



Mónica Teixeira Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA FRAÇÃO POLIFENÓLICA DE *OXALIS PES CAPRAE* L. SOBRE OS
RECETORES ADRENÉRGICOS EM ARTÉRIA MAMÁRIA INTERNA HUMANA**

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mónica Teixeira Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA FRAÇÃO
POLIFENÓLICA DE *OXALIS PES CAPRAE* L.
SOBRE OS RECETORES ADRENÉRGICOS EM
ARTÉRIA MAMÁRIA INTERNA HUMANA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Professora Doutora Maria Dulce Cotrim

Professora Doutora Maria Graça Ribeiro Campos

Setembro de 2015

Universidade de Coimbra

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento é dirigido à Professora Doutora Dulce Cotrim, por me ter recebido e acolhido, tornando possível todo o trabalho experimental para a realização desta dissertação. Obrigada por ter permitido desenvolver o meu trabalho numa área que me desperta tanta curiosidade e interesse. Também pela disponibilidade, encorajamento e conhecimentos transmitidos como orientadora.

Um agradecimento especial ao Diogo Fonseca, sem o qual seria muito mais difícil ter finalizado este trabalho. Obrigada pela imensa paciência, disponibilidade e acompanhamento.

Um agradecimento à Professora Doutora Maria Graça Ribeiro Campos, por todos os esclarecimentos prestados na área da Farmacognosia.

Um agradecimento muito especial à minha colega e amiga Cristina, por estar presente e me ajudar em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus amigos, sem os quais toda esta experiência académica faria muito menos sentido. Obrigada por tudo, seremos sempre uma família.

Obrigado a Coimbra. A minha cidade. Nunca vou conseguir agradecer tudo o que me deu e permitiu viver.

“Acredita quando te digo que o sol de Coimbra é diferente do sol do resto do mundo. Tenho pena de quem não teve o prazer de te conhecer. E tenho mais pena ainda de quem te conheceu, mas não soube amar-te. Assim sendo, este é o conselho que deixo a quem entra nas tuas portas: vivam como se acabasse amanhã, sintam como se fosse para sempre.”, Pedro Rodrigues

Obrigado à minha família, pelo apoio incondicional.

Aos meus pais, por me colocarem sempre em primeiro lugar. Pela paciência infinita e pelo incentivo, por acreditarem em mim.

À minha irmã, por estar sempre disponível para mim. Pelo incentivo, por ouvir os meus desabafos em telefonemas fora de horas.

Aos meus avós, por todo o amor e carinho.

Avaliação dos efeitos de uma fração polifenólica de *Oxalis pes-caprae* L. sobre os recetores adrenérgicos em artéria mamária interna humana

RESUMO

A *Oxalis pes-caprae* L. é uma planta da família *Oxalidaceae* oriunda da África do Sul e subespontânea na região mediterrânica e Europa Ocidental. De entre os compostos presentes nas folhas desta planta destacam-se os flavonóides, nomeadamente os derivados da luteolina e apigenina. Os flavonóides são um grande grupo de metabolitos secundários das plantas e têm numerosas propriedades farmacológicas e biológicas.

No sistema cardiovascular, mostraram vários efeitos benéficos, incluindo propriedades vasodilatadoras. Mais especificamente, mostraram efeitos inibitórios em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina. Desta forma, os recetores adrenérgicos responsáveis pelo efeito vasoconstritor induzido pela noradrenalina podem ter, também, um papel importante no efeito vasodilatador dos flavonóides presentes no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L.

No entanto, não existem estudos a nível vascular, que relacionem o vaso-relaxamento mediado pelos flavonóides presentes no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. com os recetores adrenérgicos. Neste trabalho pretende-se dar uma contribuição nesse sentido, utilizando artérias mamárias internas humanas provenientes de doentes sujeitos a cirurgias de revascularização coronária.

Os resultados confirmam que os flavonóides presentes no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. têm um efeito inibitório às contrações induzidas pela noradrenalina. A fração polifenólica não induziu um efeito contráctil na artéria mamária interna humana mas provocou um desvio da curva concentração-resposta da NA para a direita, com diminuição significativa do seu efeito contráctil máximo, o que pode indicar um antagonismo do tipo não-competitivo.

Os resultados com os antagonistas dos recetores adrenérgicos α mostram que a fração polifenólica presente no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. utilizada neste estudo, não tem afinidade para os recetores α presentes na artéria mamária interna humana.

Palavras-chave

Fração polifenólica; flavonóides; *Oxalis pes-caprae* L.; noradrenalina; recetores adrenérgicos; artéria mamária interna humana

Evaluation of a polyphenolic fraction from *Oxalis pes-caprae* L. on adrenergic receptors in the human internal mammary artery

ABSTRACT

Oxalis pes-caprae L. is a plant from the family *Oxalidaceae*, native of South Africa and widespread in the Mediterranean area and Western Europe. Among the compounds present in the leaves of this plant, flavonoids (especially derivatives of apigenin and luteolin) are worth investigating. Flavonoids are an important group of secondary plant metabolites with a wide range of biological and pharmacological properties. These compounds have shown benefic cardiovascular effects. More specifically, they have inhibitory effects in response to the contractions induced by noradrenaline. Therefore, the adrenergic receptors responsible for the vasoconstrictor effect induced by noradrenaline may have an important role in the vasodilatory effect caused by flavonoids present in the leaf extract of *Oxalis pes-caprae* L.

However, there aren't vascular studies on the relationship between the vasodilatory effect mediated by flavonoids present in the leaf extract of *Oxalis pes-caprae* L. and its interaction with adrenergic receptors. This work gives a contribution on that subject, using human internal mammary arteries from patients undergoing coronary bypass surgery.

The results confirm the inhibitory effect of flavonoids from the extract of *Oxalis pes caprae* L. to the contractions induced by noradrenaline. The polyphenolic fraction didn't induce any contractile effect on human internal mammary artery. It shifted the concentration-response curve of noradrenaline to the right, with significant reduction in the maximum contractile effect, which may indicate a non-competitive type of antagonism.

The results with the α -adrenergic receptors antagonists show that the polyphenolic fraction present in the leaf extract of *Oxalis pes-caprae* L. used in this study, has no affinity for the α -adrenergic receptors present in human internal mammary artery.

Keywords

Polyphenolic fraction; flavonoids; *Oxalis pes-caprae* L.; noradrenaline; adrenergic receptors; human internal mammary artery

ÍNDICE

RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VIII
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Sistema nervoso simpático.....	1
1.2 Catecolaminas.....	2
1.2.1 Descoberta.....	2
1.2.2 Definição.....	3
1.2.3 Síntese.....	4
1.2.4 Armazenamento e transporte.....	5
1.2.5 Libertação.....	7
1.2.6 Metabolismo.....	7
1.3 Recetores adrenérgicos e proteínas G.....	9
1.3.1 Recetores adrenérgicos α_1	10
1.3.2 Recetores adrenérgicos α_2	10
1.3.3 Recetores adrenérgicos β	11
1.3.4 Agonismo e antagonismo.....	12
1.3.5 Regulação.....	14
1.3.6 Fatores que promovem alterações.....	15
1.4 Recetores adrenérgicos no sistema cardiovascular.....	16
1.5 Recetores adrenérgicos no músculo liso e endotélio vasculares.....	19
1.5.1 Contração e relaxamento dependentes do endotélio.....	20
1.5.2 Contração e relaxamento independentes do endotélio.....	21

1.6 Recetores adrenérgicos na artéria mamária interna.....	23
1.6.1 Localização anatômica e caracterização.....	23
1.6.2 Estudos em artérias mamárias internas.....	24
1.7 <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	26
1.7.1 Flavonóides.....	27
1.7.1.1 Estudos cardiovasculares.....	28
1.8 Hipertensão arterial.....	30
1.8.1 Definição.....	30
1.8.2 Estudos relacionados com o sistema nervoso simpático.....	31
1.8.3 Recetores adrenérgicos: terapêutica atual e perspectivas futuras.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	37
3.1 <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	37
3.1.1 Teste do DPPH.....	38
3.1.2 HPLC.....	38
3.1.3 Espectroscopia UV/Vis.....	39
3.1.4 (...) “Evaporador rotativo”.....	39
3.1.5 Ultra-sons.....	40
3.2 Artéria mamária interna humana.....	41
3.2.1 Recolha.....	41
3.2.2 Isolamento.....	41
3.2.3 Montagem.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	43
4.1.1 Identificação dos compostos presentes no extrato por HPLC/DAD.....	43
4.1.2 Avaliação da atividade antirradicalar pelo teste do DPPH.....	47
4.1.3 Verificação dos compostos presentes no extrato por HPLC/DAD.....	47
4.1.4 Verificação da atividade antirradicalar pelo teste do DPPH.....	52
4.2 Artéria mamária interna humana.....	53

4.2.1 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	56
4.2.2 Respostas contrácteis máximas da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	56
4.2.3 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de ioimbina e <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	58
4.2.4 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de prazosina e <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	59
4.2.5 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de fentolamina e <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	60
4.2.6 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de ioimbina, com pré-incubação de prazosina e com pré-incubação de fentolamina.....	61
4.2.7 Respostas contrácteis máximas da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de ioimbina, com pré-incubação de prazosina, com pré-incubação de fentolamina e com pré-incubação de <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
5.1 <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	63
5.2 Artéria mamária interna humana.....	65
6. CONCLUSÕES.....	74
Referências bibliográficas.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1- Esquema da via sintética da adrenalina.....	5
Fig.2- Catecolaminas no terminal do axónio.....	8
Fig.3- Ciclo de ativação das proteínas G.....	9
Fig.4- Comparação entre antagonismo competitivo e não competitivo.....	12
Fig.5- Agonistas e antagonistas seletivos dos recetores adrenérgicos.....	13
Fig.6- Localização da artéria mamária interna humana no aparelho circulatório.....	23
Fig.7- <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	26
Fig.8- Estrutura química da luteolina e da apigenina.....	27
Fig.9- Ação do sistema nervoso simpático no desenvolvimento de hipertensão arterial....	33
Fig.10- Artéria mamária interna humana cortada em anéis de 2-3 mm.....	41
Fig.11- Anéis de 2-3 mm de artéria mamária interna humana suspensos num banho de órgãos.....	42
Fig.12- Perfil HPLC/DAD dos ácidos fenólicos/flavonóides das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. (Abril 2014).....	43
Fig.13- Perfil HPLC/DAD dos ácidos fenólicos/flavonóides das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. (Outubro 2014).....	47
Fig.14- Resposta contráctil da artéria mamária interna humana à fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	54
Fig.15- Resposta contráctil da artéria mamária interna humana à noradrenalina.....	55
Fig.16- Resposta contráctil da artéria mamária interna humana à noradrenalina com pré-incubação de <i>Oxalis pes-caprae</i> L.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Localização e efeitos principais dos tipos e subtipos de recetores adrenérgicos α no sistema cardiovascular.....	17
Tabela 2- Localização e efeitos principais dos tipos e subtipos de recetores adrenérgicos β no sistema cardiovascular.....	18
Tabela 3- Distribuição preferencial dos recetores adrenérgicos ao nível arterial.....	20
Tabela 4- Classificação da hipertensão arterial com base na pressão sanguínea.....	30
Tabela 5- Análise da atividade do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. utilizando o teste do DPPH (Abril 2014).....	47
Tabela 6- Análise da atividade do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. utilizando o teste do DPPH (Outubro 2014).....	52
Tabela 7- Comparação do E_{max} (%) e pEC_{50} da noradrenalina com pré-incubação da fração polifenólica, nas três concentrações utilizadas, do extrato das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L., em relação ao controlo.....	57
Tabela 8- Comparação do E_{max} (%) e pEC_{50} da noradrenalina com pré-incubação de ioimbina e com pré-incubação de ioimbina e fração polifenólica do extrato das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L., em relação ao controlo.....	58
Tabela 9- Comparação do E_{max} (%) e pEC_{50} da noradrenalina com pré-incubação de prazosina e com pré-incubação de prazosina e fração polifenólica do extrato das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L., em relação ao controlo.....	59
Tabela 10- Comparação do E_{max} (%) e pEC_{50} da noradrenalina com pré-incubação de fentolamina e com pré-incubação de fentolamina e fração polifenólica do extrato das folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L., em relação ao controlo.....	60
Tabela 11- Comparação do E_{max} (%) e pEC_{50} da noradrenalina com pré-incubação de ioimbina, prazosina, fentolamina e <i>Oxalis pes-caprae</i> L., em relação ao controlo.....	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Ação inibitória da fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml) em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente ao controlo.....	56
Gráfico 2- Comparação do efeito inibitório máximo das três concentrações utilizadas da fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. na artéria mamária interna humana, relativamente ao controlo.....	57
Gráfico 3- Ação inibitória do fármaco ioimbina e da fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente à ação inibitória do fármaco ioimbina e ao controlo.....	58
Gráfico 4- Ação inibitória do fármaco prazosina e da fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente à ação inibitória do fármaco prazosina e ao controlo.....	59
Gráfico 5- Ação inibitória do fármaco fentolamina e da fração polifenólica do extrato de folhas da <i>Oxalis pes-caprae</i> L. em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente à ação inibitória do fármaco fentolamina e ao controlo.....	60
Gráfico 6- Ação inibitória dos fármacos ioimbina, prazosina e fentolamina, em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente ao controlo.....	61
Gráfico 7- Comparação do efeito inibitório máximo da ioimbina, prazosina, fentolamina e <i>Oxalis pes-caprae</i> L. às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana, relativamente ao controlo.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A-** adrenalina
- AAD- β -** antagonistas dos recetores adrenérgicos β
- ADC-** adenilciclase
- AMIH(s)-** artéria(s) mamária(s) interna(s) humana(s)
- ANOVA-** análise de variância
- ATI-** artéria torácica interna
- Ca²⁺-** ião cálcio
- cAMP-** adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
- cGMP-** guanosina monofosfato cíclica
- Cl⁻** - ião cloro
- COMT-** catecol-O-metiltransferase
- DAG-** diacilglicerol
- DC-** débito cardíaco
- DHPG-** 3,4-dihidroxifenilglicol
- DPPH-** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- EDHF-** fator hiperpolarizante do endotélio
- E_{max}-** efeito máximo
- EMT-** transportador extraneuronal de monoaminas
- eNOS-** isoforma tipo 3 da sintetase do NO
- GDP/GTP-** guanosina difosfato/guanosina trifosfato
- G_i-** proteína G inibitória
- GPCRs-** recetores acoplados à proteína G
- G_s-** proteína G estimuladora
- HPLC/DAD-** cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodiodos
- HTA-** hipertensão arterial
- IP₃** - trifosfato de inositol
- K⁺-** ião potássio
- KCl-** cloreto de potássio
- M-** molar
- MAO-** monoamino oxidase
- Mg²⁺-** ião magnésio
- mg-** miligrama
- MHPG-** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol

ml- mililitro
MLC- cadeia leve da miosina
mM- miliMolar
mmHg- milímetro de mercúrio
mN- miliNewton
mRNA- ácido ribonucleico mensageiro
n- número de experiências
NA- noradrenalina
Na⁺- íon sódio
NET- transportador de noradrenalina
NO- monóxido de azoto
NOS- sintetase do monóxido de azoto
p- valor de p indicador do intervalo de confiança
PA- pressão sanguínea arterial
PC- proteína cinase
pEC50- logaritmo negativo da concentração molar de agonista capaz de induzir metade da resposta máxima
PLP C- fosfolipase C
PNMT- N-metiltransferase da feniletanolamina
Recetores α - recetores alfa
Recetores β - recetores beta
RVP- resistência vascular periférica
SEM- “Standard Error of the Mean”
SNA- sistema nervoso autónomo
SNC- sistema nervoso central
SNP- sistema nervoso parassimpático
SNS- sistema nervoso simpático
UV/Vis- Ultravioleta/Visível
VMA- ácido vanilmandélico
VMAT- transportador vesicular de monoaminas
vs.- versus
[agonista]- concentração do agonista
° C- graus centígrados
 μ M- microMolar
 λ - comprimento de onda

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta por duas partes que abrangem trabalhos experimentais distintos.

A primeira parte consistiu na preparação da fração polifenólica do extrato de folhas da planta *Oxalis pes-caprae* L. utilizada neste estudo, colhida em Coimbra. Este trabalho prático desenvolveu-se no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra.

