 135-147, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*, 2ª ed. Instituto Plantarum. São Paulo: Editora Nova Odessa. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUDMER, P. L.; SELWYN, A. P.; SHOOK, T. L.; WAYNE, R. R.; MUDGE, G. H.; ALEXANDER, R. W.; GANZ, P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N Engl J Med**, v. 315, p.1046–1051, 1986.

LUNARDI, R.F. In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, "leather hat," in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1451- 1462, 2014.

MALTA, D. C; ANDRADE, S. S; STOPA, S. R; PEREIRA, C. A; SZWARCOWALD, C. L, SILVA JR, J. B. Brazilian lifestyles: National Health Survey results, 2013]. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 24, n. 2, p. 217-226, 2015.

MANCIA, G.; FAGARD, R.; NARKIEWICZ, K.; REDÓN, J.; ZANCHETTI, A.; BÖHM, M.; CHRISTIAENS, T.; CIFKOVA, R.; DE BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; GALDERISI, M.; GROBBEE D.E.; JAARSMA, T.; KIRCHHOF, P.; KJELDSSEN, S.E.; LAURENT, S.; MANOLIS, A.J.; NILSSON, P.M.; RUILOPE, L.M.; SCHMIEDER, R.E.; SIRNES, P.A.; SLEIGHT, P.; VIIGIMAA, M.; WAEBER, B.; ZANNAD, F.; TASK FORCE MEMBERS. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J**, v. 34, n. 28, p.2159-219, 2013.

MANSUR, A.P.; FARAVATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: an update. **Arq Bras Cardiol**, v.99, n. 2, p.755–761, 2012

MANSUR, A.P.; FAVARATO, A.P. Tendências da Taxa de Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil, 1980-2012. **Arq Bras Cardiol**. 2016; [online].

MARQUES, A. M; PROVANCE, D. W; KAPLAN, M. A. C; FIGUEIREDO, M. R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food Chem Toxicol**, n. 109, pt 2, p. 1032-1047, 2017.

MARUHASHI, T.; KIHARA, Y.; HIGASHI, Y. Assessment of endothelium-independent vasodilation: from methodology to clinical perspectives. **J Hypertens**, 2018.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v. 89, p. 1104-1109, 2003.

MEEKS, W. M. Pathophysiology of hypertension in the elderly. **Semin Nephrol**, v. 22, n. 1, p. 65-70, 2002.

MION JR, D.; PIERIN, A. M. G.; BENSENOR, I. M.; MARIN, J. C. M.; COSTA, K. R. A; HENRIQUE, L. F. O.; ALENCAR, N. P.; COUTO, R. C.; LAURENTI, T. E.; MACHADO, T. A. O. Hipertensão arterial na cidade de São Paulo: prevalência referida por contato telefônico. **Arq Bras Cardiol.**, São Paulo, v. 95, n. 1, p. 99-106, 2010.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em jan, 2018.

PAN, S.H.; ZHOU, S.F.; GAO, S.H.; YU, Z.L.; ZHANG, S.F.; TANG, M.K.; SUN, J.N.; MA, D.K.; HAN, Y.F.; FONG, W.F, KO, K.M. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **Evid Based Complement Alternat. Med.** 2013

PICON, R.V.; FUCHS, F.D.; MOREIRA, L.B.; FUCHS, S.C. Prevalence of hypertension among elderly persons in urban Brazil: a systematic review with meta-analysis. **Am J Hypertens**, v. 26, n. 4, p. 541-548, 2013.

PIMENTA, D.S. Contribuição a ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro) /Contribution the ecology, culture and validation of the use of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro). Tese de Doutorado. Rio de Janeiro-RJ: Instituto Oswaldo Cruz, 2002.

PRANDO, T.B.L.; BARBOZA, L.N.; ARAÚJO, V.O.; GASPAROTTO, F.M.; SOUZA, L.M.; LOURENÇO, E.L.L.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249-1258, 2016.

PRANDO, T.B.L.; BARBOZA, L.N.; GASPAROTTO, F.M.; ARAÚJO, V.O.; TIRLONI, C.A.S.; DE SOUZA, L.M.; LOURENÇO, E.L.L.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **J Ethnopharmacol.** v. 174, n. 4, p. 369-378, 2015.

RIBEIRO, R. D. E. A.; DE BARROS, F.; DE MELO, M. M.; MUNIZ, C.; CHIEIA, S.; WANDERLEY, M. G.; GOMES, C.; TROLIN, G.. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. **J Ethnopharmacol**, v. 24, n.1, p. 19-29, 1988.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Departamento de Hipertensão Arterial. VII Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Rev Bras Hipertens**, v. 107, n. 3, supl 3, 2016.

SCALA, L.C.; BRAGA, F.D.JR.; CASSANELLI, T.; BORGES, L.M.; WEISSHEIMER, F.L. Hipertensão arterial e atividade física em uma capital brasileira. **Arq Bras Cardiol**, v.88, n. 4, p. 452-457, 2015.

SCALA, L.C.; MAGALHÃES, L.B.; MACHADO, A. **Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica**. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2ª. ed. São Paulo: Manole; 2015. 5p.

SEIDEL, E.; SCHOLL, U. I.; Genetic Mechanisms of Human Hypertension and their Implications for Blood Pressure Physiology. **Physiol Genomics**, v. 49, n. 11, p. 630-652, 2017.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n. 6398, p. 843-845, 1992.

SICA, D.A. Diuretic-Related Side Effects: Development and Treatment. **J Clin Hypertens**, v. 6, n. 9, p. 532-544, 2004.

SINGH,S.; SHANKAR, R.; SINGH G. P. Prevalence and Associated Risk Factors of Hypertension: A Cross-Sectional Study in Urban Varanasi. **Int J Hypertens**, v. 2017, 2017.

SOFOWORA, A.E.O.; ONAYADE, A. The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 10, n. 5, p. 210-229, 2013.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STRADA, C. L.; LIMA, K. C.; SILVA, V. C.; RIBEIRO, R. V.; DORES, E. F. G. C.; DALL’OGLIO, E. L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; CARLOS A. CAROLLO, A. C.; MARTINS, D. T. O.; JÚNIOR, P. T. S. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. **Rev bras farmacogn.**, Curitiba, v. 27, n. 5, p. 619-626, 2017.

SUSALIT, E.; AGUS, N.; EFFENDI, I.; TJANDRAWINATA, R.R.; NOFIARNY, D.; PERRINJAQUET-MOCSETTI T.; VERBRUGGEN, M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. **Phytochemistry**, v. 18, n.4, p. 251-258, 2011.

TABASSUM, N.; AHMAD, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. **Pharmacogn Rev**, v. 5, n. 9, p. 30-40, 2011.

TANAKA, C. M. A.; RADKE, V. S. C. O.; SILVA, C. C. NAKAMURA, V.; OLIVEIRA, P. L.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A. Abietatrienes diterpenoids from *Sagittaria montevidensis* SSP *Montevidensis*. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, p. 30-32, 2010.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1547–1549, 1997.

TIBIRIÇÁ, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.; KAPLAN, M.A.; LESSA, M.A.; FIGUEIREDO, M.R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2007.

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

VAZ, M.S.M. Efeito anti-hiperuricêmico do extrato etanólico das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e avaliação do potencial genotóxico e mutagênico in vivo. Dissertação de Mestrado. Dourados-MS: Universidade Federal da Grande Dourados. 2015

VERMA, S.; BUCHANAN, M. R.; ANDERSON, T. J. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2054-2059, p. 2003.

VIRDIS, A; GIANNARELLI, C; NEVES, M. F; TADDEI, S; GHIADONI, L. Cigarette smoking and hypertension. **Curr Pharm Des**, v. 16, p.2518–2525, 2010.

WEBER, M.A.; SCHIFFRIN, E.L.; WHITE, A.; MANN, S.; LINDBOLM, L.H.; KENERSON J.G.; FLACK, J.M.; CARTER, B.L.; MATERSON, B.J.; RAM, C.V.; COHEN, D.L.; CADET, J.C.; JEAN-CHARLES R.R.; TALER, S.; KOUNTZ, D.; TOWNSEND, R.R.; CHALMERS, J.; RAMIREZ, A.J.; BAKRIS, G.L.; WANG, J.; SCHUTTE, A.E.; BISOGNANO, J.D.; TOUYZ, R.M.; SICA, D.; HARRAP, S.B. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **J Hypertens**, v. 32, n. 1, p.3-15, 2014.