A segunda parte consistiu em avaliar o efeito vascular dessa mesma fração polifenólica às contrações induzidas pela noradrenalina em artérias mamárias internas humanas provenientes de doentes sujeitos a uma cirurgia de revascularização coronária. Todos estes procedimentos tiveram em conta o objetivo principal deste trabalho, estudar o papel dos recetores adrenérgicos nesse efeito vascular. Este trabalho prático desenvolveu-se no Laboratório de Farmacologia da Universidade de Coimbra.

Desta forma, na maioria dos capítulos desta dissertação (materiais e métodos, resultados e discussão), faz-se uma separação dos conteúdos relativos a cada parte do trabalho.



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao longo deste capítulo será feita uma revisão bibliográfica sobre temas considerados importantes para uma melhor compreensão do trabalho experimental desenvolvido.

Assim, faz-se uma abordagem do SNS (subcapítulo 1.1). Por sua vez, como a estimulação das células nervosas simpáticas, resulta na libertação de catecolaminas (subcapítulo 1.2) que atuam nos recetores adrenérgicos acoplados a proteínas G, referem-se propriedades e efeitos relevantes destes recetores (subcapítulo 1.3).

Após esta abordagem generalizada, é feito um enquadramento teórico dos efeitos dos recetores adrenérgicos no sistema cardiovascular (subcapítulo 1.4), com particular destaque ao nível vascular (subcapítulo 1.5), na AMIH (subcapítulo 1.6).

Tendo em conta o objetivo do trabalho realizado, evidenciam-se as características da planta *Oxalis pes-caprae* L., nomeadamente as propriedades de alguns dos seus compostos isolados com atividade cardiovascular. Em particular, na AMIH, faz-se uma correlação dos efeitos vasculares dos flavonóides com os efeitos vasculares da NA nesta artéria (subcapítulo 1.7).

Por fim, aborda-se a HTA, nomeadamente a sua terapêutica atual e perspectivas futuras e a relação desta patologia com o sistema nervoso simpático e os recetores adrenérgicos (subcapítulo 1.8).

1.1 Sistema nervoso simpático

O sistema nervoso autónomo (SNA) tem três divisões principais: simpática (SNS), parassimpática (SNP) e entérica (SNE). O SNA transmite todas as informações importantes do sistema nervoso central (SNC) para o resto do organismo e encontra-se praticamente fora da influência do controlo voluntário. É responsável pela contração da musculatura lisa, batimentos cardíacos e metabolismo energético, entre outros.

Os efeitos gerais do SNS são: midríase, inibição da salivação, relaxamento dos brônquios, aceleração dos batimentos cardíacos, inibição da atividade estomacal, estimulação da produção de glicose, inibição do peristaltismo e relaxamento da bexiga.

Ao nível cardiovascular, o SNS é responsável pela vasoconstrição e vasodilatação que controlam a pressão sanguínea e a resistência vascular periférica (RVP). Sob influência do SNS, a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo) e a força de contração (efeito inotrópico positivo) podem aumentar. O sistema arterial, particularmente as arteríolas, é mais densamente innervado pelo sistema simpático do que o sistema venoso. A vasoconstrição simpática é particularmente marcada no sistema renal, leitos vasculares cutâneos e músculos esqueléticos.

O sistema simpático é composto por dois tipos de neurónios: pré e pós-ganglionares.

Os neurónios pré-ganglionares simpáticos estão localizados na coluna intermediolateral das regiões lombares e torácicas da medula espinal. Os seus axónios deixam o SNC para entrar nas cadeias paraventrales dos dois lados da coluna vertebral. Os neurónios pós-ganglionares também estão localizados nos gânglios paraventrales que se encontram perto da aorta e das suas ramificações abdominais principais. Os gânglios paraventrales são estruturas difusas que fazem parte dos plexos autónomos do abdómen e pélvis.

As fibras pós-ganglionares terminam em órgãos efetores, onde libertam principalmente noradrenalina (NA), razão pela qual estes neurónios pós-ganglionares são denominados adrenérgicos. As fibras simpáticas também controlam a medula supra-renal. A medula supra-renal é uma parte essencial do sistema simpático, tal como as células cromafins na medula semelhantes a neurónios pós-ganglionares sem axónio. As células cromafins expressam uma enzima que converte a NA em adrenalina (A). Assim, a A alcança as células alvo e os órgãos como uma hormona via circulação enquanto a NA deriva dos nervos simpáticos e, numa dimensão menor, da medula supra-renal [1].

1.2 Catecolaminas

1.2.1 Descoberta

Em 1856, *Vulpian* aplicou uma solução de cloreto de ferro em porções de glândula supra-renal e notou que a medula ganhava uma coloração verde enquanto o córtex não. Também observou que a mesma reação ocorria em amostras de sangue venoso que saem da supra-renal mas não no sangue arterial que entra na glândula. *Vulpian* assumiu que a medula sintetizava uma substância que era libertada para a circulação [2].

Em 1895, *Oliver e Schäfer* demonstraram a primeira ação farmacológica das catecolaminas com a administração de extratos de glândula adrenal e o consequente aumento da pressão arterial [3].

Abel e Crawford, em 1897, denominaram o composto encontrado de "epinefrina" [4]. No entanto, o derivado mono-benzóico isolado foi menos ativo que os extratos e a busca para o composto bioativo continuou. Em 1901, *Takamine*, isolou o princípio ativo e designou-o de "adrenalina" [5].

1.2.2 Definição e caracterização

As catecolaminas são compostos que contêm um grupo catecol (um anel benzeno com dois grupos hidroxilo adjacentes) e uma cadeia lateral amino [1,6]. Do ponto de vista farmacológico, as catecolaminas mais importantes são: a NA, o principal transmissor das fibras pós-ganglionares libertado pelas terminações nervosas simpáticas; a A, a maior hormona secretada pela medula supra-renal e a dopamina, o precursor metabólico da noradrenalina e adrenalina, também transmissor/neuromodulador no sistema nervoso central [6]. As três aminas são chamadas de catecolaminas biogénicas e estão envolvidas na regulação da coordenação motora e da memória, regulação do ciclo do sono bem como nas funções viscerais e endócrinas [7]. A isoprenalina/isoproterenol é uma catecolamina, uma vez que é um derivado sintético da NA não encontrado no organismo, mas não faz parte das aminas biogénicas porque não tem uma cadeia lateral amino [6,7].

A NA é um neurotransmissor que se encontra no sistema nervoso periférico e SNC, onde regula uma variedade de processos fisiológicos que incluem o humor, a aprendizagem e a

memória, a quantidade de sangue que chega aos tecidos e o metabolismo e está diretamente envolvida na regulação do sono, agressividade e no grau geral de alerta e excitação do organismo [7,8]. A sua principal função é orquestrar a resposta do corpo ao stresse, que culmina num aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (PA), melhor mobilização de energia e reflexos neuroniais. Os nervos simpáticos dos rins e do músculo esquelético são as principais fontes de NA [7-9].

A A, muitas vezes tratada apenas como uma hormona endócrina, também é um neurotransmissor libertado nos neurónios adrenérgicos centrais e periféricos [10-12]. É responsável pelos processos metabólicos e fisiológicos que se iniciam em resposta ao stresse [7]. É muito ativa no coração e nos pulmões, é responsável pelo redirecionamento do sangue da pele para os músculos esqueléticos e tem um efeito estimulador importante no metabolismo do glicogénio no fígado [7,13]. É indispensável para manter a pressão sanguínea normal e pelas respostas cardíacas ao stresse [14,15]. Os neurónios que sintetizam A estão envolvidos na homeostase cardiovascular, tanto em condições fisiológicas como patofisiológicas [16-19].

Nos adultos, a A representa aproximadamente 80% do conteúdo de catecolaminas na medula supra-renal e a NA representa cerca de 20% [20].

1.2.3 Síntese

A síntese das catecolaminas (fig.1) inicia-se no citoplasma das células nervosas simpáticas, ou de células cromafins, pela hidroxilação do carbono 3 de uma molécula de tirosina, através da ação da hidroxilase da tirosina, que fica ativa após estimulação dos nervos simpáticos e/ou da medula supra-renal, para formar L-3,4-dihidroxifenilalanina [9].

Esta, por sua vez, é descarboxilada para formar dopamina, pela descarboxilase dos aminoácidos aromáticos. Posteriormente, pode ser transportada para vesículas secretoras, onde é β -hidroxilada pela β -hidroxilase da dopamina para dar origem à NA. A NA, em grande parte, é N-metilada pela N-metiltransferase da feniletanolamina [21], enzima citoplasmática presente sobretudo na medula supra-renal, dando origem à A.

A A é transportada para as vesículas, onde é armazenada juntamente com a NA.

Nos neurónios adrenérgicos, as enzimas que participam na formação de NA são sintetizadas nos corpos dos neurónios e são depois transportadas ao longo do axónio para os seus terminais [22,23].

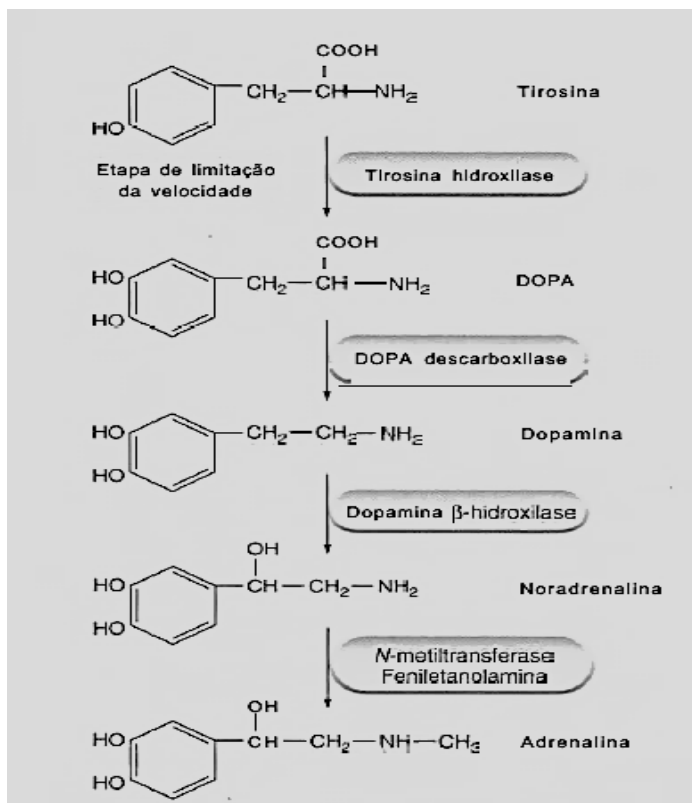


Fig.1- Esquema da via sintética da A a partir da tirosina. Indicação da enzima responsável por cada etapa da transformação. (Adaptado de: Rang, *et al.*, 2003)

1.2.4 Armazenamento e transporte

Nos neurónios, as catecolaminas estão contidas em vesículas e, na medula supra-renal, estão armazenadas em grânulos cromafins.

O processo de armazenamento diminui o metabolismo intraneuronal dos transmissores e a sua fuga para fora da célula, o que permite controlar o gradiente de concentração através da membrana do plasma e evitar possíveis efeitos tóxicos que possam ocorrer quando a concentração citoplasmática de catecolaminas excede determinado nível [24,25]. O processo de armazenamento é mediado por transportadores específicos vesiculares [25-27] (fig.2, secção 1.2.6).

O transportador vesicular de monoaminas (VMAT) é responsável pelo transporte de catecolaminas para vesículas de armazenamento. Existem duas isoformas do VMAT estreitamente relacionadas: o VMAT-1, presente principalmente nas células endócrinas e parácrinas e o VMAT-2, predominante no sistema nervoso. Este transporte vesicular é regulado pelo pH, por gradientes de potencial que são estabelecidos por bombas de prótons dependentes de ATP, entre outros [28-33].

As reservas de catecolaminas são repostas, além da síntese de novas moléculas, por transporte ativo, através do transportador da noradrenalina (NET) [34], que recapta as catecolaminas previamente libertadas para o terminal pré-sináptico. Para além do NET, existem também transportadores que captam as catecolaminas para células extraneuronais. O transportador extraneuronal de monoaminas (EMT) é o mais importante. Cerca de 5% das catecolaminas são captadas por ele e as restantes, cerca de 8%, sofrem difusão para a circulação.

Os neurónios utilizam as alterações do NET para se adaptarem às mudanças na transmissão. Estudos cinéticos mostram que a ligação do Na^+ e do Cl^- ao NET é um pré-requisito para o substrato se ligar ao transportador [36]. O gradiente de Na^+ ao longo da membrana plasmática é a força motora que dita a direção (normalmente para dentro) do transporte de neurotransmissores. O potencial negativo da membrana intracelular também contribui para a força motora mencionada anteriormente e é criada principalmente pelo gradiente de K^+ . O NET tem maior afinidade para a NA do que para a A [37-39].

A captação extraneuronal, torna-se particularmente importante na remoção de catecolaminas libertadas em tecidos onde existe uma elevada concentração de recetores adrenérgicos.

A A é predominantemente inativada pelo transporte extraneuronal quando secretada diretamente para a corrente sanguínea da medula supra-renal, ao contrário da NA que é maioritariamente recaptada pela via neuronal [38].

1.2.5 Libertação

A despolarização do terminal do axónio provoca a libertação de catecolaminas na fenda sináptica (fig.2, secção 1.2.6). O conteúdo das vesículas (polar), incluindo enzimas, neurotransmissores e hormonas, é libertado para o exterior através de um processo denominado exocitose. Esta libertação é desencadeada pela ação da acetilcolina, libertada por fibras pré-ganglionares. Nas células cromafins da medula supra-renal, a acetilcolina liga-se a recetores nicotínicos e permite o aumento do Ca^{2+} citosólico, através do seu influxo por canais dependentes de voltagem.

Assim, ocorre a libertação de Ca^{2+} a partir de reservas intracelulares (principalmente do retículo endoplasmático), promovendo a fusão das membranas das vesículas com a membrana celular, com subsequente exocitose das catecolaminas [35].

1.2.6 Metabolismo

As duas principais enzimas envolvidas na degradação das catecolaminas (fig.2) são a monoamino oxidase (MAO), localizada na membrana externa da mitocôndria nos neurónios [40] e em células extraneuroniais [34], e a catecol-O-metiltransferase (COMT) que se encontra em células extraneuroniais (fígado, rins e células cromafins) [41,42].

A MAO é uma flavo-proteína com o dinucleótido adenina flavina como cofator [43] e tem duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B. A A e a NA são substratos preferenciais da MAO-A [44, 45].

A COMT é uma enzima intracelular que catalisa a transferência de um grupo metil da S-adenosil-L-metionina para um dos grupos hidroxilo no catecol, na presença de Mg^{2+} [42].

O principal mecanismo que reduz o tempo de vida das catecolaminas no espaço extracelular é a captação por transporte ativo e não o metabolismo enzimático [46-48]. Apenas quando a MAO e a COMT estão ambas inibidas ou sujeitas a concentrações saturantes de substrato, é que a eliminação das catecolaminas pelo organismo é afetada significativamente [49].

O transportador VMAT-2 (mencionado na secção 1.2.4) tem maior afinidade para a NA que a MAO o que implica que, mais de 70% da NA recaptada pelo NET, é sequestrada para vesículas de transporte antes de ser metabolizada [50]. Assim, em condições fisiológicas normais, a inibição da MAO tem um efeito pouco relevante [51,52].

Tanto nas células neuroniais como extraneuroniais, a inativação das catecolaminas ocorre de uma forma coordenada, com a captação seguida de metabolismo [52]. A maioria do metabolismo ocorre nas mesmas células onde as catecolaminas são produzidas, mesmo antes da sua libertação exocítica [35].

O 3,4-dihidroxi-feniletilenoglicol (DHPG) é o principal metabolito da NA antes da libertação ou recaptção da NA e é também um metabolito desaminado da A. É formado no citoplasma dos nervos simpáticos a partir da NA por desaminação sequencial da NA pela MAO para formar dihidroxifenilglicolaldeído. Este é posteriormente reduzido pela aldeído redutase ou aldose redutase, para formar DHPG ou é oxidado pela aldeído desidrogenase para formar ácido 3,4-dihidroxi-mandélico. Nas células extraneuroniais, o DHPG é metabolizado pela COMT para formar 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) ou vai diretamente para a corrente sanguínea [48, 53]. A A é preferencialmente metabolizada pela COMT, dando origem à metanefrina e esta pode ser, mais tarde, metabolizada pela MAO a 3-metoxi-4-hidroxi-fenil-glicolaldeído e pela aldeído redutase, para formar MHPG. Este é também metabolizado e pode ser transformado em ácido vanilmandélico (VMA) pela álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase. O VMA é o principal metabolito das catecolaminas na urina. Todos os metabolitos das catecolaminas são inativos [53].