WHO. World Health Organization. **Obesity and overweight**. 2018b. Disponível em: <<https://goo.gl/1bTpbL>>. Acesso em 01 de abril de 2018.

WHO. World Health Organization. **Global Healthy Observatory (data)**. Raised blood pressure, 2018a. Disponível em: <<https://goo.gl/3JhYpL>>. Acesso em 01 de abril de 2018.

WHO. World Health Organization. The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. World Health Organization, Geneva. 3:1–14. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: dez. 2017.

ZHAO, D.; QI, Y.; ZHENG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, X.Y.; LI, H.J.; LIU, H.H.; ZHANG, X.T.; DU, J.; LIU, J. Dietary factors associated with hypertension. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 8, p. 456-465, 2011.

5 APÊNDICE

Artigo 1: Phytomedicine

<https://www.elsevier.com/journals/phytomedicine/0944-7113/guide-for-authors>

Endothelium-dependent effects of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli mediated by M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors on peripheral vascular resistance and its modulatory effects on calcium-activated potassium channels in mesenteric vascular beds

Enaile Salviano de Carvalho^a, Cleide Adriane Signor Tirloni^a, Rhanany Alan Calloi Palozi^a, Maysa Isernhagen Schaedler^a, Lucas Pires Guarnier^a, Aniely Oliveira Silva^a, Jonas da Silva Mota^b, Cláudia Andréa Lima Cardoso^b, Márcio Eduardo Barros^a, Arquimedes Gasparotto Junior^{a*}

^a*Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil*

^b*Centro de Estudos em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil*

***Corresponding author at:** Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. Tel.: +55 (67) 3410-2333, Fax: +55 (67) 3410-2321.

E-mail address: arquimedesjunior@ufgd.edu.br (A. Gasparotto Junior).

Abstract

Background: *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli (Alismataceae) has been used as an antihypertensive and diuretic agent by several Brazilian native populations. Due to its wide use in Brazil, in 2010, the genus was included in the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia. It has been shown that the several extracts obtained from leaves of this species have important diuretic and hipotensive effects. Nevertheless, the secondary

31 metabolites responsible for this activity, as well as the molecular mechanisms responsible for
32 its effects on peripheral vascular resistance (PVR) remain unknown.

33 *Purpose:* To carry out a biomonitoring study to identify possible active metabolites present
34 in different *E. grandiflorus* extracts and evaluate the mechanisms responsible for the
35 vasodilatory effects on isolated perfused mesenteric beds.

36 *Methods:* First, the ethanolic extract was obtained from *E. grandiflorus* leaves (EEEE) and
37 a liquid-liquid fractionation was performed. EEEG and its resulting fractions were analyzed
38 by high-performance liquid chromatography. Then, the possible vasodilatory effects of
39 EEEG, Hexane (HexFr), chloroform (ChlFr), and *n*-butanolic (ButFr) fractions on perfused
40 arterial mesenteric vascular beds were evaluated. Finally, the molecular mechanisms
41 involved in the vasodilator responses of the *n*-butanolic fraction on the mesenteric arteriolar
42 tone were also investigated.

43 *Results:* In preparations with functional endothelium EEEG and ButFr dose-dependently
44 reduced the perfusion pressure in mesenteric vascular beds. Endothelium removal or
45 inhibition of nitric oxide and prostaglandin synthase by L-NAME plus indomethacin
46 inhibited the vasodilatory effects induced by EEEG and ButFr. In addition, association of
47 atropine plus HOE-140 fully inhibited EEEG and ButFr -induced vasodilation. Perfusion
48 with nutritive solution containing 40 mM KCl inhibited the vasodilatory effect of all EEEG
49 and ButFr doses. Finally, treatment with tetraethylammonium, a non-selective KCa (calcium-
50 activated) potassium channels blocker, completely blocked vasodilation induced by EEEG
51 or ButFr. *Conclusion:* This study showed that EEEG obtained from *E. grandiflorus* and its
52 *n*-butanolic fraction has important vasodilatory effects on MVBs. Apparently, these effects
53 are dependent on endothelial M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors inducing NO
54 and PGI₂ release followed by KCa K⁺ channels activation in the vascular smooth muscle.
55 This study opens perspectives for the use of EEEG or ButFr in situations where PVR
56 reduction is required.

57

58 **Keywords:** Alismataceae; arteriolar tone; nitric oxide; prostaglandins; vasodilation

59

60 **List of abbreviations**

61 4-AP: 4-aminopyridine; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline) sulfonic acid; ACh:
62 acetylcholine; ANOVA: analysis of variance; BHT: butylated hydroxytoluene; BK:
63 bradykinin; ButFr: *n*-butanol fraction; CaCl₂: calcium chloride; cAMP: cyclic adenosine
64 monophosphate; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; ChlFr: chloroform fraction; CO₂:
65 carbon dioxide; COX: cyclooxygenase; DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EDHF:
66 endothelium derived hyperpolarizing factor; EEEG: ethanolic extract from *E. grandiflorus*.
67 EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; ET-1:
68 endothelin; GLB: glibenclamide; GTP: guanosine triphosphate; HexFr: hexane fraction;
69 HPLC-DAD: high performance liquid chromatography – diode-array detector; IP₃: inositol
70 triphosphate; K⁺: potassium; KCl: potassium chloride; KH₂PO₄: monobasic potassium
71 phosphate; L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester; LC-MS: liquid chromatography-
72 mass spectrometry; MetFr: methanol fraction; MeOH: methanol; MgSO₄: magnesium
73 sulfate; MVB: mesenteric vascular bed; NaCl: sodium chloride; NaHCO₃: sodium
74 bicarbonate; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; O₂: oxygen; PGH₂: prostaglandin
75 H₂; PGI₂: prostacyclin; Phe: phenylephrine; PKA: protein kinase A; PP: perfusion pressure;
76 PSS: physiological saline solution; PVR: peripheral vascular resistance; SD: standard
77 deviation; SEM: standard error of the mean; sGC: soluble guanylyl cyclase; TEA:
78 tetraethylammonium; TXA₂: thromboxane; UV: ultraviolet.

79

80 **Introduction**

81 In recent years, the species *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli
82 (Alismataceae) has gained prominence in Brazil. The infusion of its leaves has been used as
83 antihypertensive and diuretic agent by different native populations in South America for
84 many years. In fact, due to its extensive ethnobotanical use in Brazil (Brugiolo et al., 2009;
85 Bolson et al., 2015), the genus *Echinodorus* was included as an important hypolipidemic and
86 diuretic agent according to the herbal form of Brazilian Pharmacopoeia (Brazil, 2010; 2011).

87 Several preclinical pharmacological studies have presented *E. grandiflorus* as a
88 promising species for the treatment of cardiovascular diseases. Available data have shown
89 that different preparations obtained from the species could present diuretic (Prando et al.,
90 2015; 2016), anti-edematous (Garcia et al., 2010), antihypertensive (Prando et al., 2016;
91 Lessa et al., 2008) and vasodilatory effects (Tibiriçá et al., 2007).

92 Currently, the main chemical constituents present in the species are known. Many
93 diterpenoids, alkaloids, saponins and tannins have been identified (Brugiolo et al., 2009,
94 Garcia et al., 2010). Moreover, phenolic compounds, mainly flavonoids C-glycosides
95 including isoorientin, isoorientin-O-rhamnoside, isoorientin-O-rhamnoside-dimethylether,
96 isoorientin 7,3'-dimethylether, swertiajaponin, swertiajaponin-O-rhamnoside, isovitexin,
97 isovitexin-O-rhamnoside, swertisin, and swertisin-O-rhamnoside have been recently
98 described (Prando et al., 2015; 2016).

99 Although different studies present *E. grandiflorus* as a promising agent in the
100 treatment of cardiovascular diseases, the molecular mechanisms involved in its vascular
101 activities remain unclear. So, the perfused mesenteric arterial bed was used to evaluate the
102 hypothesis that the ethanolic extract and semi-purified fractions obtained from *E.*
103 *grandiflorus* leaves also reduce peripheral vascular resistance, an effect that may contribute
104 to the cardiovascular effects of this species. In addition, the mechanisms involved in the
105 vascular effects of the semi-purified fraction with greater activity were also investigated.

106

107 **Materials and methods**

108 *Drugs and solvents*

109 The following drugs, salts and solutions were used: xylazine and ketamine
110 hydrochloride (from Syntec, São Paulo, SP, Brazil) and heparin (from Hipolabor, São Paulo,
111 SP, Brazil). Atropine, HOE-140, acetylcholine chloride (ACh), phenylephrine (Phe),
112 indomethacin, tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine (4-AP), glibenclamide, sodium
113 deoxycholate, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄,
114 CaCl₂, KH₂PO₄, dextrose, and ethylenediaminetetraacetic acid were obtained from Sigma-
115 Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were obtained in analytical grade.

116

117 *Phytochemical study*

118 *Plant material and preparation of the ethanolic extract*

119 *Echinodorus grandiflorus* leaves were collected on March 2017 in Dourados
120 (Brazil) at 436 m above sea level (S 22°12'10,6" and W 54°50'05,5"). A voucher specimen
121 was authenticated by Dr. Maria do Carmo Vieira under number DDMS 5470 and deposited
122 at the UFGD herbarium. Leaves were naturally dried for 2 days and then ground, yielding

123 1.0 kg of dry powder. The dried material was ground and extracted by maceration (1:4 w/v)
124 for 7 days using ethanol (92.8%) as solvent. The resulting solutions were concentrated on a
125 rotary evaporator yielding 116 g (11.6%) of ethanolic extract from *E. grandiflorus* leaves
126 (EEEG).

127

128 *Liquid-liquid fractionation of EEEG*

129 EEEG (84.75 g) was solubilized in 240 mL of methanol/water (8:2) and sequentially
130 partitioned with hexane (HexFr), chloroform (ChlFr) and *n*-butanol (ButFr). Semi-purified
131 fractions were concentrated and lyophilized. The resulting fractions showed the following
132 yields: HexFr (9.84 g), ChlFr (7.76 g), and ButFr (13.41 g).

133 *Phytochemical analysis and HPLC analysis*

134 *Content of phenolic compounds*

135 The content of phenolic compounds of extract and fractions (concentration of 1000
136 µg/mL in methanol) was determined. For analysis, 100 µL of sample, 1.5 mL of an aqueous
137 solution of 2% sodium carbonate, 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10 v/v), and 1 mL of
138 distilled water were used. Reading was performed after 30 min in spectrophotometer (700S
139 Femto) at wavelength of 760 nm (Djeridane et al., 2006). To calculate the content of phenolic
140 compounds, an analytic curve (1; 5; 10; 15; 30; 40 µg) was prepared using gallic acid as
141 standard. The result was expressed in mg of gallic acid per g of extract. All tests were
142 performed in triplicate.

143

144 *Total flavonoids*

145 The concentration of flavonoids was determined according to methodology proposed
146 by Lin and Tang (2007). For this, 500 µL of sample (concentration of 1000 µg/mL in
147 methanol) was mixed with 1.50 mL of methanol, 0.10 mL of 10% aluminum chloride, 0.10
148 mL of sodium acetate 1 mol/L and 2.80 mL of distilled water. After incubation for 40 min,
149 absorbance was measured at 415 nm in spectrophotometer (700S Femto). To calculate the
150 concentration of flavonoids, an analytic curve (0.1; 0.5; 1; 5; 10; 20 µg) using quercetin as

151 standard was prepared. The result was expressed in mg of quercetin per g of extract. All tests
152 were performed in triplicate.

153

154 *High-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detector (DAD)*
155 *analysis*

156 HPLC-DAD analysis of EEEG and fractions was conducted on Shimadzu device
157 equipped with conventional Phenomenex Gemini C18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m). We used a
158 binary mobile phase consisting of water, 6% acetic acid, and 2 mmol/L sodium acetate
159 (eluent A), and acetonitrile (eluent B) with the following gradients: 0 min 5% B, 42 min 15%
160 B, 52 min 50% B, 57 min 100% B, and 60 min 5% B. The flow rate was 1 ml.min⁻¹ at 25 °C.
161 Standards of caffeic acid, p-coumaric acid, ferrulic acid and luteolin (Sigma, \geq 97%) were
162 prepared at initial concentration of 1000 μ g/mL. The concentrations of compounds were
163 determined by extern calibration after appropriate dilutions in the range of 0.01-10 μ g/mL.
164 Analyses were performed in triplicate.

165

166 *Pharmacological study*

167 *'In vitro' antioxidant potential*

168 The antioxidant potential of EEEG and fractions was determined by the capture of
169 the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-
170 6-sulfonic acid (ABTS). For ABTS and DPPH assays, different concentrations of EEEG,
171 ButFr, HexFr and ChlFr fractions in methanol (10-100 μ g/mL) were used. In DPPH assay,
172 500 μ l of sample (EEEG and fractions) were added to 1 mL of DPPH solution that was
173 previous prepared and incubated for 30 min. Absorbance was recorded at 517 nm using
174 spectrophotometer (Fento 700S). In ABTS assay, 1980 μ L of diluted ABTS solution were
175 added to 20 μ L of sample (EEEG and fractions). Absorbance was recorded 6 min after initial
176 mixing at 734 nm using Fento 700S spectrophotometer. Assays were carried out in triplicate.
177 The inhibition percentage was determined using the following formula:

178 $(I\%) = (A_0 - A/A_0) \times 100$, where: A_0 is the absorbance of control, and A is the absorbance
179 of samples.

180 IC50 value was determined by linear regression. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used
181 as control in both assays.

182

183 *Animals*

184 Ten-week-old female Wistar rats weighing 230-250 g were randomized and housed
185 in plastic cages, with environmental enrichment, at 22 ± 2 °C under 12/12 h light dark cycle,
186 $55 \pm 10\%$ humidity conditions, and *ad libitum* access to food and water. All experimental
187 procedures were approved by Institutional Ethics Committee of UFGD (protocol number
188 35/2017) and conducted in accordance with the Brazilian Legal Standards on Scientific Use
189 of Animals.

190

191

192 *Isolation and perfusion of mesenteric vascular beds (MVBs)*

193 Female rats were anesthetized with ketamine and xylazine (100 and 20 mg/kg,
194 respectively, by the intraperitoneal route). MVBs were isolated and prepared using perfusion
195 methods described by McGregor (1965). First, the superior mesenteric artery was cannulated
196 and gently flushed with PSS (composition in mM: NaCl 119; KCl 4.7; CaCl₂ 2.4; MgSO₄
197 1.2; NaHCO₃ 25.0; KH₂PO₄ 1.2; dextrose 11.1; and EDTA 0.03) plus heparin (250 IU/mL)
198 to prevent blood clotting. After removal of the entire intestine, 10 mL of PSS were perfused
199 through the superior mesenteric artery, and the MVB was separated from the intestine. The
200 four main arterial branches from the superior mesenteric trunk running to the terminal ileum
201 were perfused. All other branches of the superior mesenteric vascular bed were tied off.
202 MVBs ($n = 5$) were placed in a water-jacketed organ bath and perfused (at 4 mL/min) with
203 PSS at 37 °C and gassed with 95% O₂/5% CO₂. Changes in perfusion pressure (PP, mm Hg)
204 were detected by a pressure transducer coupled to a PowerLab[®] recording system, and an
205 application program (Chart, v 4 .1; all from ADI Instruments; Castle Hill, Australia). After
206 equilibration (45 min), its integrity was checked by a *bolus* injection of KCl (120 mmol).
207 Then, to check the endothelial viability of preparations, different MVBs were continuously
208 perfused with PSS plus Phe (3 μM) to induce prolonged increase in perfusion pressure (PP).

209 Under these conditions, a *bolus* injection containing ACh (1 nmol) was performed, and the
210 PP reduction was measured.

211 In order to chemically remove the endothelium of MVBs, some preparations were
212 perfused with PSS containing sodium deoxycholate (1.8 mg/mL) for 30 seconds. Then, the
213 system was perfused with regular PSS for additional 40 minutes for stabilization. So, to
214 confirm loss of endothelial responsiveness, preparations were continuously perfused with
215 PSS plus Phe (3 μ M), and following sustained PP increase, a dose of ACh (1 nmol) was
216 directly applied into the perfusion system.

217

218 *Effects of E. grandiflorus extract and semi-purified fractions on arterial MVBs*

219 MVBs with or without functional endothelium were continuously perfused with PSS
220 plus Phe (3 μ M). After stabilization of PP increase, different preparations received bolus
221 injections containing EEEG, HexFr; ChlFr, and ButFr fractions (0.003, 0.01, 0.03, and 0.1
222 mg), and the PP reduction was measured. Each next dose was administered only after the
223 return of the perfusion pressure to the same level recorded before injection, with minimal
224 interval of 3 min between doses.