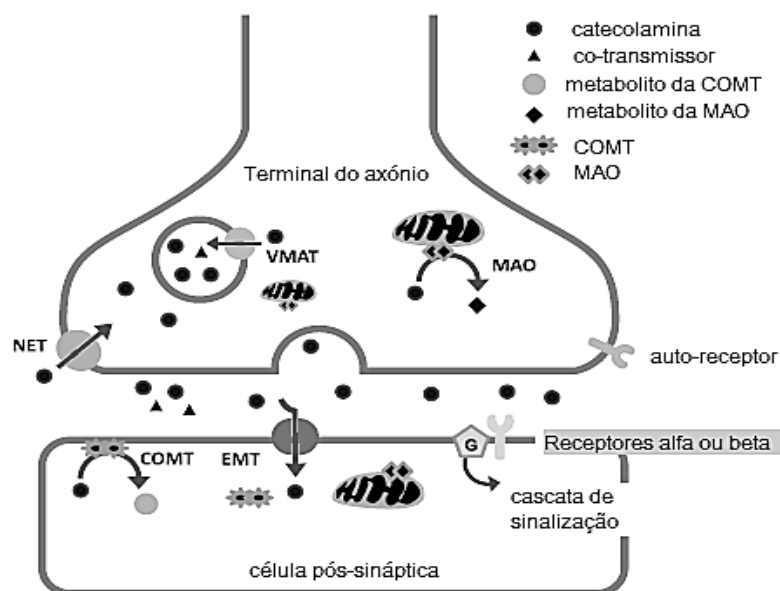


Fig.2- Catecolaminas no terminal do axônio. Este tem armazenamento de neurotransmissores (catecolaminas) e cotransmissores. Legenda: COMT- catecol-O-metiltransferase, MAO- monoamino oxidase, EMT- transportador extraneuronal de monoaminas, VMAT- transportador vesicular de monoaminas, NET- transportador da noradrenalina. (Adaptado de: *Costa, et al., 2012*)

1.3 Recetores adrenérgicos e proteínas G

Foi *Langley* em 1905 [54] quem propôs, pela primeira vez, a ideia de recetores de transmissão, ao afirmar que os fármacos e os impulsos nervosos não atuavam diretamente no músculo mas sim em “substâncias acessórias” a que mais tarde se referiu como “substâncias recetivas”. Hoje em dia, os recetores da NA e A são denominados recetores adrenérgicos [55] e localizam-se na membrana de algumas células.

Existem dois grandes tipos de recetores adrenérgicos: alfa (α) e beta (β). Os recetores alfa são divididos em dois subgrupos, α_1 e α_2 , e os recetores beta em três subgrupos, β_1 , β_2 e β_3 [56]. Os recetores α_1 e α_2 ainda se subdividem em α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} e α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} , respetivamente [57].

A resposta que se segue à ativação dos recetores adrenérgicos por catecolaminas endógenas ou substâncias agonistas exógenas resulta dos efeitos mediados pelas proteínas G com a geração de segundos mensageiros e/ou ativação de canais iónicos [58] (fig.3).

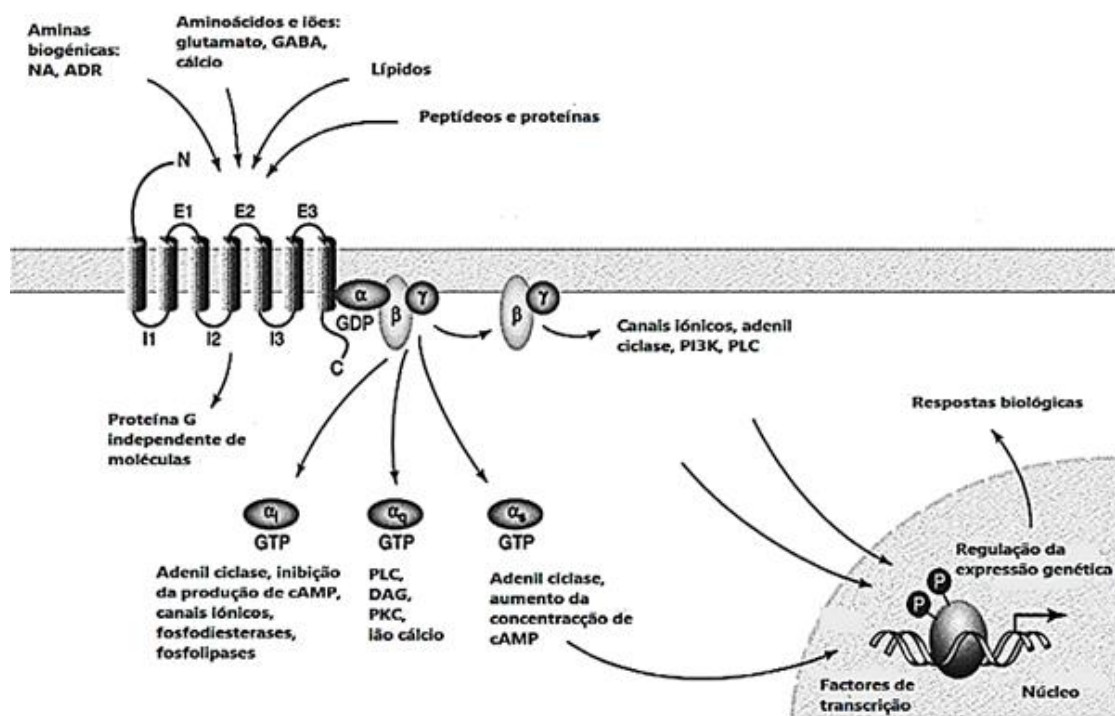


Fig.3- Ciclo de ativação das proteínas G heterotriméricas (subunidades α , β e γ), com os seus sete domínios transmembranares, 3 “loops” extracelulares e 3 “loops” intracelulares. Representação das vias de sinalização desencadeadas pelos GPCR com a proteína G_i , G_q e G_s . (Adaptado de: cell.com/cms.jpg)

As proteínas G são heterotriméricas e consistem em duas unidades funcionais: a guanina de ligação ao nucleótido, subunidade $G\alpha$ e o dímero $G\beta\gamma$ [59-64]. Contêm sete domínios transmembranares que estão ligados por três “loops” inter-helicais em cada lado da membrana: três extracelulares com o terminal “N” extracelular e três intracelulares com o terminal “C” citoplasmático. Estes terminais da subunidade $G\alpha$, são os locais chave para o acoplamento [61]. Quando ocorre ativação, o heterotrímero dissocia-se nas unidades funcionais que modulam a atividade de um elevado número de efetores. Estas proteínas são tipicamente divididas em quatro classes principais de acordo com a semelhança da primeira sequência primária de $G\alpha$: $G_{\alpha s}$ (estimuladora), $G_{\alpha i}$ (inibitória), $G_{\alpha q/11}$ e $G_{\alpha 12}$. A função dos recetores acoplados a proteínas G é catalisar a troca de GDP por GTP na subunidade alfa. [62-65].

1.3.1 Recetores adrenérgicos α_1

Estão acoplados à proteína $G_{\alpha q/11}$ com consequente ativação da fosfolipase C (PLP C). Esta, por sua vez, promove a hidrólise do bifosfato fosfatidilinositol produzindo trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Este atua como segundo mensageiro e medeia a libertação de Ca^{2+} de reservas não mitocondriais e ativa outras vias de sinalização. De seguida, o DAG ativa a proteína cinase C (PC C) [57,66,67].

Os três subtipos de recetores α_1 têm diferentes afinidades no acoplamento com a proteína G que segue a ordem: $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$ [66,67].

Os recetores α_1 são encontrados no músculo liso dos vasos sanguíneos, brônquios, trato intestinal, útero e bexiga. Geralmente a sua ativação provoca vasoconstrição por contração do músculo liso vascular, relaxamento do músculo liso gastrointestinal (exceção), secreção salivar e glicogenólise hepática [86].

1.3.2 Recetores adrenérgicos α_2

Acoplam predominantemente com a proteína G_i , inibindo a atividade da adenilciclase (ADC) [68,72]. A sua estimulação pode levar à ativação do mecanismo de troca Na^+/H^+ [73], inibição da abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem [69] ou ativação dos canais de K^+ [70]. O efeito final das vias mencionadas é a hiperpolarização da membrana plasmática.

Os recetores α_2 quando localizados pré-sinápticamente, são responsáveis pela inibição da transmissão nervosa designando-se autorecetores porque são ativados pela primeira substância libertada pelos terminais nervosos, geralmente a NA. O mecanismo de inibição de libertação de NA envolve a inibição da entrada do Ca^{2+} responsável pela fusão vesicular e pela transmissão nervosa [35,92].

Nos tecidos periféricos, localizam-se nas células do músculo liso, nos adipócitos e nas células epiteliais secretoras. A sua ativação leva à agregação plaquetar, contração do músculo liso e inibição da libertação de insulina. [86] O recetor adrenérgico α_{2C} parece ter uma ação importante no sistema nervoso central, em distúrbios psiquiátricos, na função motora e memória.

Atualmente são utilizados agonistas dos recetores α no tratamento da congestão nasal [57,71] e, no caso do tratamento de outras doenças como a hipertensão arterial (HTA) ou a hipertrofia benigna da próstata, podem ser utilizados antagonistas destes recetores adrenérgicos [7,67].

1.3.3 Recetores adrenérgicos β

Todos os subtipos acoplam com a proteína G_s estimulatória, com posterior ativação da ADC e acumulação do segundo mensageiro, a adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (cAMP) [74-76]. Por sua vez, o aumento de cAMP promove a ativação da PC A com fosforilação de várias proteínas cuja função é alterada. No entanto, em determinadas circunstâncias, os recetores β (principalmente os β_2) também podem acoplar com a proteína G_i [77,78].

Os recetores adrenérgicos β_1 encontram-se principalmente no coração [7,86]. Os recetores adrenérgicos β_2 estão presentes maioritariamente no músculo liso dos vasos sanguíneos. Também são responsáveis pela glicogenólise e tremor muscular [86]. A estimulação pré-juncional destes recetores leva à libertação de NA pelos terminais sinápticos [87]. Os recetores adrenérgicos β_3 estão presentes no tecido adiposo, onde iniciam a lipólise no tecido adiposo branco. Estão envolvidos no processo de termogénese que ocorre no tecido adiposo castanho e também estão presentes no coração [86,88,89].

Atualmente a estimulação seletiva dos recetores β pode ser utilizada como terapêutica no caso da asma e da insuficiência coronária e são utilizados antagonistas destes recetores no tratamento da HTA [86].

1.3.4 Agonismo e antagonismo

A ativação do recetor é feita através de determinadas substâncias que provocam a sua mudança conformacional [79,82-84]. Desta forma, o recetor pode existir na sua forma não funcional ou na sua forma ativa [81].

Os agonistas são substâncias que têm afinidade para a forma ativa do recetor e estabilizam-na. Possuem, também, a capacidade de ativar os seus recetores específicos, isto é, têm atividade intrínseca.

Os antagonistas têm afinidade para os seus recetores específicos como os agonistas, mas não têm atividade intrínseca. Os antagonistas competitivos não induzem um efeito mas antagonizam o efeito dos agonistas, por ocuparem os lugares destes nos seus recetores. Assim, concentrações mais elevadas de agonistas são necessárias para manter um certo efeito. No caso dos antagonistas não competitivos, ocorre uma ligação ao recetor de forma irreversível que, mesmo aumentando a concentração de agonista, há sempre uma diminuição do efeito do agonista [81]. O efeito destes dois tipos de antagonismo, na presença de um agonista num dado recetor, está representado na fig.4.

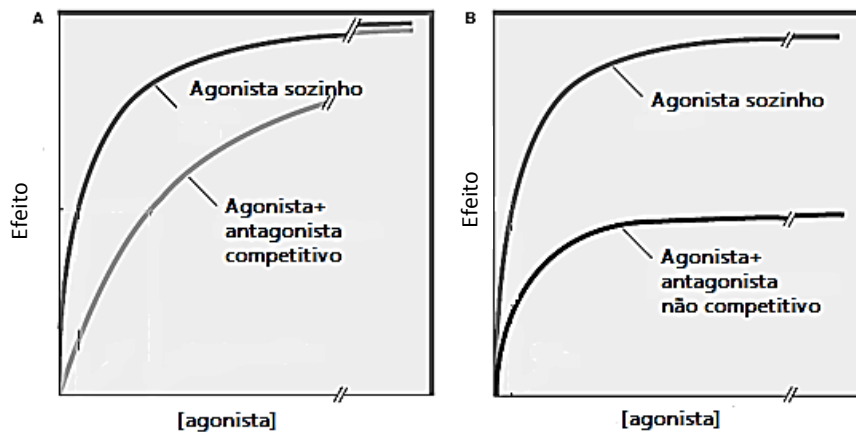


Fig.4- **A)** Comparação da curva efeito vs. [agonista] de um agonista e de um agonista na presença de um antagonista competitivo. Ocorre um desvio da curva para a direita. **B)** Comparação da curva efeito vs. [agonista] de um agonista e de um agonista na presença de um antagonista não-competitivo. Observa-se uma diminuição irreversível do efeito máximo do agonista. (Adaptado de: *Katzung, et al., 2012*)

Os compostos com uma atividade intrínseca intermédia, denominados agonistas parciais, têm um efeito menor que o efeito máximo obtido com agonistas totais, mesmo na saturação máxima dos recetores. A afinidade que este tipo de agonistas têm para o recetor, é menor do que a de um agonista total [81]. Um agonista parcial pode deslocar um agonista total do local ativo do recetor (reduzir o seu efeito) e assim comportar-se como um antagonista, por exemplo, quando a concentração de catecolaminas endógenas é elevada.

Relativamente aos agonistas e antagonistas dos recetores adrenérgicos, a molécula de NA pode ser modificada de diversas maneiras diferentes, para produzir compostos que interajam com eles. Em contraste com a situação observada para os agonistas, os antagonistas dos recetores adrenérgicos são, na sua maioria, seletivos para os tipos e subtipos de recetores α ou β [1].

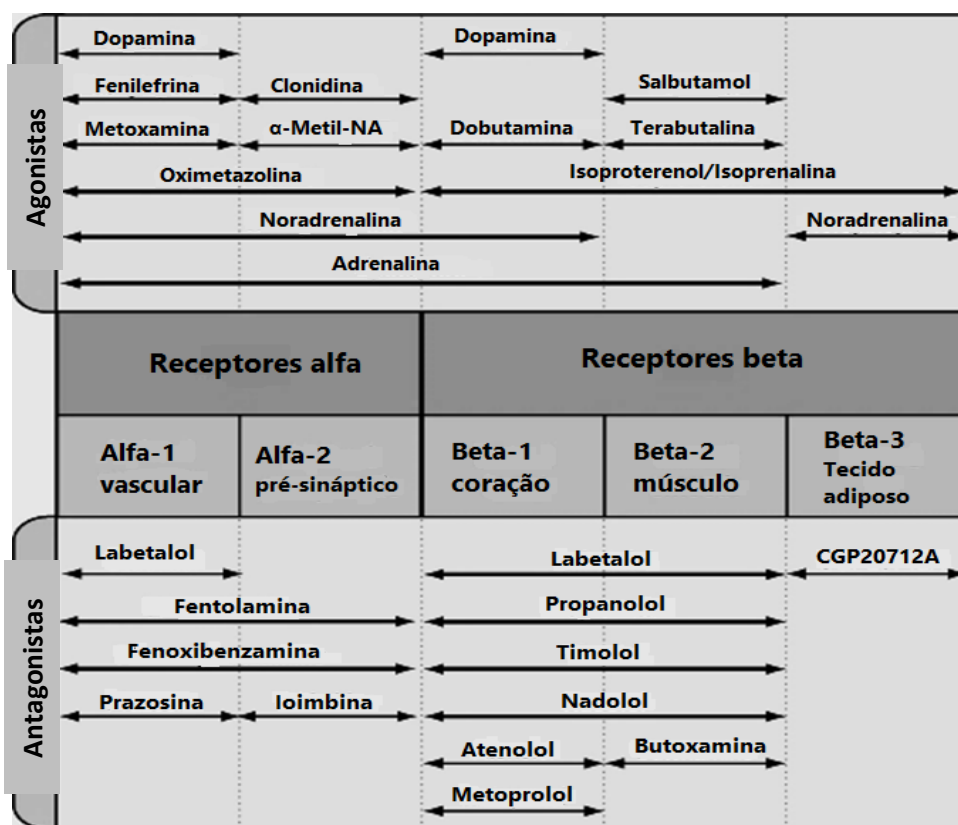


Fig.5- Agonistas e antagonistas seletivos para os tipos e subtipos de recetores adrenérgicos. (Adaptado de: *courses.washington.edu.gif*)

1.3.5 Regulação

O fim da ação de um fármaco é o resultado de vários processos. Em alguns casos, o efeito dura apenas o tempo que o fármaco ocupa o recetor. Noutros casos, contudo, a ação pode persistir depois de o fármaco se dissociar do recetor porque, por exemplo, outra molécula está ainda acoplada à forma ativa do recetor. No caso dos fármacos que se ligam covalentemente ao local ativo do recetor, o efeito pode persistir até o complexo recetor-fármaco ser destruído e serem sintetizados novos recetores ou enzimas. [81]

Muitos sistemas têm mecanismos de dessensibilização para prevenir uma ativação excessiva.