225

226 *Investigation of mechanisms involved in the vascular effects of ButFr from EEEG*

227 For these experiments, only the semi-purified fraction with the best activity in MVBs
228 (ButFr) was used. So, after recording the first dose-response curve to ButFr (0.01, 0.03, and
229 0.1 mg), MVBs were left to equilibrate for an additional period of 30-45 min. Then, different
230 MVBs were perfused with PSS containing Phe (3 μ M) plus the following agents, used alone
231 or combined: L-NAME (100 μ M; a non-selective NO synthase inhibitor), indomethacin (1
232 μ M; a non-selective cyclooxygenase inhibitor), atropine (1 μ M; a muscarinic receptor
233 antagonist), HOE-140 (1 μ M; a B₂ bradykinin receptor antagonist), KCl (40 mM),
234 tetraethylammonium (TEA 1 mM; a non-selective calcium-sensitive [KCa] K⁺ channel
235 blocker), 4-aminopyridine (4-AP 10 μ M; a voltage-dependent [KV] K⁺ channel blocker), and
236 glibenclamide (GLB 10 μ M; a selective Kir6.1 ATP-sensitive K⁺ channel blocker). After 15
237 min of continuous perfusion, ButFr (0.01, 0.03, and 0.1 mg) was injected again into the
238 perfusion system. The ability of ButFr to reduce PP in the presence and absence of different
239 inhibitors was evaluated.

240

241 *Statistical analysis*

242 Quantitative phytochemical data and antioxidant assays are presented as mean \pm
 243 standard deviation (S.D.) of 3 measurements. MVB experiments are expressed as mean \pm
 244 standard error of the mean (S.E.M) of 5 preparations per group. Statistical analyses were
 245 performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, or
 246 student's t-test when applicable. P-values less than 0.05 were considered statistically
 247 significant. Graphs were drawn and statistical analysis was carried out using GraphPad Prism
 248 software version 5.0 for Mac OS X (GraphPad® Software, San Diego, CA, USA).

249

250 **Results**

251

252 *Phytochemical analysis*

253 EEEG presented high levels of phenolic compounds and flavonoids with an estimated
 254 amount of 349.7 and 198.9 mg/g, respectively. Similarly, ButFr showed a significant
 255 concentration of phenolic compounds and flavonoids with values significantly higher than
 256 those found in HexFr and ChlFr fractions (Table 1).

257

258 **Table 1.**

259 Content of phenolic compounds and flavonoids in *E. grandiflorus* ethanol extract (EEEG)
 260 and fractions, and their DPPH and ABTS radical scavenging

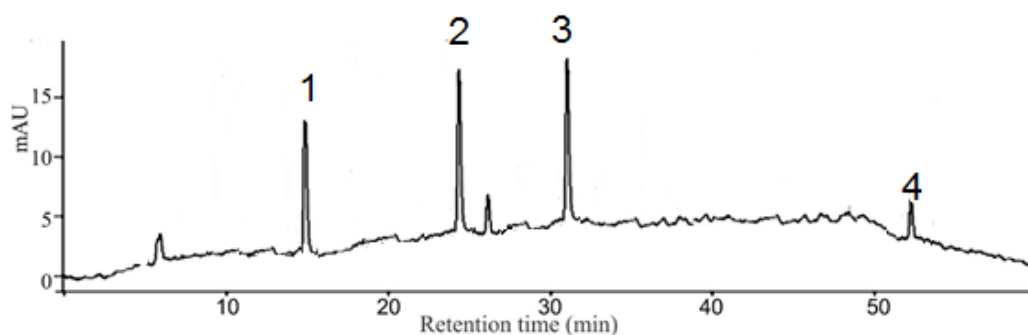
Samples	Phenolic compounds (mg/g)	Flavonoids (mg/g)	ABTS IC ₅₀ (μ g /ml)	DPPH IC ₅₀ (μ g /ml)
<i>EEEG</i>	349.7 \pm 1.0	198.9 \pm 0.8	558.1 \pm 0.9	78.1 \pm 0.3
<i>ButFr</i>	112.9 \pm 1.1	38.5 \pm 0.1	642.8 \pm 0.4	210.2 \pm 0.9
<i>HexFr</i>	45.6 \pm 0.2	22.7 \pm 0.1	767.5 \pm 1.4	434.4 \pm 1.7
<i>ChlFr</i>	56.1 \pm 0.2	24.0 \pm 0.1	782.3 \pm 1.1	378.2 \pm 1.0
<i>BHT</i>	-	-	96.9 \pm 0.3	15.8 \pm 0.1

261 **Values are expressed as the mean \pm standard deviation. ABTS: 2 2-azino-di(3-**
 262 **ethylbenzothiazoline) sulfonic acid; DPPH: 2 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; IC₅₀ = half**
 263 **maximal inhibitory concentration; ButFr: Butanolic fraction; HexFr: Hexane**
 264 **fraction; Chl: chloroform fraction; BHT: butylated hydroxytoluene.**

265

266 The main compounds found in EEG and ButFr were identified on the basis of
 267 HPLC-DAD retention time using standard compounds. These compounds were identified as:
 268 caffeic acid (t_R 14.66 min [1]), p-coumaric acid (t_R 24.68 min [2]), ferrulic acid (t_R 31.05 min
 269 [3]), and luteolin (t_R 52.68 min [4]) (Figure 1). Moreover, the estimated caffeic acid, p-
 270 coumaric acid, ferrulic acid, and luteolin levels of EEG were 45.7, 58.3, 59.8, and 12.7
 271 mg/g, respectively. On the other hand, although luteolin was not found in ButFr, the caffeic
 272 acid, p-coumaric acid, and ferric acid levels were estimated at 21.6, 24.3, and 25.5 mg/g,
 273 respectively. The HexFr and ChlFr fractions did not show any of the compounds identified
 274 (Table 2).

275



276

277 **Fig. 1.** Chromatographic profile of the ethanolic extract obtained from *E. grandiflorus*
 278 (EEEG). Caffeic acid (t_R 14.66 min [1]), p-coumaric acid (t_R 24.68 min [2]), ferrulic acid (t_R
 279 31.05 min [3]), and luteolin (t_R 52.68 min [4]).

280

281

282 **Table 2.**

283 Chemical composition of the *E. grandiflorus* ethanol extract (EEEG) and fractions analyzed
 284 by HPLC-DAD

Compound	Retention time (min)	Concentration (mg/g)			
		EEEG	ButFr	HexFr	ChlFr
<i>Caffeic acid</i>	14.66	45.7 ± 0.1	21.6 ± 0.1	*	*
<i>p-coumaric acid</i>	24.68	58.3 ± 0.2	24.3 ± 0.1	*	*
<i>Ferrulic acid</i>	31.05	59.8 ± 0.1	25.5 ± 0.2	*	*
<i>Luteolin</i>	52.68	12.7 ± 0.1	*	*	*

285

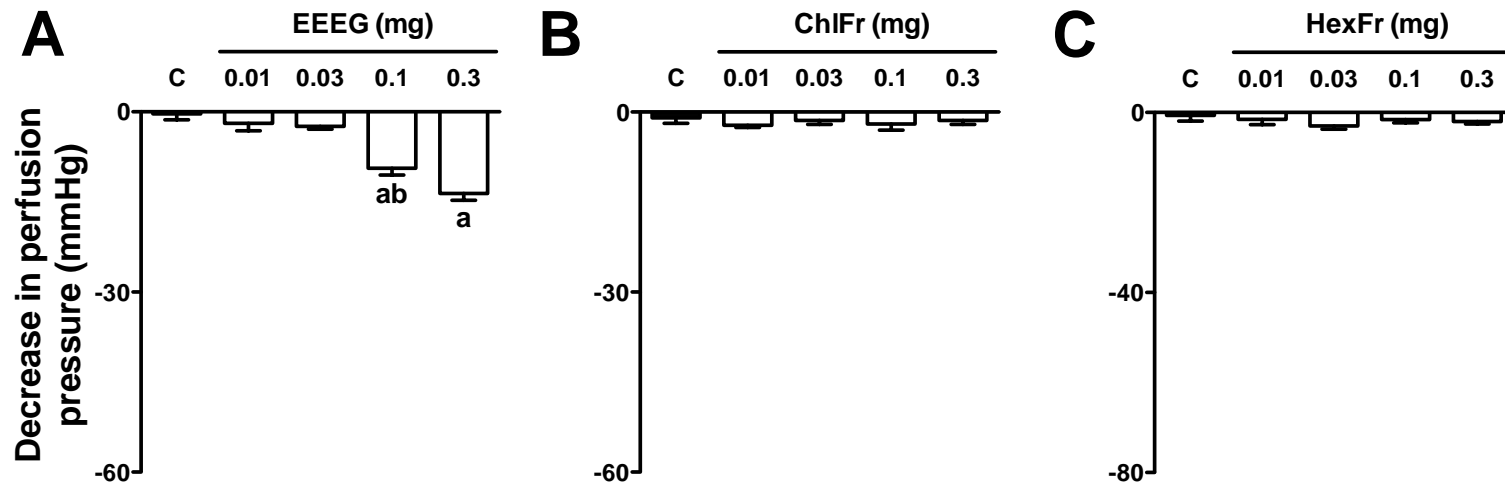
286 **Values are expressed as the mean ± standard deviation. ButFr: Butanolic fraction;**
 287 **HexFr: Hexane fraction; Chl: chloroform fraction; HPLC-DAD: high-performance**
 288 **liquid chromatography with a diode-array detector; *: not detected.**