A dessensibilização dos recetores é um processo regulatório em que há a diminuição da resposta dos recetores a um ou mais agentes. Existem dois tipos de dessensibilização: a homóloga, em que a diminuição da resposta é observada apenas no recetor originalmente estimulado e a heteróloga, onde a diminuição da resposta é observada num agente ou agentes não relacionados com o estímulo inicial [117].

A dessensibilização homóloga é iniciada pela fosforilação desses recetores por uma família de cinases, seguida da ligação de arrestinas- β aos recetores previamente fosforilados. A arrestina facilita a internalização dos recetores em vesículas endossómicas [116].

A dessensibilização heteróloga é iniciada por cinases dependentes de segundos mensageiros como a PC A ou C [61].

Após um tempo considerável de estimulação do recetor, ocorre uma diminuição na densidade de recetores, geralmente referida como “down-regulation”. Vários mecanismos podem estar envolvidos, como a degradação lipossomal, a proteólise mediada por ubiquitina e a destabilização do mRNA dos GPCRs [61].

Em algumas situações, os recetores são sujeitos a estimulação durante um período de tempo muito prolongado e a diminuição e/ou dessensibilização dos recetores, que geralmente são processos de regulação, pode(m) tornar-se irreversível/irreversíveis.

1.3.6 Fatores que promovem alterações

A) Idade

Os recetores estão sujeitos a uma estimulação crónica e, por isso, pode ocorrer uma dessensibilização dos recetores adrenérgicos, mais notória nos recetores β .

O aumento da atividade simpática com a idade desenvolve-se lentamente, os níveis de NA plasmática aumentam apenas 10 a 15% por década [107]. Pode haver uma diminuição da função dos recetores β devido a uma diminuição da densidade de recetores β_1 [108] (menor acoplamento com a proteína G) ou devido a uma diminuição da ADC [109].

No entanto, qualquer mecanismo parece resultar numa diminuição da formação de cAMP, após estimulação dos recetores β [105]. Também estão descritos mecanismos de dessensibilização, que envolvem a fosforilação dos recetores β pela PC A ou pela cinase dos recetores β [160].

B) Insuficiência cardíaca crónica

Neste caso, a atividade simpática aumenta muito rapidamente e os níveis de NA no plasma são muito maiores do que no caso anterior. Ocorre uma diminuição da resposta funcional dos recetores β cardíacos, que pode estar relacionada com uma diminuição na densidade destes recetores [105]. Também neste caso, estão descritos mecanismos de dessensibilização que envolvem a fosforilação dos recetores β pela PC A ou pela cinase dos recetores β [160].

A atividade da proteína G_i parece estar aumentada, enquanto o transportador neuronal de captação de NA, que causa a libertação de NA para os nervos simpáticos, apresenta níveis baixos [105]. Esta diminuição resulta num aumento da concentração de NA que também pode contribuir para a dessensibilização dos recetores β [105, 110]. São principalmente os recetores β_1 que sofrem uma dessensibilização e a densidade de recetores α_1 parece aumentar, os níveis no coração passam de cerca de 11% para 25% [111,112].

Existem alguns estudos com evidências sobre a importância dos polimorfismos genéticos dos recetores β_1 e β_2 . Os polimorfismos não mostram ter um papel fundamental como genes causadores de doenças mas podem ser fatores de risco e influenciar a progressão da doença bem como a resposta do organismo a determinados fármacos [105].

1.4 Recetores adrenérgicos no sistema cardiovascular

A localização e os efeitos principais dos tipos e subtipos de recetores adrenérgicos α e β no sistema cardiovascular, quando sujeitos a ativação, encontram-se representados nas tabelas 1 e 2, respetivamente.

O principal efeito da estimulação dos recetores adrenérgicos α_1 pelas catecolaminas é o aumento da força de contração. No entanto, no coração humano saudável, este tipo de recetor representa apenas cerca de 10% de todos os recetores adrenérgicos presentes nos cardiomiócitos [85].

Os recetores adrenérgicos α_{1A} têm uma expressão predominante nos cardiomiócitos [111,172]. Os recetores adrenérgicos α_{1D} , para além dos efeitos referidos na tabela 1, também parecem estar envolvidos na angiogénese [113].

Os efeitos inotrópicos positivos (aumento da força de contração) máximos que seguem a estimulação dos recetores adrenérgicos α_1 , são muito menores que os evocados pela estimulação dos recetores adrenérgicos β , em corações saudáveis.

Os recetores adrenérgicos α_2 ainda não estão bem caracterizados no coração [97].

Parecem estar presentes nos vasos sanguíneos e a sua ativação pode promover vasoconstrição. No entanto, este efeito mostra-se apenas local, quando são administrados agonistas destes recetores através de injeções intravenosas rápidas ou doses orais elevadas. Quando administrados ao nível sistémico, os efeitos vasculares são minimizados pelos efeitos centrais dos recetores α_2 , a inibição do tónus simpático e a diminuição da pressão sanguínea.

Assim, apesar das características vasoconstritoras dos recetores adrenérgicos α , os recetores α_2 são também propostos como vasodilatadores indiretos [119]. A estimulação dos recetores α_{2A} e α_{2C} nos terminais nervosos cardíacos promove inibição da libertação de NA [172].

Tabela 1: Localização e efeitos principais dos tipos e subtipos de recetores α no sistema cardiovascular.

Recetores α	Localização principal	Efeitos
α_{1A} *	Músculo liso vascular; Músculo cardíaco	Vasoconstrição; Efeitos inotrópicos positivos
α_{1B} *	Músculo cardíaco	Efeitos inotrópicos positivos
α_{1D} *	Músculo liso vascular	Vasoconstrição
α_{2A} ‡	Terminais nervosos cardíacos	Inibição da libertação de NA
α_{2B} ‡	Músculo liso vascular	Vasoconstrição/ Vasodilatação indireta
α_{2C} ‡	Terminais nervosos cardíacos	Inibição da libertação de NA

Legenda: *- informação sobre a localização e efeitos destes recetores retirada de [90-93,111]; ‡- informação sobre a localização e função destes recetores retirada de [92,94-96,172].

Os recetores adrenérgicos β_1 e β_2 têm um papel fundamental na manutenção das funções do coração, principalmente os recetores β_1 que perfazem cerca de 75 a 80% de todos os recetores presentes no coração [85]. Os recetores adrenérgicos β_2 são responsáveis maioritariamente pelo relaxamento do músculo liso [98].

O tecido cardíaco expressa recetores β_1 e β_2 a um nível muito maior que todos os outros. A razão dos recetores $\beta_1:\beta_2$ é cerca de 70%:30% nas aurículas e 80%:20% nos ventrículos. Os recetores adrenérgicos β controlam o crescimento e morte dos cardiomiócitos, contribuindo para a remodelação cardíaca [100].

A ativação dos recetores adrenérgicos β_1 leva a efeitos inotrópicos, cronotrópicos, lusitrópicos e dromotrópicos positivos (aumento da força de contração, aumento da frequência cardíaca, diminuição do período de relaxamento e aceleração da condução do impulso através do nóculo aurículo-ventricular, respetivamente) [114]. A estimulação excessiva dos recetores adrenérgicos β_1 pode causar necrose, apoptose e morte, contribuindo para a insuficiência cardíaca enquanto os recetores β_2 têm uma ação oposta,

capaz de proteger os cardiomiócitos de apoptose [101,102,114]. Estes recetores são o mecanismo fisiológico mais potente para aumentar o desempenho cardíaco [105,106].

Os efeitos dos recetores adrenérgicos β_3 , no sistema cardiovascular, são menores e menos unânimes que os efeitos descritos para os recetores adrenérgicos β_1 e β_2 .

Contudo, a estimulação dos recetores adrenérgicos β_3 parece produzir efeitos opostos aos induzidos pelos recetores β_1 , como efeitos inotrópicos negativos e vaso-relaxamento pela via de sinalização do NO, [115]. Os recetores β_3 geralmente só são ativados com concentrações elevadas de catecolaminas, comparativamente aos outros subtipos [187] e têm mostrado resistência à dessensibilização. [188]. São necessários mais estudos sobre os recetores β_3 , uma vez que estão descritas várias propriedades que podem evidenciar um papel benéfico importante destes recetores adrenérgicos em patologias cardiovasculares [140].

Tabela 2- Localização e efeitos principais dos tipos e subtipos de recetores β no sistema cardiovascular.

Recetores β	Localização principal	Efeitos
B₁ *	Miocárdio	Efeitos inotrópicos, cronotrópicos, lusitropicos e dromotrópicos positivos
B₂ *	Músculo liso vascular	Vasodilatação
B₃ *	Miocárdio; Endotélio vascular	Efeitos inotrópicos negativos; Vasodilatação

Legenda: *- informação sobre a localização e efeitos principais destes recetores retirada de [80,89,103-106,124].

1.5 Recetores adrenérgicos no endotélio e no músculo liso vasculares

Os recetores adrenérgicos que existem a nível vascular, têm localizações preferenciais [124] (tabela 3), particularmente ao nível das artérias.

As artérias são os vasos que levam o sangue sob alta pressão para fora do coração e transportam-no até às arteríolas. As paredes das grandes artérias são mais espessas e com maior quantidade de tecido elástico, possibilitando maior resistência à pressão e, por isso, podem denominar-se vasos de condutância.

As arteríolas são artérias menores e regulam o fluxo de sangue que chega à microcirculação. Possuem uma parede muscular forte, capaz de ocluir completamente o vaso ou dilatá-lo para aumentar o fluxo sanguíneo. São, portanto, o principal ponto de resistência, (e, por isso, denominados vasos de resistência) periférica ao fluxo sanguíneo [175].

No caso dos recetores adrenérgicos β , a sua densidade aumenta com a diminuição do calibre das artérias coronárias. Os recetores β_1 encontram-se mais em artérias epicárdicas coronárias, de condutância; os recetores β_2 maioritariamente ao nível das arteríolas e a presença dos recetores β_3 tem sido demonstrada, ao nível vascular, em arteríolas [119].

Os recetores adrenérgicos α_1 encontram-se, predominantemente, em vasos maiores de condutância, enquanto os recetores α_2 se encontram, preferencialmente, na microcirculação [118,119].

Os recetores adrenérgicos β_1 medeiam o vaso-relaxamento adrenérgico através da ativação direta de células do músculo liso, onde têm uma ação mais acentuada, apesar de também existirem no endotélio. Os recetores β_2 , parecem ter uma localização mais destacada no endotélio, exercem a sua função através da libertação de NO [122]. Os recetores β_3 têm demonstrado uma ação vasodilatadora em células endoteliais, através da libertação de NO e hiperpolarização dos vasos. Os estudos sobre a sua localização no músculo liso vascular são reduzidos e inconclusivos [119].

Tal como os recetores adrenérgicos β_2 , os recetores α_2 têm sido associados com o vaso-relaxamento através da libertação de NO e parecem ter uma densidade maior no endotélio [119]. Os recetores adrenérgicos α_1 estão presentes no endotélio mas estão maioritariamente presentes nas células do músculo liso [123].

Tabela 3- Distribuição preferencial dos recetores ao nível arterial, no músculo liso e endotélio vasculares.

Recetores Adrenérgicos	Localização vascular principal	Músculo liso	Endotélio
α_1	Artérias	++	+
α_2	Capilares	+	++
β_1	Artérias	++	+
β_2	Arteriolas	+	++
β_3	Arteriolas	?	++

Legenda: O símbolo (+) representa a presença do subtipo de recetor nesse local; O símbolo (++) representa a localização preferencial do subtipo de recetor.

1.5.1 Contração e relaxamento dependentes do endotélio

A importância do endotélio na fisiologia e patologia está na sua capacidade para controlar e modular as funções vasculares gerais, incluindo o tónus vascular e a permeabilidade, homeostase e angiogénese [120]. Muitas doenças que perturbam a função vascular estão relacionadas com alterações no endotélio [171].

O endotélio é a monocamada mais interior dos vasos sanguíneos e é capaz de integrar toda a informação que chega da corrente sanguínea de uma forma dependente do tempo e do espaço, mantendo a homeostase, pela libertação de uma série de fatores específicos, como fatores de contração e relaxamento que incluem as catecolaminas, o NO, peptídeos vasoativos, espécies reativas de oxigénio, metabolitos do ácido araquidónico, endotelina, entre outros [121].

A endotelina-1 é um peptídeo libertado pelo endotélio, um agente vasoconstritor potente, particularmente nas arteriolas e estimula dois subtipos de recetor nas células do músculo liso: ET_A e ET_B. A endotelina-1 causa vasoconstrição via mecanismos relacionados com a proteína G semelhantes aos mecanismos ativados pela NA.

O NO tem um papel fundamental na homeostase do endotélio. Após a sua produção e libertação, difunde-se para o músculo liso vascular subjacente onde provoca vasodilatação através da ativação da enzima guanil ciclase (sGC) que cataliza a formação de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) e promove a ativação da PC dependente de cGMP [125].

Geralmente o NO é libertado das células endoteliais após a ativação da isoforma tipo 3 da NOS endotelial (eNOS), que é uma enzima dependente de calmodulina e Ca^{2+} [126].

No caso do vaso-relaxamento induzido pelos recetores adrenérgicos β_2 , a ativação da eNOS envolve cinases específicas como a PC A e a PC B [127].

O vaso-relaxamento produzido pelos recetores β_3 parece envolver o NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) [124]. Muitos dos fatores que levam à produção de NO também estimulam a libertação endotelial de prostaciclina e EDHF. A resposta do EDHF parece ocorrer devido ao aumento da concentração de Ca^{2+} endotelial que despoleta a síntese de NO e também abre os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} [171].

A estimulação farmacológica dos recetores α_2 leva à libertação de NO (com participação da proteína G_i), uma ação capaz de atenuar a vasoconstrição produzida pela ativação dos recetores α_1 [120]. Os recetores α_{2A} parecem ser os mais envolvidos no vaso-relaxamento dependente do endotélio [128, 129].

1.5.2 Contração e relaxamento independentes do endotélio

Neste caso ocorre um efeito direto nas células do músculo liso. O tónus do músculo liso vascular é altamente dependente do potencial da membrana, que é essencialmente determinado pela atividade dos canais de K^+ . Quando ocorre relaxamento, há uma ativação desses canais, com aumento do efluxo de K^+ que promove a hiperpolarização da membrana e, posteriormente, ocorre o fecho dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Como diminui a entrada de Ca^{2+} , o músculo liso vascular relaxa [124].