289 *EEEG extract and its fractions showed significant antioxidant properties*

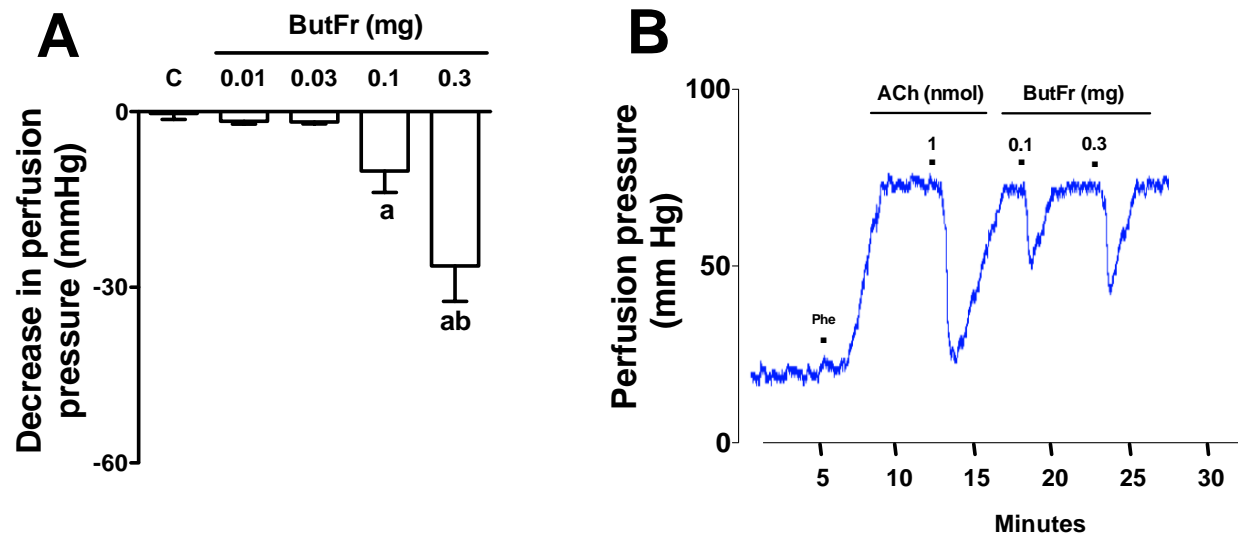
290 *E. grandiflorus* ethanolic extract and ButFr, HexFr and ChlFr fractions showed
291 important DPPH and ABTS radical scavenging activities (Table 1). In fact, proportionally to
292 the concentration of phenolic compounds, flavonoids and flavonols, the IC₅₀ values measured
293 for EEEG and ButFr were significantly lower than those found for HexFr and ChlFr fractions.
294

295 *EEEG and ButFr from E. grandiflorus induce expressive vasodilator effects on MVBs*

296 The continuous perfusion of MVB_s with Phe resulted in a sustained increase in the
297 vascular perfusion pressure, which was dose-dependently reduced by EEEG and ButFr
298 administration into the perfusion system. EEEG vasodilator response was estimated at ~ 9.9
299 and 13 mm Hg at doses of 0.1 and 0.3 mg (Figure 2A), respectively. Moreover, it was found
300 that ButFr was able to induce an expressive dose-dependent vasodilator response in MVBs.
301 The PP reduction values for doses of 0.1, and 0.3 mg were ~ 10 and 28 mm Hg, respectively
302 (Figure 3A and B). ChlFr and HexFr fractions did not induce significant vasodilator effects
303 on MVBs (Figure 2B and C).



304
 305 **Fig. 2.** Effects of *E. grandiflorus* crude extract (EEEG) and its semi-purified fractions on MVBs of rats. MVBs were perfused with
 306 physiologic saline solution (PSS) containing Phe (3 μ M) and the vasorelaxant effect of EEG (A), ChlFr (B), and HexFr (C) was
 307 evaluated. The results show the mean \pm S.E.M. of 5 preparations. ^a indicates $p < 0.05$ compared with the perfusion pressure recorded
 308 before the administration of extracts. ^b indicates $p < 0.05$ compared with the previous dose. All experiments were performed in
 309 endothelium-intact preparations. C: control (basal perfusion pressure); MVBs: mesenteric vascular beds; Phe: phenylephrine.

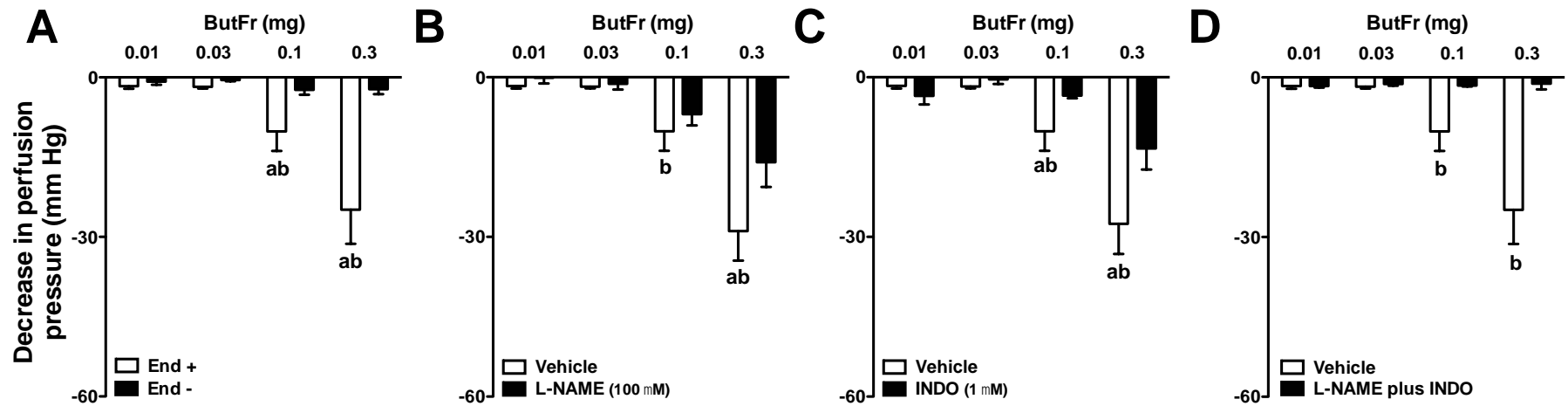


310
 311
 312 **Fig. 3.** ButFr promotes dose-dependent vasorelaxant effect on MVBs. MVBs were perfused with physiologic saline solution (PSS)
 313 containing Phe (3 μ M) and the vasorelaxant effect of ButFr (A) was evaluated. (B) Perfusion pressure recording of acetylcholine and
 314 ButFr injection in the mesenteric vascular beds of rats. The results show the mean \pm S.E.M. of 5 preparations. ^a indicates $p < 0.05$
 315 compared with the perfusion pressure recorded before ButFr administration. ^b indicates $p < 0.05$ compared with the previous dose. All
 316 experiments were performed in endothelium-intact preparations. C: control (basal perfusion pressure); MVBs: mesenteric vascular beds;
 317 Phe: phenylephrine.
 318

319 *The vascular effect of ButFr is dependent on endothelial mediators*

320 Treatment with sodium deoxycholate inhibits the effects of ACh on MVBs, confirming the efficacy of chemically removing the
 321 endothelium. Similarly, the peak effect of ButFr doses (0.1, and 0.3 mg) was decreased by 80 ± 7 and $99 \pm 4\%$, respectively, in
 322 preparations without functional endothelium (Figure 4A). Similarly, the effects of ButFr doses (0.1, and 0.3 mg) were reduced by $40 \pm$

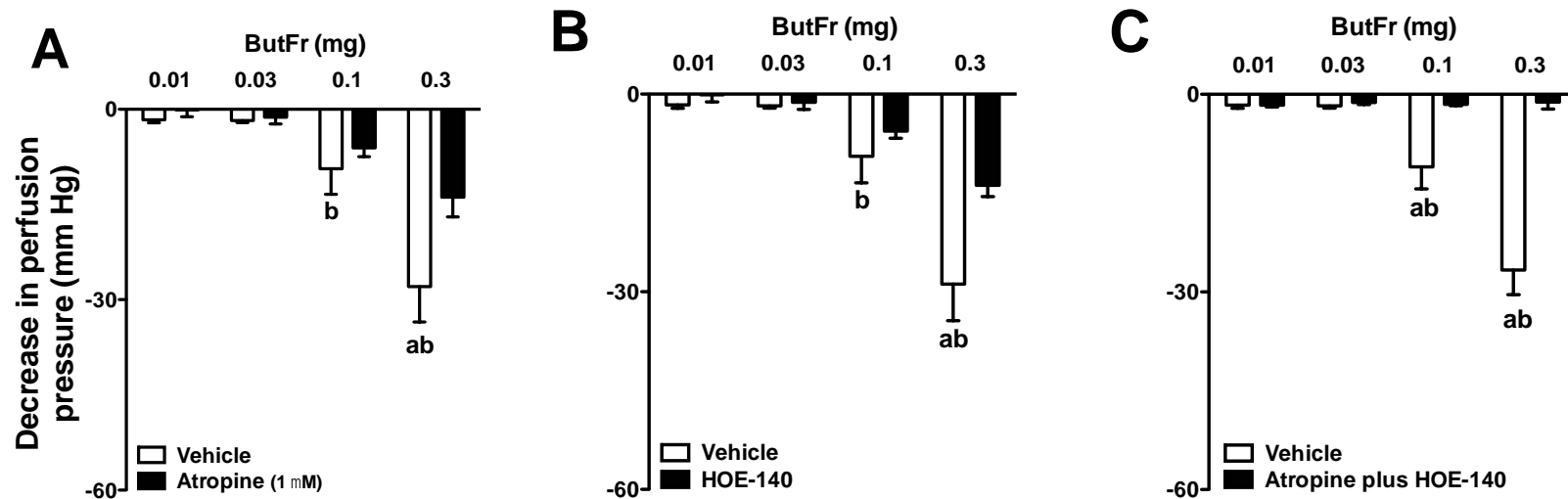
323 5% and $50 \pm 8\%$ in MVBs perfused with L-NAME, and by $70 \pm 3\%$ and $51 \pm 6\%$ in preparations perfused with indomethacin (Figure
 324 4B and C). On the other hand, the vasodilator effect of ButFr was completely inhibited in preparations perfused with L-NAME plus
 325 indomethacin (Figure 4D).
 326



327
 328 **Fig. 4.** Vasorelaxant effect of ButFr depends on endothelium mediators in the MVBs of rats. MVBs were perfused with PSS containing
 329 Phe ($3 \mu\text{M}$) on denuded endothelium (A) or plus L-NAME (B), or plus indomethacin (C), or with L-NAME plus indomethacin (D) on
 330 intact endothelium, and the vasorelaxant effect of ButFr was evaluated. The results show the mean \pm S.E.M. of 5 preparations. ^a indicates
 331 $p < 0.05$ compared with the effects of ButFr on the respective vehicle group. ^b indicates $p < 0.05$ compared with the respective previous
 332 dose. End - and End +: denuded and intact endothelium, respectively; INDO: indomethacin; L-NAME: N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester;
 333 MVBs: mesenteric vascular beds; Phe: phenylephrine.

334
 335 *The effects of ButFr on MVBs depends on a coordinated action involving M_3 -muscarinic and B_2 -bradykininergic receptors*

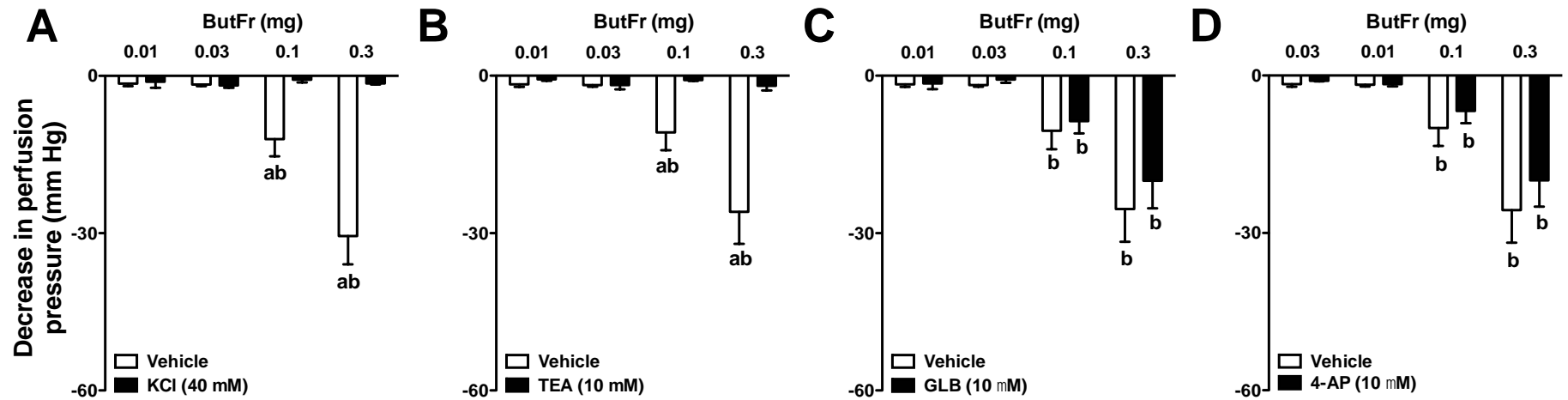
336 Reductions in PP generated by 0.1 and 0.3 mg of ButFr in control preparations were reduced by $\sim 40 \pm 4\%$ and $\sim 52 \pm 7\%$ in
 337 MVBs perfused with atropine and by $\sim 39 \pm 3\%$ and $\sim 58 \pm 5\%$ after PSS perfusion with HOE-140 (Figure 5A-B). Interestingly,
 338 simultaneous treatment (co-administration) with atropine and HOE-140 (Figure 5C) inhibited vasorelaxation induced by all ButFr doses.
 339



340
 341 **Fig. 5.** Vasorelaxant effect of ButFr depends on a coordinated action involving M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors. MVBs
 342 were perfused with PSS containing Phe (3 μ M) plus atropine (A), or HOE-140 (B), or atropine plus HOE-140 (C) on intact endothelium,
 343 and the vasorelaxant effect of ButFr was evaluated. The results show the mean \pm S.E.M. of 5 preparations. ^a indicates $p < 0.05$ compared
 344 with the effects of ButFr on the respective vehicle group. ^b indicates $p < 0.05$ compared with the respective previous dose. MVBs:
 345 mesenteric vascular beds; Phe: phenylephrine.
 346

347 *The effects of ButFr on MVBs is dependent on the activation of calcium-activated potassium channels*

348 The perfusion of MVBs with nutritive solution added of 40 mM KCl inhibited the effects of ButFr (Figure 6A). Interestingly,
 349 PSS perfusion with TEA (Figure 6B) inhibited vasorelaxation induced by all ButFr doses. On the other hand, only minor effects were
 350 observed after perfusion of 4-AP or GLB (Figure 6C).
 351



352
 353 **Fig. 6.** Vasorelaxant effect of ButFr depends on calcium-sensitive K⁺ channels in the MVBs of rats. MVBs were perfused with PSS
 354 containing Phe (3 μM) plus KCl (A), or TEA (B), or GLB (C), or 4-AP (D) on intact endothelium, and the vasorelaxant effect of ButFr
 355 was evaluated. The results show the mean ± S.E.M. of 5 preparations. ^a indicates p < 0.05 compared with the effects of ButFr on the
 356 respective vehicle group. ^b indicates p < 0.05 compared with the respective previous dose. 4-AP: 4-aminopyridine; GLB: glibenclamide;
 357 MVBs: mesenteric vascular beds; Phe: phenylephrine; TEA: tetraethylammonium.