Uma das interações possíveis ligando-recetor que leva à contração do músculo liso, envolve a estimulação da PLP C. A PLP C cataliza especificamente a formação de dois segundos mensageiros, o trifosfato de inositol (IP_3) e o DAG. O IP_3 liga-se aos recetores no retículo sarcoplasmático e inicia a libertação de Ca^{2+} do citosol. O Ca^{2+} liga-se à calmodulina, causando mudanças conformacionais que permitem a interação deste complexo com a cadeia leve da miosina (MLC). Estes eventos, conseqüentemente, levam à ativação da cinase da MLC e fosforilação da MLC. O DAG, juntamente com o Ca^{2+} , ativa a PC C, que fosforila proteínas alvo específicas que têm efeitos promotores de contração [131]. A contração ocorre quando os microfilamentos de miosina, em presença de ATP,

deslizam sobre os filamentos de actina. Esta ação é finalizada com a desfosforilação da cadeia leve de miosina, pela fosfatase da cadeia leve de miosina [130].

O efeito de sensibilização do Ca^{2+} tem sido atribuído à ativação de proteínas G pequenas denominadas RhoA e o seu efetor, a cinase Rho. A proteína tem um ciclo entre uma forma inativa, ligada ao GDP e uma forma ativa, ligada ao GTP [132]. Quando está ativa, a cinase Rho promove a fosforilação de uma unidade da fosfatase da miosina, inibindo a atividade desta enzima e promovendo a fosforilação da cinase da miosina com consequente contração. A maioria do Ca^{2+} mobilizado para o músculo liso é modulado pelos canais de entrada de cálcio, como canais dependentes de voltagem e canais operados por recetores, e também por mecanismos de entrada de cálcio operados por reservas [131].

1.6 Recetores adrenérgicos na artéria mamária interna

1.6.1 Localização anatômica e caracterização

A artéria mamária interna (AMI) ou artéria torácica interna (ATI) (fig.6) deriva da artéria subclávia e localiza-se na face interna da parede anterior do tórax, irriga o peito e a parede torácica anterior. Os seus ramos mais finos vascularizam o diafragma e a parede abdominal. À medida que a artéria torácica desce ao longo do externo, dá origem às artérias intercostais anteriores.

A ATI é de extrema importância devido à sua intensa utilização nas cirurgias de revascularização coronária, por apresentar estabilidade funcional a longo prazo, quando comparada com a veia safena. A AMIH é, também, menos vulnerável ao desenvolvimento da doença aterosclerótica [133]. Não mostra quaisquer alterações na força de contração com o envelhecimento e é improvável que ocorra uma diminuição da sua reatividade, uma vez que os valores de pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar do agonista necessária para produzir metade do efeito máximo) para a NA, mantêm-se inalterados com o avançar da idade [134]

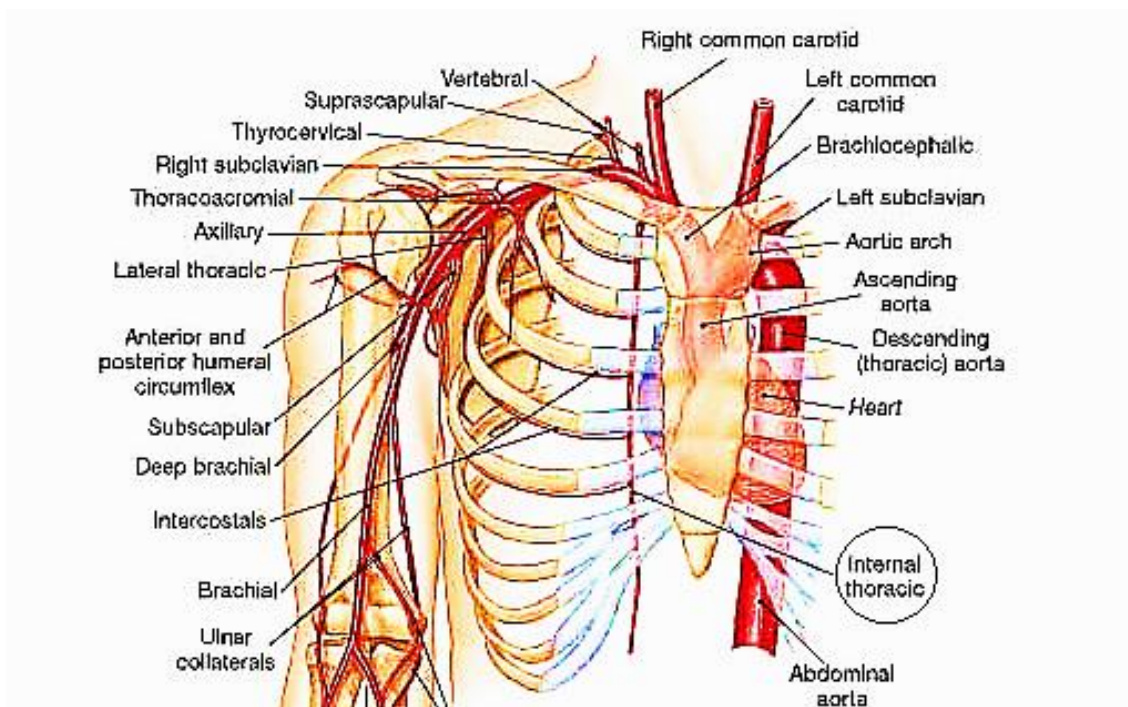


Fig.6- Localização da artéria torácica interna humana no aparelho circulatório. (Adaptado de: *intranet.tdmu.edu.ua*)

1.6.2 Estudos em artérias mamárias internas

Schoeffter, Dion e Godfraind (1988) estudaram o papel do endotélio vascular na contratibilidade de AMIHs isoladas. Concluíram que o endotélio não é essencial para o vaso-relaxamento induzido por alguns agentes mas modula as respostas contrácteis, provavelmente pela libertação espontânea basal de EDHF [184].

Os estudos realizados por *Bevilacqua, et al.* em 1991, com AMIHs isoladas de doentes que se submeteram a uma cirurgia de revascularização coronária, indicaram que a AMIH possui recetores adrenérgicos α_1 que estão envolvidos na resposta vasoconstritora às catecolaminas [135].

Rudner, et al. descreveram, em 1999, na AMIH, a expressão aumentada dos recetores α_{1B} com o avançar da idade. Assim, em pessoas com menos de 55 anos, os recetores α_{1A} dominam e com idades superior a 65 anos, os recetores α_{1B} passam a ter uma densidade comparativamente superior [137].

Segundo os estudos realizados por *Giessler, et al.* em 2002, em AMIHs, parecem ser os recetores α_1 os principais responsáveis por mediar a contração induzida pela NA, apesar de os α_2 também estarem presentes na AMI [136] e terem um papel minoritário nas contrações induzidas pela NA em vasos sanguíneos isolados [136, 142].

Giessler, et al. (2002) usaram concentrações de NA de 10^{-8} a 10^{-4} M nos seus estudos. Em anéis isolados de AMIH, utilizaram o antagonista seletivo dos recetores α_1 , prazosina (10^{-9} - 10^{-7}) e o antagonista seletivo dos recetores α_2 , ioimbina (10^{-6} M) que induziram um desvio para a direita da curva concentração-resposta da NA [136]. A prazosina apresentou uma antagonização mais potente das contrações induzidas pela NA na AMIH comparativamente à ioimbina [136]. Os antagonistas mencionados mostraram-se competitivos [136, 142].

Segundo *Giessler, et al.* (2002), em AMIH de doentes com mais de 65 anos, sujeitos a uma intervenção de revascularização coronária, os recetores adrenérgicos α_{1B} parecem ser os principais envolvidos, seguidos dos recetores α_{1A} . Os recetores α_{1D} parecem não estar envolvidos [136].

Em 2003, *Pešić, et al.* demonstraram que a remoção do endotélio da AMIH não modificou o efeito vasoconstritor, nem houve alteração significativa da contração máxima produzida pelos recetores α sujeitos à ação da A e da NA. O antagonista seletivo α_1 , prazosina (4×10^{-10} - 4×10^{-9} mol/l), e o antagonista seletivo α_2 , rauvolscina (10^{-6} - 10^{-5} mol/l) mostraram efeitos dependentes da contração e induziram um desvio para a direita das curvas concentração-resposta da A e da NA na AMIH com e sem endotélio. Deste modo, pode

concluir-se que os recetores α_1 se encontram, maioritariamente, no músculo liso da AMIH [142].

Estudos em artérias mamárias bovinas (Gow, Mitchell e Wait, 2003) confirmaram os resultados anteriores em AMIH [185].

Estudos em AMI de suínos saudáveis (Pagán, et al., 2012) também confirmaram os resultados obtidos em AMIHs e indicaram que as contrações mediadas pelos recetores α_1 e α_2 são moduladas pelo NO, por prostanóides contrácteis, pela endotelina e por outras substâncias libertadas pelo endotélio [186].

Estudos de He, et al. (1989), Ferro, Kaumann e Brown (1993), Pešić et al. (2003), Dessy, et al. (2004) e Rozec, et al. (2005), mencionam a presença dos recetores adrenérgicos β na AMIH [138-142]. A estimulação dos recetores β_1 e β_2 causou vaso-relaxamento [138].

Um estudo realizado por Molennar, et al. em 1988, demonstrou que, na AMIH, os recetores β_2 têm uma localização preferencial no endotélio e uma densidade reduzida nas células do músculo liso [177]. Através de autoradiografia (Molennar, et al. 1988), observou-se que, ao contrário do que se verifica no coração, a densidade dos recetores β no músculo liso da AMIH é reduzida e os recetores β_2 são predominantes em relação aos recetores β_1 [177].

Segundo He, et al. (1989) e Ferro, Kaumann e Brown (1993), comparando os dois subtipos, os recetores β_2 mostram-se mais importantes na indução de relaxamento da AMIH que os recetores β_1 [138,139]. A NA relaxou a AMIH com uma potência e eficácia significativamente menores que a A [138], pelo que se espera que a A tenha uma eficácia maior do que a NA nos recetores β_2 da AMIH [138].

Segundo Pešić, et al. (2003), a população dos recetores adrenérgicos β em comparação com os recetores α , na AMIH isolada, aparenta ser baixa [142].

Através de abordagens complementares de biologia molecular, bioquímica e farmacologia realizadas por Dessy, et al. (2004) e Rozec, et al. (2005), demonstrou-se a presença dos recetores β_3 na AMIH, capazes de, após estimulação, induzirem vaso-relaxamento envolvendo a via do NO e do EDHF [140,141]. Rozec et al. em 2005, mostraram que a localização preferencial dos recetores β_3 na artéria mamária interna humana é no endotélio, uma vez que a sua remoção afetou bastante a ativação destes recetores [140].

1.7 *Oxalis pes-caprae* L.

A *Oxalis pes-caprae* L. vulgarmente conhecida por erva-canária, erva-azeda-amarela ou trevo azedo, é uma planta da família *Oxalidaceae* oriunda da África do Sul e subspontânea na região mediterrânica e Europa Ocidental [143]. A invasão da *Oxalis pes-caprae* L. depende, parcialmente, da sua sensibilidade à disponibilidade de nutrientes e às interações competitivas com espécies nativas dominantes [144].

Em Portugal, esta planta é considerada uma espécie invasora (listada no anexo I do Decreto-Lei n.º 565/99, de 21 dezembro), sendo conhecida como infestante agrícola e inibe ainda a germinação de sementes de espécies nativas. Não suporta bem temperaturas extremas e a parte aérea morre nessas condições [169].

É também conhecida devido ao seu sabor amargo agradável. Esta acidez é causada pelo elevado teor em ácido oxálico [148]. O ácido oxálico ou ácido etanodióico (mais precisamente um ácido dicarboxílico) tem a fórmula molecular $H_2C_2O_4$. É um ácido orgânico saturado relativamente forte. É tóxico quando consumido em elevada quantidade e pode causar paralisia do SNC.

Esta planta contém um geófito cespitoso com um bolbo profundamente enterrado emitindo um caule anual, ascendente, subterrâneo, provido de bolbinhos e de uma roseta foliar à face do solo. A flor tem um cálice composto por cinco sépalas livres ou ligeiramente unidas e corola constituída por cinco pétalas de cor amarela, fundidas (fig.7).



Fig.7- *Oxalis pes-caprae* L., geralmente conhecida como erva-azeda-amarela.
(Adaptado de: [wikimedia.org/wikipedia/commons/Oxalis-pes-caprae](https://commons.wikimedia.org/wiki/Oxalis_pes-caprae))

O isolamento e a caracterização dos vários compostos das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. já foram descritos diversas vezes por *Dellagrecia, et al.* (2008-2010) [145-147]. De entre os compostos polifenólicos isolados, identificaram-se flavonóides [145-147].

1.7.1 Flavonóides

Os flavonóides são uma subclasse de polifenóis e caracterizam-se por terem dois anéis aromáticos nas extremidades e um heterociclo oxigenado no meio, com a estrutura básica C₆-C₃-C₆ [181]. Estes compostos são um grande grupo de metabolitos secundários das plantas que partilham uma característica fenilbenzopirona e são encontrados em plantas vasculares [148]. Têm uma série de propriedades farmacológicas e biológicas como anti-inflamatórias, anti-isquêmicas e quimioprotetivas. Têm atividade no SNC e atuam como “scavengers” de radicais livres [149].

Os flavonóides podem ser divididos em várias classes das quais fazem parte as flavonas [150]. As flavonas têm como base química estrutural a 2-fenil-1-benzopiran-4-ona. Têm três anéis com a estrutura básica C₆-C₃-C₆ e os anéis são referidos como A, B e C. As flavonas têm três grupos funcionais, grupos hidroxil, carboxi e ligações duplas conjugadas. São substâncias cristalinas incolores a amarelas, solúveis em água e etanol [191].

Derivados da luteolina e da apigenina (fig.8) estão presentes em legumes e frutas e têm sido descritos pela sua atividade semelhante a ansiolíticos [151,152], pelos efeitos antioxidantes (à medida que o número de hidroxilos neste tipo de moléculas aumenta, a atividade é maior), pelos efeitos anti-proliferativos, anti-tumorais, anti-microbiais, pela atividade anti-inflamatória e podem ter efeitos benéficos no cancro, nas doenças cardiovasculares e nos distúrbios neurodegenerativos [180,191].

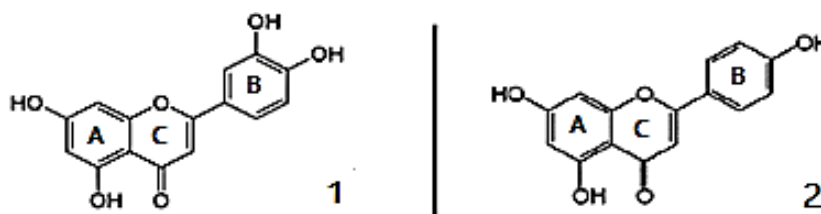


Fig.8: 1- Estrutura química da luteolina; **2-** Estrutura química da apigenina.
(Adaptado de: *oepm.es/imas/ImasTextos.png*)

1.7.1.1 Estudos sobre os efeitos cardiovasculares dos flavonóides

Occhiutto, et al. (1991), mostraram que os flavonóides produzem efeitos anti-arrítmicos e cronotrópicos positivos [153] e segundo *Beretz, Stoclet e Anton* (1980), *Laekeman, et al.* (1986) e *Ko, Huang e Teng* (1991) a maioria deles, possui efeitos vasodilatadores [154-156].

Estudos realizados por *Duarte, et al.* em 1993, na aorta de rato, mostraram que vários flavonóides, incluindo as flavonas luteolina e apigenina (10^{-6} - 10^{-3} M), relaxam as contrações induzidas pela NA (10^{-5} M) e KCl (80 mM) [157]. O grupo 4-carbonil aparenta ser importante para a atividade vasodilatadora e a ausência ou metilação do grupo hidroxilo na posição 3' parece levar a uma menor potência vasodilatadora [157].

Têm sido propostos vários mecanismos para explicar o relaxamento do músculo liso sujeito à ação de flavonóides. De entre eles: a diminuição da captação e entrada de Ca^{2+} nas células [157,158] e um efeito inibitório na fosfodiesterase do cAMP e da cGMP [154] ou na atividade da PC C [157]. No caso da apigenina, o seu efeito de relaxamento parece estar relacionado parcialmente com o aumento dos níveis de cGMP [157], e a luteolina pode ter um efeito inibitório às contrações induzidas pela NA que envolve o cAMP [157]. A remoção mecânica do endotélio não modificou as propriedades relaxantes dos flavonóides [157].

O estudo de *Abdalla, Zarga e Sabri* (1994) descreve os efeitos da luteolina no músculo liso vascular isolado do porquinho-da-Índia e os efeitos cardiovasculares nesses animais anestesiados. Em concentrações elevadas, a vasodilatação induzida pela luteolina predomina sobre os seus efeitos cardíacos estimulatórios, ocorrendo assim uma diminuição da pressão e volume sanguíneos [193]. Os efeitos da luteolina no coração parecem ser mediados pelo seu efeito inibitório na fosfodiesterase do cAMP [193].

Estudos epidemiológicos de *Riemersma, et al.* (2001) sugerem a correlação entre uma dieta rica em flavonóides e um risco baixo de doenças cardiovasculares coronárias [178].

Sucro, et al. (2004) descrevem as flavonas apigenina e luteolina como inibidores potentes da formação de óxido nítrico pelos macrófagos ativados, componentes celulares envolvidos na aterosclerose [194].

Na revisão bibliográfica de *Vita* (2005), podem encontrar-se estudos sobre os efeitos benéficos dos flavonóides na disfunção endotelial e no tônus vascular, um efeito benéfico no lúmen arterial nas síndromes coronárias e um efeito inibitório na agregação plaquetar

[179]. Existem vários mecanismos pelos quais os flavonóides podem ter um efeito protetor contra doenças cardiovasculares como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios (regulação da produção de mediadores da inflamação), pelo aumento dos níveis de proteínas de alta densidade e pelos efeitos positivos na disfunção endotelial [181].

Estudos de *Fu, et al.* (2005) com a orientina, um derivado da luteolina, do extrato das folhas de bambu (*Phyllostachys nigra*), em anéis de artéria aorta torácica isolada de coelhos da Nova Zelândia, sugerem que a orientina relaxa os anéis pré-contraídos utilizados pela via do NO-cGMP. No músculo liso vascular, inibe as contrações induzidas pela inibição da libertação de Ca^{2+} . Os mecanismos que envolvem os canais de K^+ , os recetores β e o cAMP não parecem envolvidos [190]. A pré-incubação de orientina (0,1-30 mM) inibiu as contrações induzidas pela NA em anéis de aorta sem endotélio, reforçando a ideia da ação direta da orientina nas células do músculo liso [190].

Estudos de *Lee, Jeong e Kim* (2009), de “screening *in silico*” com métodos de “docking” mostraram que os flavonóides podem ser inibidores potentes da PNMT (enzima que cataliza a síntese de A a partir da NA) [183].

Estudos “*in vivo*” em ratos (*Makarova e Makarov*, 2010) mostraram os efeitos anti-hipertensores de derivados da luteolina com diminuição da pressão sistólica e diastólica [189]. São vários os estudos que descrevem os efeitos cardiovasculares benéficos, em particular, anti-hipertensores dos flavonóides luteolina e apigenina, presentes em diversas espécies de plantas e frutos [191].

Vasant, et al. (2012) avaliaram o efeito anti-hipertensor e a atividade diurética do extrato de folhas (rico em derivados da luteolina e apigenina) da *Colocasia esculenta* Linn em ratos. Os flavonóides presentes no extrato podem ser responsáveis por efeitos anti-hipertensores e efeitos diuréticos fracos. O efeito anti-hipertensor pode ser devido à inibição da enzima conversora da angiotensina, pode ocorrer inibição da fosfodiesterase ou uma ação direta no endotélio vascular através do aumento da libertação de EDHF, com consequente vasodilatação [195].

Buwa, et al. (2015), avaliaram os efeitos da apigenina no stresse oxidativo e no enfarte do miocárdio induzidos pelo isoproterenol durante a estimulação dos recetores adrenérgicos β em ratos através de alterações bioquímicas, histológicas e hemodinâmicas [192]. A apigenina (75mg/Kg) melhorou a função miocárdica, aumentou os antioxidantes endógenos no tecido pela diminuição do stresse oxidativo e diminuiu os danos no miocárdio [192].

1.8 Hipertensão arterial

1.8.1 Definição

A HTA é a doença cardiovascular mais comum [173]. O diagnóstico é baseado em medições repetidas e reprodutíveis da pressão sanguínea (tabela 4). É uma condição física onde a pressão sanguínea arterial (PA) diastólica (igual ou maior a 90 mmHg) ou sistólica (igual ou maior que 140 mmHg) está elevada de tal forma, que há um risco acrescido de complicações cardiovasculares [159].

A pressão sanguínea é avaliada pelo débito cardíaco (DC) (volume de sangue bombeado pelo coração, por unidade de tempo) e pela resistência periférica total. Na maioria dos casos, a HTA está associada a um aumento da resistência periférica total enquanto o débito cardíaco está geralmente normal [160, 173].

A HTA resulta de um aumento do tónus do músculo liso arterial vascular periférico, que leva ao aumento da resistência das artérias e diminuição da capacitância do sistema venoso. Na maioria dos casos, a causa para o aumento do tónus vascular é desconhecida.

Apesar da maioria dos doentes não ter sintomas, a HTA crónica pode conduzir a problemas cardiovasculares graves.

Tabela 4- Classificação da HTA com base na PA

PA sistólica/diastólica (mmHg)	Categoria
<120/80	Normal
120-135/80-89	Pré-hipertensão
≥140/90	Hipertensão
140-159/90-99	Fase I
≥160/100	Fase II

(Informação retirada de: *Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, 2003.*)

1.8.2 Estudos sobre os efeitos do sistema nervoso simpático no desenvolvimento da hipertensão arterial

A A atua nos recetores β_1 e leva ao aumento da pressão sanguínea sistólica. Tem ações cronotrópicas e inotrópicas positivas, e provoca o aumento da RVP pela vasoconstrição nos recetores α_1 . Também ativa os recetores β_2 , causando vasodilatação. Consequentemente, a resistência periférica total pode diminuir, tal como a pressão arterial diastólica, dependendo do balanço dos vários efeitos.

A NA também é agonista dos recetores α e β . Ativa os recetores β_1 com potência semelhante à A mas tem um efeito relativamente baixo nos recetores β_2 . Consequentemente, a NA aumenta a RVP, através da ativação dos recetores α_1 e a pressão sanguínea sistólica e diastólica através dos recetores β_1 [173,174].

Uma das explicações do papel do SNS, no desenvolvimento de HTA (“Hipótese da A”) foi avançada em 1981, por *Rand e Majewski*. Segundo esta hipótese, o aumento da A na fenda sináptica (pela estimulação repetida da medula supra-renal em resposta ao stress), ativa os recetores adrenérgicos β_2 pré-juncionais e desencadeia o aumento da libertação de NA pelos terminais simpáticos. Esta ativação cardiovascular intensa, pode representar uma etapa precoce no desenvolvimento de HTA [57, 166].

Segundo *Pereira e Ribeiro* (2012), as catecolaminas, que se encontram em níveis elevados, vão ativar os recetores adrenérgicos e, por exemplo, através dos recetores β_1 , exercem uma ação estimulante direta (inotropismo, cronotropismo e dromotropismo positivos), aumentando o DC e, consequentemente, a PA [99].

Para além desses efeitos, os recetores β estimulam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, especificamente por aumentarem a secreção de renina. A ativação deste sistema leva à conversão da angiotensina I em angiotensina II, um vasoconstritor endógeno potente.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é complexo e envolve vários mecanismos importantes, alguns dos quais são referidos de seguida.

O sistema cardiovascular é regulado por reflexos autonómicos. Trabalham juntamente com os mecanismos locais e o sistema renina-angiotensina-aldosterona para regular o volume e

a pressão arterial sanguíneos. Os reflexos cardiovasculares envolvem três componentes: nervos aferentes que sentem uma alteração no estado do sistema e comunicam-na ao cérebro (1) que processa essa informação e implementa uma resposta apropriada (2) alterando a atividade dos nervos eferentes que controlam a atividade cardíaca, vascular e renal, levando a respostas homeostáticas que revertem a alteração do sistema (3).

Os baroreceptores são terminações nervosas aferentes (sensoriais) nas paredes dos seios carótidos (dilatações de paredes finas nas origens das artérias carótidas internas) e do arco aórtico. Sentem alterações nas paredes vasculares causadas por mudanças de pressão e respondem modificando a frequência dos potenciais de ação. Ao sentirem a diminuição de pressão, promovem o aumento da atividade do sistema nervoso simpático com consequente vasoconstrição e aumento da pressão sanguínea.

Diversos reflexos cardiovasculares intrínsecos têm origem no coração e nos pulmões. Os receptores para estes reflexos estão localizados, principalmente, em regiões de baixa pressão do sistema cardiovascular. Estes reflexos parecem ter um papel importante na regulação da frequência cardíaca, tônus vascular e no controle do volume sanguíneo e agem juntamente com os baroreceptores para estabilizar a pressão sanguínea.

Uma diminuição no volume de sangue causa o alongamento da parede das aurículas, inibindo os receptores de alongamento com consequente inibição da libertação do peptídeo atrial natriurético. A diminuição da atividade do recetor atrial é integrado no tronco cerebral com atividade barorecetora, e leva ao aumento da atividade simpática no coração e sistema vascular e um aumento da pressão sanguínea [176].

A ativação dos receptores β estimula a libertação de renina. A renina é uma protease armazenada em células granulares dentro do aparelho justaglomerular nos rins. Cliva o angiotensinogénio globulina α_2 do plasma para formar angiotensina 1, a qual é subsequentemente convertida no octapeptídeo angiotensina 2, pela enzima conversora de angiotensina (ACE) na superfície de células endoteliais.

A angiotensina 2 tem uma série de ações que promovem a elevação da pressão e fluxo sanguíneos. Estas incluem o aumento da reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal, estimulando a sede, promoção da libertação da hormona peptídica antidiurética (ADH ou vasopressina), aumentando a ativação do sistema nervoso simpático e causando uma vasoconstrição direta. Também promove a libertação da aldosterona esteróide a partir da zona glomerular do córtex supra-renal. A aldosterona aumenta a reabsorção de Na^+ pelas células principais do nefrónio distal através da estimulação da síntese de Na^+ pelas bombas

basolaterais e pelos canais de Na^+ na membrana apical. Também ocorre um aumento da reabsorção de água com conseqüente aumento do volume sanguíneo [176].

Por outro lado, *Pereira e Ribeiro* (2012) afirmam que, níveis elevados de catecolaminas circulantes promovem vasoconstrição, especialmente nos vasos de resistência pré-capilares (da pele, mucosa e rins) juntamente com marcada constrição venosa, mediada pelos recetores α , sobretudo os recetores α_1 . Estes fatores contribuem para o aumento da RVP, o que provoca um aumento da PA [99].

Diversos estudos de *Izzo, et al.* (1999), *Reims, et al.* (2005), *Brotman, Golden, Wittstein* (2007), *Flaa, et al.* (2008) e *Pereira e Ribeiro* (2012) mencionam que a atividade do SNS e, concretamente, a libertação de catecolaminas, pode ter implicações no desenvolvimento da HTA e outras complicações cardiovasculares [99,161,164,165,170] (fig.9).

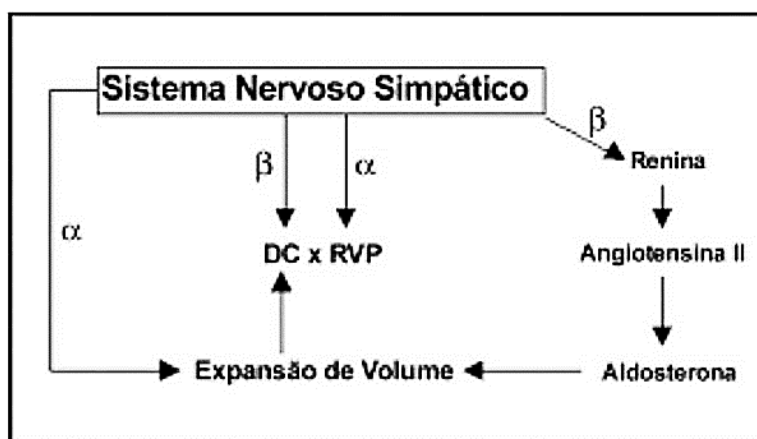


Fig.9- Posição do sistema nervoso simpático no controlo da PA. Legenda: DC- débito cardíaco; RVP- resistência vascular periférica. (Adaptado de: *Izzo*, 1999)

1.8.3 Recetores adrenérgicos: terapêutica atual e perspectivas futuras

O efeito pró-hipertensivo das catecolaminas circulantes pode ser diminuído com antagonistas dos recetores β que mostraram ser eficazes na diminuição da pressão sanguínea na HTA [162,173].

Os antagonistas dos recetores β não são geralmente prescritos como tratamento de primeira linha para a HTA. Normalmente, quando os valores da pressão sistólica e diastólica ainda não são muito elevados, a terapêutica inicia-se com diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores dos canais de Ca^{2+} . Quando os valores

já são considerados elevados, pressão sistólica maior que 160 ou diastólica maior que 100, a combinação de fármacos é comum [163].

Os antagonistas dos recetores β inibem o sistema renina-angiotensina-aldosterona e, portanto, diminuem a pressão e o volume sanguíneos.

No sistema vascular, os antagonistas não seletivos dos recetores β , opõem a vasodilatação causada pelos agonistas dos recetores β_2 . Apesar da ação dos antagonistas não seletivos dos recetores β poder levar a um aumento da resistência periférica, a sua administração crónica conduz a uma diminuição da resistência periférica em doentes com HTA, com diminuição da pressão diastólica e sistólica [173,174]. Os antagonistas não seletivos dos recetores β são eficazes em atenuar arritmias cardíacas supraventriculares. Diminuem a atividade do nódulo aurículo-ventricular e sino-auricular. A bradicardia resultante geralmente limita a dose do fármaco. Os efeitos principais deste tipo de fármacos são a diminuição do débito cardíaco e a inibição da libertação de renina pelo rim [173,174].

Os antagonistas seletivos β_1 têm menos efeitos na RPV e no metabolismo. Em particular, o nebivolol promove a libertação de NO das células endoteliais e provoca vasodilatação. Estes fármacos são úteis em doentes hipertensivos com uma boa função pulmonar. Alguns são indicados no controlo da insuficiência cardíaca crónica [174].

Existem, ainda, fármacos agonistas parciais dos recetores β_1 e β_2 , que inibem a estimulação causada pelas catecolaminas. Provocam uma diminuição do débito cardíaco e têm menos efeitos metabólicos que outros antagonistas dos recetores β . Estes fármacos não são aconselháveis em arritmias ou anginas devido ao seu efeito agonista parcial [174].

Relativamente aos antagonistas dos recetores α , estes têm uma aplicação limitada no tratamento da HTA. São mais úteis quando o aumento da pressão sanguínea se deve a um excesso de concentração de agonistas α [173].

Os antagonistas seletivos dos recetores α_1 , como a prazosina, promovem uma diminuição da RVP e diminuem a pressão sanguínea arterial através do relaxamento dos músculos lisos arteriais e venosos. Estes fármacos causam apenas alterações mínimas no débito cardíaco, na circulação sanguínea renal e na taxa de filtração glomerular, ao contrário dos antagonistas dos recetores α , dos quais faz parte a fentolamina. No entanto, os antagonistas dos recetores α , podem provocar efeitos secundários como hipotensão ortostática, dor de cabeça, congestão nasal, entre outros. Não têm um efeito considerável na maioria dos casos de HTA comparativamente com outros fármacos e, portanto, estão cada vez mais em desuso [173].

Os agonistas dos recetores α_2 também podem ser usados no tratamento da HTA. Por exemplo, a clonidina, um agonista parcial dos recetores α , com uma afinidade maior para os recetores α_2 , parece atuar nos recetores adrenérgicos pré-sinápticos, diminuindo a libertação de NA [173].

Existem, também, fármacos antagonistas dos recetores adrenérgicos α e β . Os seus efeitos incluem vasodilatação periférica, diminuindo a pressão arterial. Por exemplo, o carvedilol diminui a peroxidação lipídica e evita a diminuição do diâmetro das paredes vasculares, efeitos benéficos na insuficiência cardíaca. Podem causar hipotensão ortostática [174].