358 Discussion

359 *Echinodorus grandiflorus* is an important medicinal species known for its diuretic and
360 antihypertensive effects (Prando et al., 2015; 2016; Lessa et al., 2008). Although some
361 preclinical studies have shown the effectiveness of various preparations obtained from *E.*
362 *grandiflorus* in different animal models, the effects on peripheral vascular resistance remain
363 unknown. In this work, ethanolic extract of leaves of this species was obtained and a detailed
364 chemical and pharmacological study was carried out. In fact, the main metabolites present in
365 this preparation were identified, showing that EEG and its ButFr fraction have important
366 vasodilatory effects on MVBs. Furthermore, we have shown that these effects are brought about
367 by a synchronized activation of M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors, leading to the
368 release of prostaglandins and NO, and consequently, modulating the opening of calcium-
369 dependent potassium channels.

370 The spectrum of secondary metabolites found in *E. grandiflorus* is quite varied and
371 influenced mainly by the collection area and extraction techniques. Several phytochemical
372 studies indicate the existence of multiple classes of secondary metabolites in different
373 preparations obtained from this species, especially phenolic compounds, including a large
374 amount of flavonoids (Brugiolo et al., 2009; Garcia et al., 2010; Prando et al., 2015; 2015). In
375 our study phenolic compounds was identified and quantified in EEG and ButFr, specifically
376 caffeic acid, p-coumaric acid, ferrulic acid, and luteolin. Moreover, similarly to other studies
377 already published (Prando et al., 2015; 2016) and proportionally to the concentration of
378 phenolic compounds and flavonoids, EEG and ButFr showed significant antioxidant
379 activities, which may, directly or indirectly, influence the cardioprotective effects presented.

380 Some published data have shown that caffeic acid (Leeya et al., 2010), ferrulic acid
381 (Senejoux et al., 2012), and luteolin (Sánchez de Rojas et al., 1996; Jiang et al., 2005) have
382 vasodilatory effects on the aortic rings of rats by activation of the NO/cGMP pathway and the
383 opening of different potassium channels. Although these effects have already been
384 demonstrated, the roles of these compounds, in an integrated manner, on the vasodilatory effects
385 of *E. grandiflorus* remain unclear.

386 Many studies evaluating the effects of different natural products on the cardiovascular
387 system use the aortic rings of rats as an experimental model (McNeill and Jurgens, 2006).
388 Despite being considered a scientifically validated model, it does not accurately reproduce the
389 effects on vessels that can directly influence blood pressure levels, i.e. resistance vessels.
390 Resistance vessels are usually arterioles or end-points of arteries, which together with cardiac

391 output play a fundamental role in controlling blood pressure. Although the thick muscular layer
392 plays a central role in the reduction of capillary perfusion pressure, its tone is mainly controlled
393 through the synthesis and release of several endothelial mediators. In fact, endothelial mediators
394 can be vasodilator factors such as NO, prostacyclin (PGI₂) and endothelium derived
395 hyperpolarizing factor (EDHF) or vasoconstrictive factors such as thromboxane (TXA₂) and
396 endothelin-1 (ET-1) (Tykocki et al., 2017).

397 Starting from this hypothesis, we chose to evaluate whether EEEG and its respective
398 fractions have significant vasodilator effects on MVBs, and in addition, if these effects are
399 dependent on endothelial integrity. In fact, we have shown that EEEG and ButFr have
400 significant endothelium-dependent vasodilator effect on MVBs, since removing the
401 endothelium by sodium deoxycholate inhibited the vasodilator effects of this extracts. The data
402 found would allow us to speculate that possibly the EEEG and ButFr-mediated vasodilator
403 effects may be involved in the release of important endothelial mediators, such as NO, PGI₂
404 and EDHF.

405 NO is formed by enzyme nitric oxide synthase (NOS), which converts amino acid L-
406 arginine into NO (Palmer et al., 1988). There are three isoforms of NOS, and endothelial NOS
407 (eNOS) produce NO in the vasculature (Lamas et al., 1992). Once produced, NO diffuses to the
408 smooth Mjjjjj uscle where it binds to soluble guanylyl cyclase (sGC). The NO-sGC complex
409 increases the conversion of guanosine triphosphate (GTP) to cGMP, which decreases smooth
410 muscle tension (Ignarro et al., 1986). Further, cGMP reduces Ca²⁺ release from the
411 sarcoplasmic reticulum in the smooth muscle cell, and also helps to restore Ca²⁺ to the
412 sarcoplasmic reticulum. Both actions reduce the contraction of smooth muscle cells (Cornwell
413 et al., 1991). In addition, some data have shown that non-selective NOS inhibitors, such as L-
414 NAME, can significantly reduce the vasodilatory effect of drugs that depend on the endogenous
415 release of NO (Cohen et al., 1995). In fact, our data corroborate this hypothesis and highlight
416 the importance of NO in maintaining the vasodilator effects of EEEG and ButFr, since prior
417 infusion of L-NAME partially reduced the vasodilator effects of these compounds.

418 Another endothelium-dependent mediator that plays a central role in maintaining
419 vascular tone is prostacyclin (PGI₂). Its production is catalyzed by enzyme cyclooxygenase
420 (COX). Endothelial cells continuously express the COX-1 isoform, whereas COX-2 is
421 produced when the endothelium is injured or exposed to some cytokines (Flavahan, 2007). It is
422 known that COX converts arachidonic acid into prostaglandin H₂ (PGH₂), which in turn is
423 synthesized to PGI₂ by prostacyclin synthase. PGI₂ binds to receptors on smooth muscle cells

424 where it activates adenylate cyclase and induces the synthesis of cyclic adenosine
425 monophosphate (cAMP). cAMP activates protein kinase A and induces vasodilation (Fetalvero
426 et al., 2007). An interesting point relates to the intricate relationship between PGI₂ and
427 endothelial NO. In fact, physiological endothelial function appears to be more dependent on
428 NO than PGI₂. However, in situations where NO synthesis is reduced or blocked, the residual
429 dilation is due to increased PGI₂ synthesis (Beverelli et al., 1997), suggesting the compensatory
430 role of PGI₂ in the vascular tone. In order to prove the relationship between PGI₂ and NO
431 regarding the effects of *E. grandiflorus* extracts, we showed that indomethacin, a non-selective
432 COX inhibitor, reduced the vasodilator effects of EEEG and ButFr, while the association
433 between L-NAME and indomethacin inhibited the vasodilator effects of both extracts.

434 In the vascular system, one of the main activators of NO and PGI₂ synthesis is Ca²⁺.
435 When intracellular Ca²⁺ levels increase, NOS detaches from a protein called caveolin and is
436 activated (Bucci et al., 2000). Similarly, Ca²⁺ functions as an important catalyzer for the
437 activation of phospholipase A2, a key enzyme for the synthesis of prostanoids. Thus, increased
438 intracellular Ca²⁺ directly contributes to increases in NO and PGI₂ levels. Some endogenous
439 mediators including bradykinin (BK) and acetylcholine (ACh) play an important role in
440 increasing intracellular Ca²⁺ concentrations (Moncada and Higgs, 2006). In vascular
441 endothelium, ACh via M3 and BK by B2 receptors activates phospholipase C by increasing the
442 inositol triphosphate (IP3) levels, which mobilizes Ca²⁺ from the cellular sarcoplasmic
443 reticulum. Knowing the importance of these mediators in the release of NO and PGI₂, we
444 decided to investigate whether the vasodilating effects of EEEG and ButFr would also be
445 dependent on ACh and BK receptors. Surprisingly, the use of atropine and HOE-140 in an
446 isolated manner reduced the vasodilator effects of the extracts tested, although the association
447 between them inhibited the vasodilator effects induced by EEEG and ButFr.