De facto, os antagonistas dos recetores β , encontram-se entre os fármacos mais bem sucedidos na história da medicina e continuam a ser uma terapêutica importante na HTA [160]. O seu desenvolvimento tem sido feito no sentido de diminuir os efeitos secundários (broncoespasmos, aumento da RVP, entre outros). Assim, surgiu a chamada “Terceira geração de antagonistas dos recetores adrenérgicos β (AAD- β)”, da qual fazem parte o carvedilol e o nebivolol [168]. Apesar das vantagens e melhorias em relação às gerações anteriores, estes fármacos exigem uma monitorização do doente no sentido de se encontrar a dose adequada, a qual, no caso de ser administrada em excesso, pode ser responsável por broncoespasmos, bradicardia, hipotensão e quantidade de sangue insuficiente nos tecidos [168].

Esta terceira geração de AAD- β tem um grande potencial devido aos seus efeitos adicionais, como vasodilatação e um perfil de efeitos colaterais leves com menor extensão de desenvolvimento de doenças cardíacas. Podem melhorar a resistência à insulina, diminuir os níveis de lipoproteínas de baixa densidade e aumentar os níveis de lipoproteínas de elevada densidade, atenuando os ataques de asma, diminuindo os vasoespasmos coronários e controlando os distúrbios circulatórios periféricos. Os seus efeitos vasodilatadores resultam de vários mecanismos que incluem a libertação de NO, efeitos antioxidantes e bloqueio do influxo de Ca^{2+} . A vasodilatação resulta na diminuição da RVP. Estes fármacos podem reverter a remodelação arterial patogénica responsável pelo aumento de RVP, reverter a diminuição da capacidade vasodilatadora das artérias coronárias e diminuir o risco de complicações cardiovasculares [160].



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos definidos para este estudo foram:

- 1-** Estudar a composição do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L.;
- 2-** Isolar a fração polifenólica presente no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L.;
- 3-** Avaliar o comportamento contráctil da artéria mamária interna humana após adições cumulativas de noradrenalina;
- 4-** Avaliar o comportamento contráctil da artéria mamária interna humana após adições cumulativas da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L.;
- 5-** Avaliar o efeito inibitório da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (nas diferentes concentrações utilizadas) em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina, na artéria mamária interna humana;
- 6-** Estudar o papel dos recetores adrenérgicos no efeito inibitório da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela noradrenalina, na artéria mamária interna humana, utilizando fármacos antagonistas dos recetores adrenérgicos α .



CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Oxalis pes-caprae* L.

O extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. foi preparado no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

A recolha das plantas, na cidade de Coimbra, ocorreu em Abril de 2014. Esta é a época do ano em que a planta está quase a perder a parte aérea, que morre no fim da época de floração, para voltar a surgir no início do ciclo. Se não fosse colhida nesta altura, o trabalho atrasaria um ano. Fez-se a separação das folhas das restantes partes da planta.

O passo inicial do trabalho consistiu na determinação da percentagem de água presente nas folhas de *Oxalis pes-caprae* L., verificou-se que estas possuíam cerca de 85% de água na sua constituição.

Após a determinação da quantidade de água, as folhas frescas foram trituradas e os constituintes foram extraídos com etanol a 96%. Depois da centrifugação do extrato, realizou-se o teste do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para avaliar a atividade antirradicalar do extrato e por HPLC/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodiodos) fez-se a identificação dos compostos presentes no extrato usando a teoria desenvolvida por Campos e Markham em 2007 [182].

Depois da realização destes testes, o extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L., foi guardado no frigorífico (a 5 °C) até Outubro de 2014, altura em que os testes feitos anteriormente foram repetidos para verificar se o extrato ainda se encontrava em boas condições para ser utilizado nas experiências na área farmacológica.

Uma vez que, para as experiências, seria necessária apenas a fração polifenólica do extrato de *Oxalis pes-caprae* L., realizou-se uma extração da fração polifenólica com acetato de etilo, recorreu-se ao evaporador rotativo para remoção deste solvente orgânico volátil e ao ultrasounds para uma solubilidade mais eficaz dos flavonóides. Também se utilizou o n-hexano para remoção da fase lipídica.

A concentração da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. inicialmente preparada foi 2,6 g de extrato fresco/ml de solvente.

3.1.1 Teste do DPPH

DPPH é uma abreviatura comum do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo que é utilizado em ensaios para avaliação da capacidade antioxidante de determinado composto. Devido à sua banda de absorção forte centrada nos 517 nm, o radical DPPH tem uma cor violeta intensa em solução e torna-se incolor ou amarelo pálido quando perde a sua atividade.

Assim, o teste com DPPH é um método bastante conveniente para o “screening” antioxidante de pequenas moléculas uma vez que a reação pode ser observada visualmente e medida com precisão utilizando um espectrofotómetro UV/Vis no referido comprimento de onda dado que, os flavonóides existentes no extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L., têm absorção entre os 230 a 400 nm .

3.1.2 HPLC/DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodiodos é uma técnica analítica que se utiliza para separar, identificar e quantificar componentes numa mistura. A cromatografia líquida de alta eficiência distingue-se dos outros tipos de cromatografias líquidas por utilizar a fase móvel a alta pressão. O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica. O uso de partículas menores resulta numa área superficial maior, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra.

Esta técnica consiste na passagem do solvente líquido a alta pressão contendo a mistura através de uma coluna que contém material sólido adsorvente. Os componentes da amostra atravessam a coluna a diferentes velocidades, facto que resulta das diferentes e específicas interações com a fase estacionária. A velocidade de cada componente depende da sua natureza química, da natureza da fase estacionária e da composição da fase móvel. O tempo ao qual cada analito específico elui é chamado de tempo de retenção. O tempo de retenção medido sob determinadas condições é considerado uma característica que permite identificar diferentes analitos numa mistura.

Características da análise:

- Volume injetado: 100 µl
- Fluxo: 0,8 ml/min

- Coluna LichroSorb RP18
- Detetor Array Diode e espectros acumulados a λ de 200,0 a 400,0 nm

Para além da utilização do HPLC/DAD, o espectro UV e o tempo de retenção também foram úteis na identificação de compostos da *Oxalis pes-caprae* L.

3.1.3 Espectroscopia Ultravioleta/Visível

A espectroscopia no UV/Vis envolve a espectroscopia de fotões (espectrofotometria). Utiliza a luz na faixa do visível e próxima do ultravioleta. Nessas faixas de energia as moléculas sofrem transições electrónicas moleculares. O espectrofotómetro (instrumento usado) mede a quantidade de luz que foi absorvida pela amostra. Um espectro UV/Vis é essencialmente um gráfico da absorvância versus comprimento de onda na faixa do ultravioleta e/ou visível.

3.1.4 Concentração a pressão reduzida (sob vácuo) usando o “evaporador rotativo”

O processo de destilação é utilizado na purificação de substâncias e na separação dos componentes voláteis de misturas. Baseia-se na combinação sucessiva dos processos de vaporização e de condensação. Os tipos mais comuns de destilação são: destilação simples, destilação fracionada e destilação sob vácuo.

A destilação sob vácuo a pressão reduzida com evaporador rotativo, usa-se na remoção rápida de grandes quantidades de solventes voláteis de uma solução. O princípio é baseado numa destilação, conduzida sob vácuo, no qual o ponto de ebulição das substâncias é menor do que à pressão atmosférica.

Este sistema tem uma fonte de vácuo e um banho de água para aquecimento. O balão que contém a solução, é acoplado ao aparelho de destilação através de um tubo de vidro que gira a uma velocidade controlada pelo motor. Ao ser aplicado o vácuo e o aquecimento, o solvente é evaporado, condensado e recolhido no balão do evaporador rotativo. A amostra que terá as suas substâncias extraídas em solução é colocada no frasco de evaporação, que por sua vez permanece dentro do banho de aquecimento. Neste local, o frasco sofre rotações promovidas para otimizar a evaporação.

O material evaporado será direcionado até ao condensador, onde haverá uma serpentina contendo líquido (geralmente água de refrigeração). Devido a este contato e às diferenças na temperatura, a substância evaporada transforma-se em líquido novamente e segue em direção ao frasco receptor. Assim, os constituintes a reter na amostra permanecem no frasco de evaporação, e a substância destilada no frasco receptor.

3.1.5 Ultra-sons

É um método de extração onde se utilizam correntes de alta frequência que promovem com mais efetividade a fragmentação das estruturas e membranas celulares do material vegetal, libertando com mais facilidade os constituintes químicos. Também se utiliza para, após remoção do solvente orgânico da mesma, promover uma maior homogeneização da amostra no processo de solubilização no solvente mais apropriado, por exemplo, para os ensaios de bioatividade.

3.2 Artéria mamária interna humana

3.2.1 Recolha

O uso das AMIH foi aprovado pela comissão de ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – CHUC-Huc com o nº PC-388/08.

As AMIHs foram colhidas nos CHUC-Huc, na unidade de Cirurgia Cardiorádica, provenientes de doentes sujeitos a uma cirurgia de revascularização coronária. As suas idades variaram entre 42 e 80 anos.

As AMIHs utilizadas neste estudo foram colocadas em solução fisiologia de Krebs-Henseleit (NaCl, 118 mM; KCl, 4,7 mM; CaCl₂, 2,5 mM; KH₂PO₄, 1,2 mM; MgSO₄, 1,2 mM; glucose, 10 mM; NaHCO₃, 25mM) e transportadas para o laboratório num recipiente isotérmico com gelo moído.

3.2.2 Isolamento

Numa caixa de Petri com solução de Krebs-Henseleit, procedeu-se ao isolamento das artérias, eliminando os tecidos que não eram relevantes para o estudo e poderiam interferir com o resultado das experiências como tecido muscular, adiposo, conjuntivo e possíveis ramificações. As artérias deveriam estar o mais intactas possível de modo a não enviesarem os resultados da experiência e os anéis cortados deveriam ter 2 a 3 mm de largura (fig.10).

A solução de Krebs-Henseleit utilizada no banho foi gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ e o pH foi ajustado para 7,4.

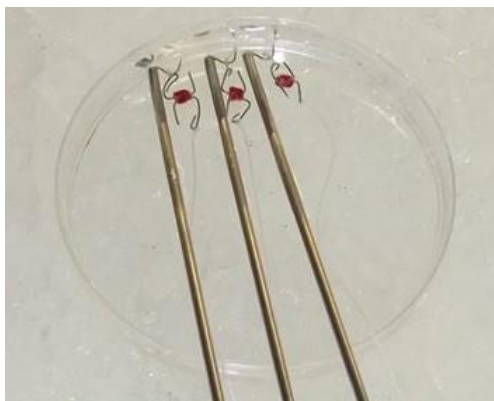


Fig.10- Artéria mamária interna humana cortada em anéis de 2-3 mm e montada entre duas ansas de platina numa caixa de Petri num tabuleiro com gelo.

3.2.3 Montagem

As artérias foram montadas em dois fios de platina colocados de modo a ficarem para lados opostos e a não se cruzarem. As artérias foram suspensas num banho de órgãos cujo líquido interior era a solução de Krebs-Henseleit, no qual as artérias foram mergulhadas e o líquido exterior, um banho termostático (fig.11).

Os transdutores de força AD Instruments® e PowerLab® acoplados a um computador para leitura de dados, permitiram a gravação da variação da tensão isométrica do tecido vascular. A tensão da parede vascular foi normalizada, ajustada a uma tensão ideal de descanso (duas grama/19,6 mN). Os anéis foram lavados várias vezes e mantidos a 37 °C durante um período de estabilização de duas horas.

Após este período e no fim de cada experiência, adicionou-se cloreto de potássio (KCl) de concentração 60 mM no banho de órgãos, com o objetivo de verificar a reatividade e a viabilidade das artérias. O KCl tem efeito vasoconstritor e, com o passar do tempo, a contração das artérias aumenta e é alcançado um “plateau”.

Curvas de concentração-resposta para a NA e curvas de concentração-resposta para a NA com pré-incubação de *Oxalis pes-caprae* L. e/ou fármacos antagonistas dos recetores adrenérgicos, foram obtidas por adições cumulativas, sendo que cada concentração foi adicionada após a anterior ter atingido o seu “plateau”.



Fig.11- Anéis de 2-3mm de AMIH suspensos entre duas ansas de platina num banho de órgãos de 10 ml com solução de Krebs-Henseleit.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 *Oxalis pes-caprae* L.

4.1.1 Identificação dos compostos do extrato das folhas da *Oxalis pes caprae* L. por HPLC/DAD

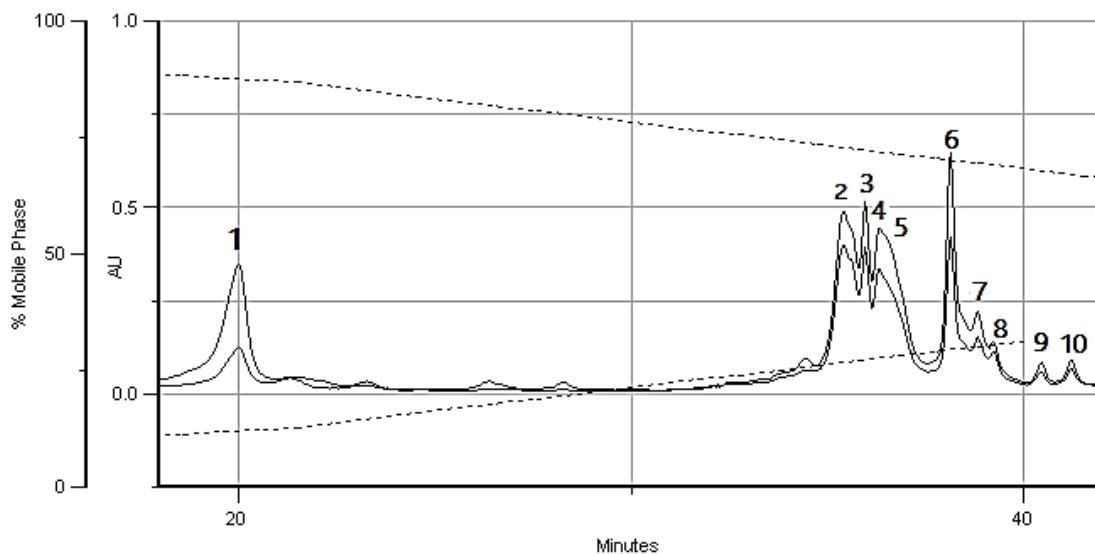
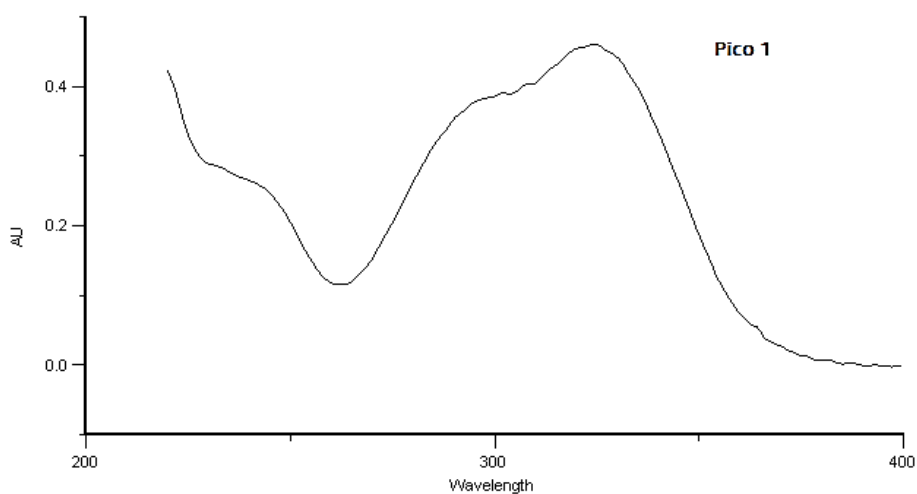
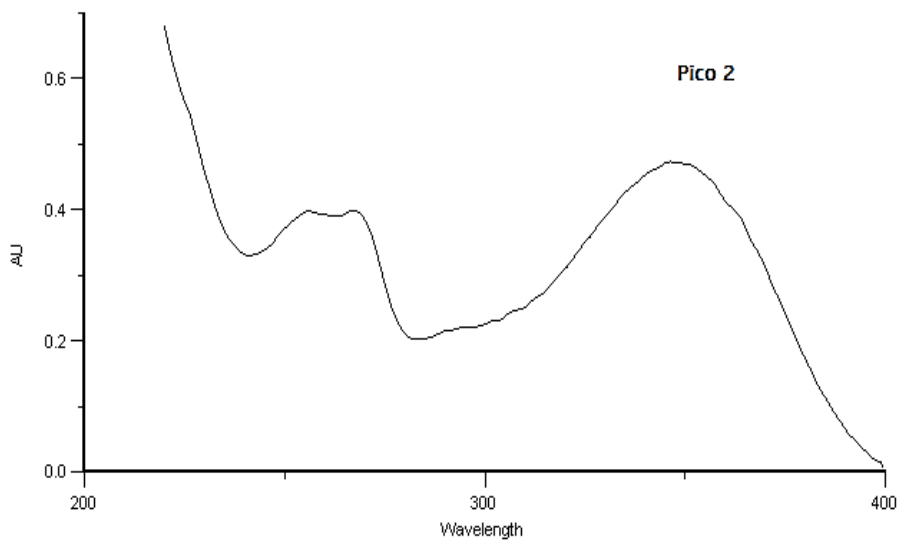


Fig.12- Perfil HPLC/DAD dos ácidos fenólicos/flavonóides das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (Abril 2014)

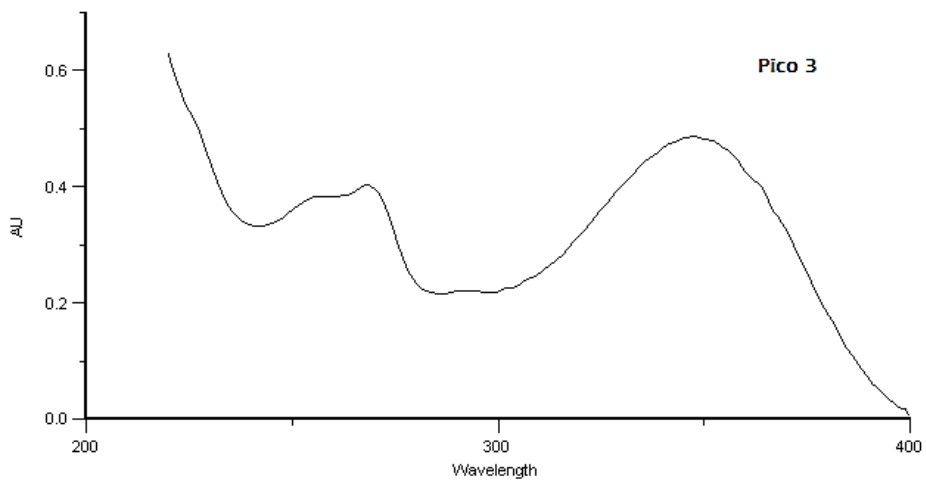
- A seguir, estão representados os espectros UV dos 10 compostos identificados (10 picos):



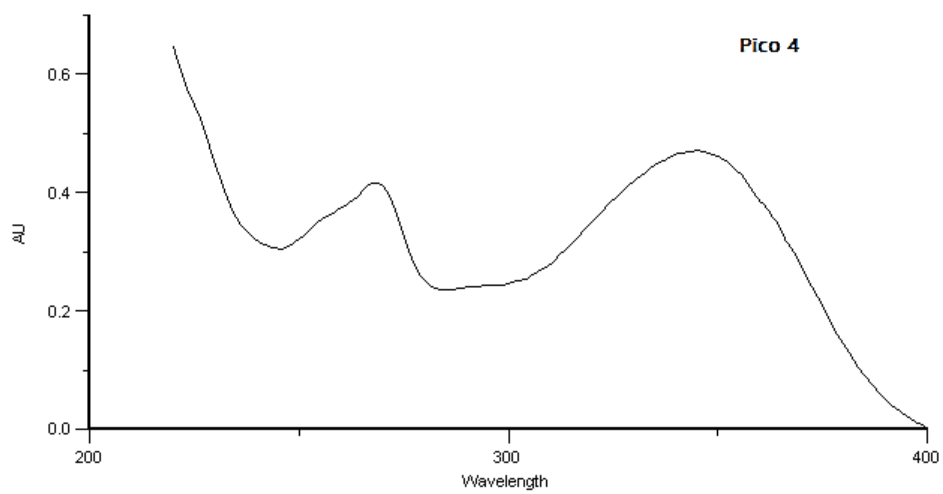
Tempo de retenção: 20.05



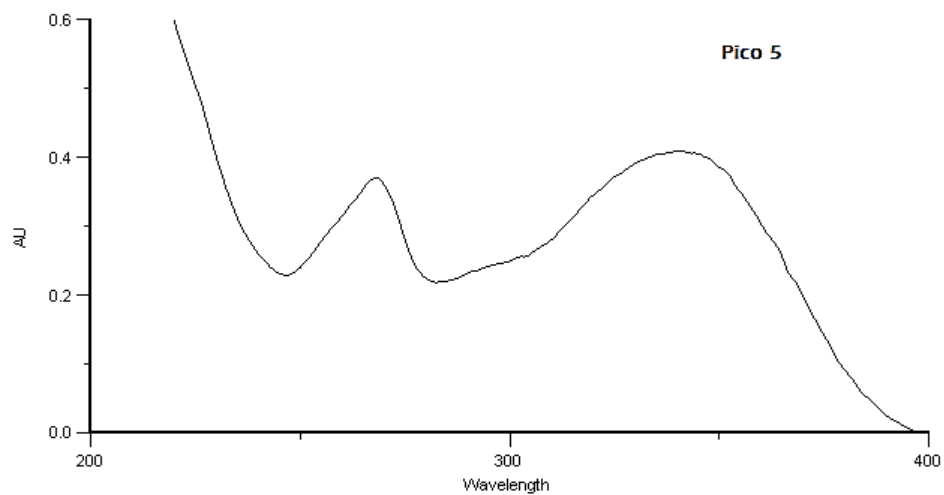
Tempo de retenção: 35.29



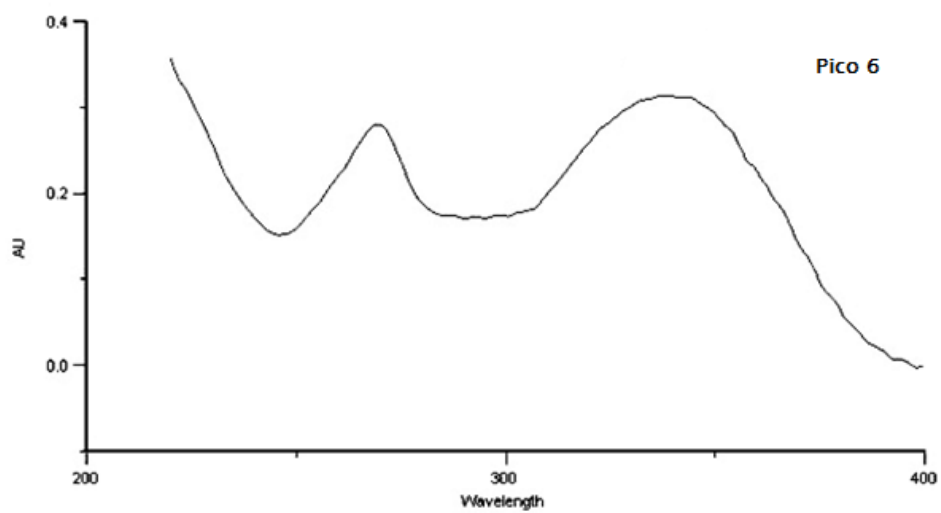
Tempo de retenção: 35.81



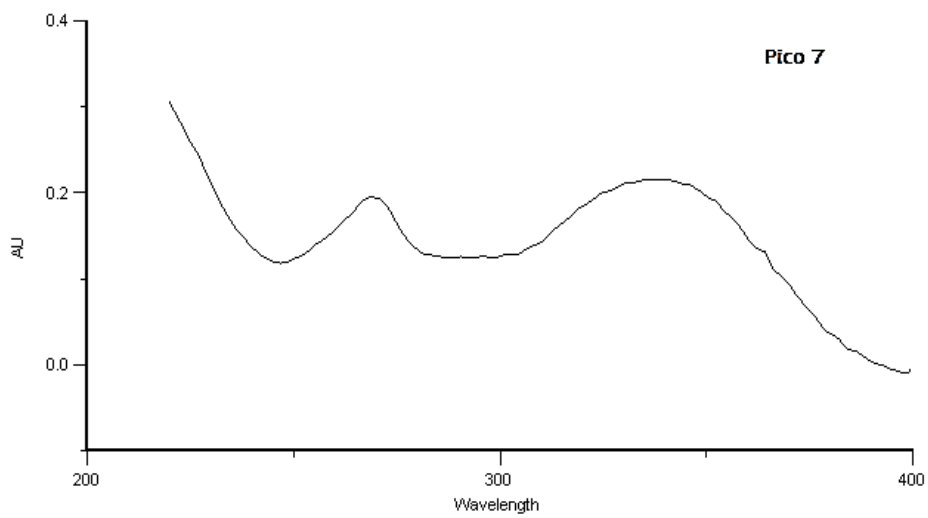
Tempo de retenção: 36.32



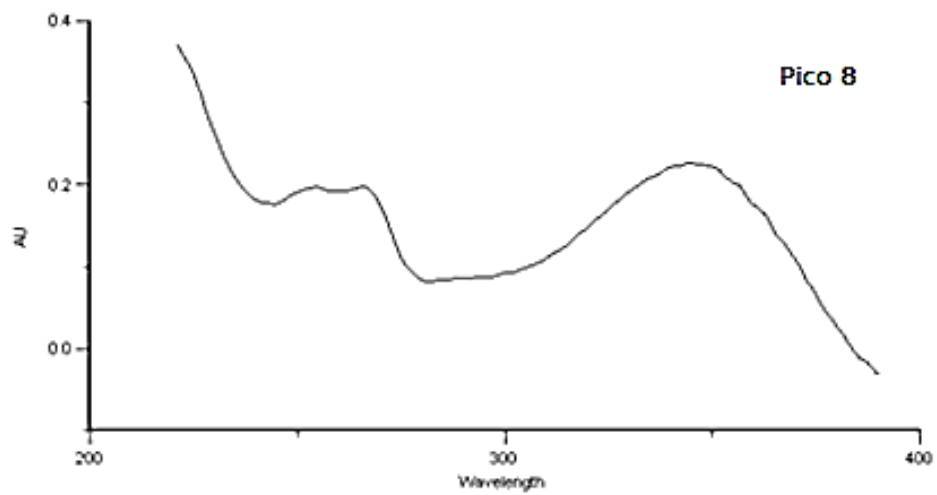
Tempo de retenção: 36.58



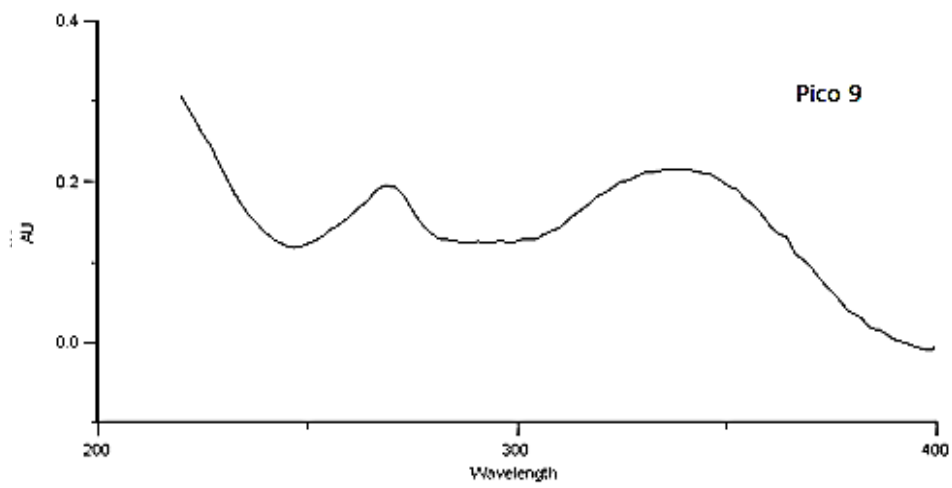
Tempo de retenção: 38.15



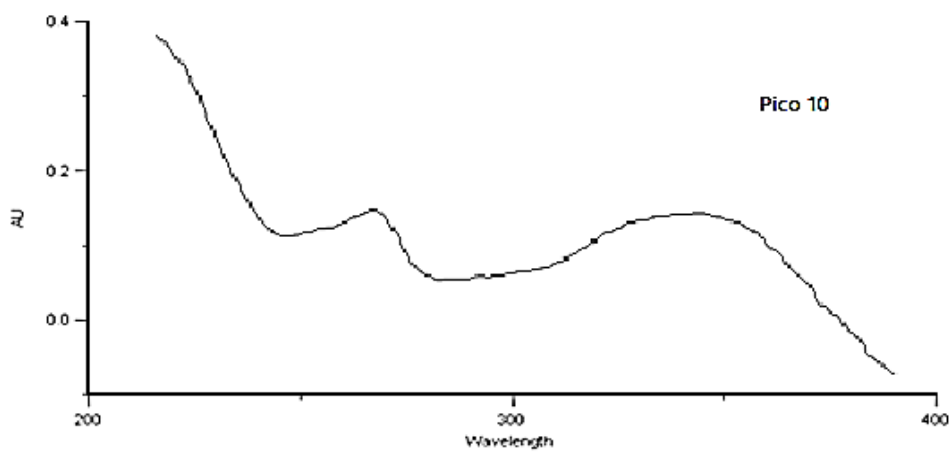
Tempo de retenção: 38.83



Tempo de retenção: 39.21



Tempo de retenção: 40.45



Tempo de retenção: 41.24

4.1.2 Avaliação da atividade antirradicalar pelo teste do DPPH

Tabela 5- Análise da atividade antirradicalar do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. utilizando o teste do DPPH (Abril 2014).

μL	ABS	DPPH (%)	Atividade (%)	Amostra (μg)
25	0,676	83,15	16,85	375
50	0,603	74,17	25,83	750
75	0,507	62,36	37,64	1125
100	0,373	45,88	54,12	1500
150	0,19	23,37	76,63	2250

*Nota: Concentração da amostra fresca - 100 mg/ml.

4.1.3 Verificação dos compostos presentes no extrato das folhas da *Oxalis pes caprae* L. por HPLC/DAD

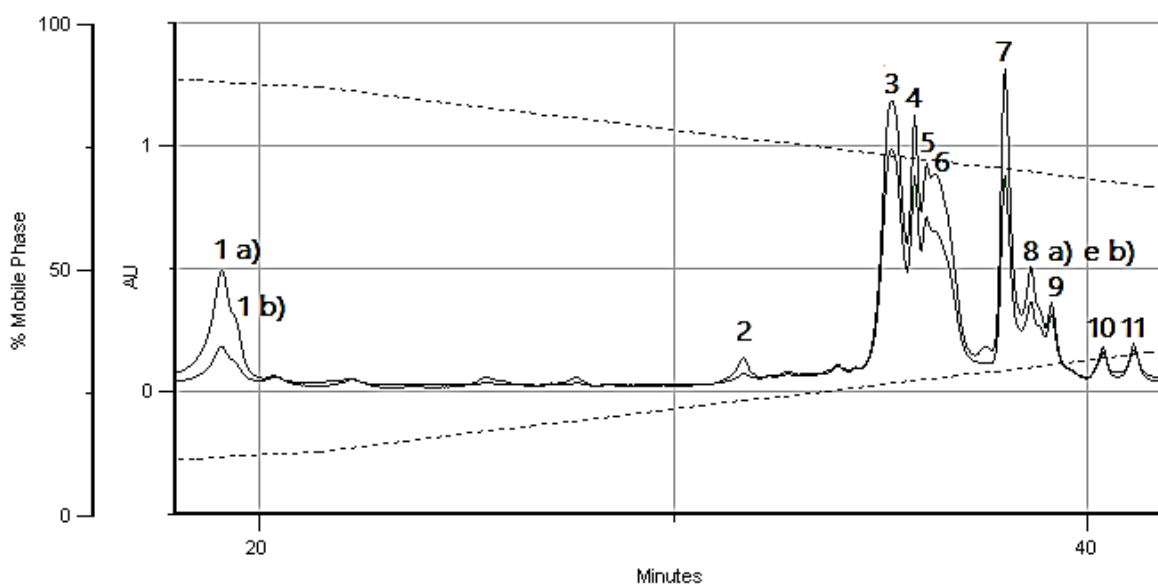