448 For at least 20 years, it has been known that both ACh and BK exert vasodilator effects
449 also with the participation of EDHF (Cohen and Vanhoutte, 1995). Although EDHF is a known
450 substance that hyperpolarizes the smooth muscle leading to vasodilation (Feletou and
451 Vanhoutte, 1988), our data excluded its participation since L-NAME and indomethacin
452 completely blocked the vasodilatory effects of EEEG and ButFr. On the other hand, NO and
453 PGI₂ can also dilate blood vessels through hyperpolarization of smooth muscle cells,
454 suggesting the involvement of potassium channels. So, to explore the role of potassium
455 channels in the vasodilator effects of EEEG and ButFr, we evaluated their ability to reduce the
456 perfusion pressure in preparations perfused with high KCl (40 mM), a condition able to

457 suppress K⁺ flows across cellular membranes (Brayden, 1996). In fact, since potassium flow
458 blockade inhibits the vasodilator effects of *E. grandiflorus* extracts, it is possible that the
459 modulation of K⁺ flows could be involved in the vasodilator response observed in MVBs. This
460 hypothesis was addressed using TEA, a classical K_{Ca} K⁺ channel blocker, which caused total
461 reduction in the vascular effects of EEEG and ButFr. Taking into account that the downstream
462 targets of the NO and PGI₂ pathway in the blood vessels include opening of K⁺ channels
463 (Totzeck et al., 2017; Tykocki et al., 2017), and the lack of responses to EEEG and ButFr after
464 treatment with TEA, it is reasonable to suggest that K⁺ channels are directly involved in the
465 vasodilator effects observed in MVBs.

466

467 **Conclusion**

468 This study showed that EEEG obtained from *Echinodorus grandiflorus* and its butanolic
469 fraction - ButFr - have important vasodilatory effects on MVBs. Apparently, these effects are
470 dependent on endothelial M₃-muscarinic and B₂-bradykininergic receptors inducing NO and
471 PGI₂ release followed by K_{Ca} K⁺ channel activation in the vascular smooth muscle. This study
472 opens perspectives for the use of EEEG or ButFr in situations where PVR reduction is required.

473

474 **Author's contribution**

475 All authors participated in the design, interpretation of studies, analysis of data and
476 review of the manuscript; ESC, CAST, RACP, MIS, LPG, and AOS conducted the experiments;
477 JSM and CALC were involved with the preparation and chemical analysis of extract and
478 factions; MEB and AGJ were responsible for data discussion, manuscript correction and were
479 the senior researchers responsible for this work. All authors read and approved the final
480 manuscript.

481

482 **Conflict of interest**

483 The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this
484 paper.

485

486 **Acknowledgements**

487 This work was supported by grants from the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento
488 do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil,
489 59/300.046/2015 and 23/200.682/2012), and Conselho Nacional de Desenvolvimento

490 Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 449464/2014-8). The authors are grateful to the
491 University Hospital of the Universidade Federal da Grande Dourados for the biochemical
492 analyzes.

493

494 **References**

495 Beverelli, F., Bea, M.L., Puybasset, L., Giudicelli, J.F., Berdeaux, A., 1997. Chronic inhibition
496 of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through
497 upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 11, 252–259.

498 Bolson, M., Hefler, S.R., Chaves, E.I.D., Gasparotto Junior, A., Cardozo Junior, E.L., 2015.
499 Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the
500 surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 161, 1-10.

501 Brasil., 2010. *Farmacopeia Brasileira*, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5th
502 ed. Anvisa, Brasília, p. 774.

503 Brasil., 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da*
504 *Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 1st ed. Anvisa, Brasília, p.
505 32.

506 Brayden, J.E., 1996. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol.*
507 *Physiol.* 23(12), 1069-1076.

508 Brugiolo, S.S.S., Borges, L.V., Pimenta, D.S., Brugiolo, A.S.S., Peters, V.M., Guerra, M.O.,
509 2009. Ethnobotany and Experimental Pharmacology of *Echinodorus grandiflorus* (chapéu-de-
510 couro). In: Alejandro, V., Jasiah, I. (Eds.), *Medicinal Plants: Classification, Biosynthesis and*
511 *Pharmacology*, Nova Science Publishers, New York, p. 243-254.

512 Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. Sessa, W.C., 2000.
513 In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces
514 inflammation. *Nat Med.* 6, 1362–1367.

515 Cohen, R.A., Vanhoutte, P.M., 1995. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: Beyond
516 Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Circulation* 92, 3337–3349.

517 Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., Lincwold, T.M., 1991. Regulation of
518 sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein
519 kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 923–931.

520 Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006.
521 Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic
522 compounds. *Food Chemistry. Res.* 97, 654-660.

523 Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 1988. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine
524 coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 93, 515–524.

525 Fetalvero, K.M., Martin, K.A., Hwa, J., 2007. Cardioprotective prostacyclin signaling in
526 vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 82, 109–118.

- 527 Flavahan, N.A., 2007. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. Trends
528 Pharmacol. Sci. 28, 106–110.
- 529 Garcia, E.F., Oliveira, M.A., Godin, A.M., Ferreira, W.C., Bastos, L.F., Coelho, M.M., Braga,
530 F.C., 2010. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from
531 *Echinodorus grandiflorus* leaves. Phytomedicine 18(1), 80-86.
- 532 Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., Kadowitz, P.J., 1986. Activation of purified soluble
533 guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein:
534 stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237(3),
535 893–900.
- 536 Jiang, H., Xia, Q., Wang, X., Song, J., Bruce, I.C., 2005. Luteolin induces vasorelaxation in rat
537 thoracic aorta via calcium and potassium channels. Pharmazie. 60, 444–447.
- 538 Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., Michel, T., 1992. Endothelial nitric oxide
539 synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform.
540 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6348–6352.
- 541 Leeya, Y., Mulvany, M.J., Queiroz, E.F., Marston, A., Hostettmann, K., Jansakul, C., 2010.
542 Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of
543 *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. Eur. J. Pharmacol. 649, 301–313.
- 544 Lessa, M.A., Araújo, C.V., Kaplan, M.A., Pimenta, D., Figueiredo, M.R., Tibiriçá, E., 2008.
545 Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. Fundam.
546 Clin. Pharm. 22(2), 161–168.
- 547 Lin, J.Y., Tang, C.Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected
548 fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation.
549 Food Chem. 101, 140-147.
- 550 McGregor, D.D., 1965. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor
551 Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. J. Physiol. 177, 21-30.
- 552 McNeill, J.R., Jurgens, T.M., 2006. A systematic review of mechanisms by which natural
553 products of plant origin evoke vasodilatation. Can. J. Physiol. Pharmacol. 84 (8-9), 803-821.
- 554 Moncada, S., Higgs, E.A., 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology.
555 Br. J. Pharmacol. 147(1), S193–S201.
- 556 Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric
557 oxide from L-arginine. Nature. 333, 664–666.
- 558 Prando, T.B.L, Barboza, L.N., Gasparotto, F.M., Araújo, V.O., Tirloni, C.A.S., de Souza, L.M.,
559 Lourenço, E.L.B., Gasparotto Junior, A., 2015. Ethnopharmacological investigation of the
560 diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. J.
561 Ethnopharmacol. 174, 369-378.
- 562 Prando, T.B.L., Barboza, L.N., Araújo, V.O., Gasparotto, F.M., de Souza, L.M., Lourenço,
563 E.L.B., Gasparotto Junior, A., 2016. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in

- 564 the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. &
565 Schltldl.) Micheli. *Phytomedicine*. 23(11), 1249-1258.
- 566 Sánchez de Rojas, V.R., Somoza, B., Ortega, T., Villar, A.M., 1996. Different mechanisms
567 involved in the vasorelaxant effect of flavonoids isolated from *Satureja obovata*. *Planta Med.*
568 62, 554–556.
- 569 Senejoux, F., Girard-Thernier, C., Berthelot, A., Bévalot, F., Demougeot, C., 2012. New
570 insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of apocynin in rat thoracic aorta.
571 *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27(3), 262-270.
- 572 Tibiriçá, E., Almeida, A., Cailleaux, S., Pimenta, D., Kaplan, M.A., Lessa, M.A., Figueiredo,
573 M.R.J., 2007. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from
574 *Echinodorus grandiflorus*. *J. Ethnopharmacol.* 111, 50-55.
- 575 Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Rassaf, T., 2017. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and
576 Cardioprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 982, 335-346.
- 577 Tykocki, N.R., Boerman, E.M., Jackson, W.F., 2017. Smooth Muscle Ion Channels and
578 Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr. Physiol.*, 7(2), 485-
579 581.

6 ANEXOS

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 30 de outubro de 2017.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Investigação etnofarmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de Echinodorus grandiflorus*", registrada sob o protocolo de nº 35/2017, sob a responsabilidade de *Marcio Eduardo de Barros e Enaile Salviano de Carvalho* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, *ad referendum*.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2017 a 30/12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais	100
Peso/idade	90 dias
Sexo	100 fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA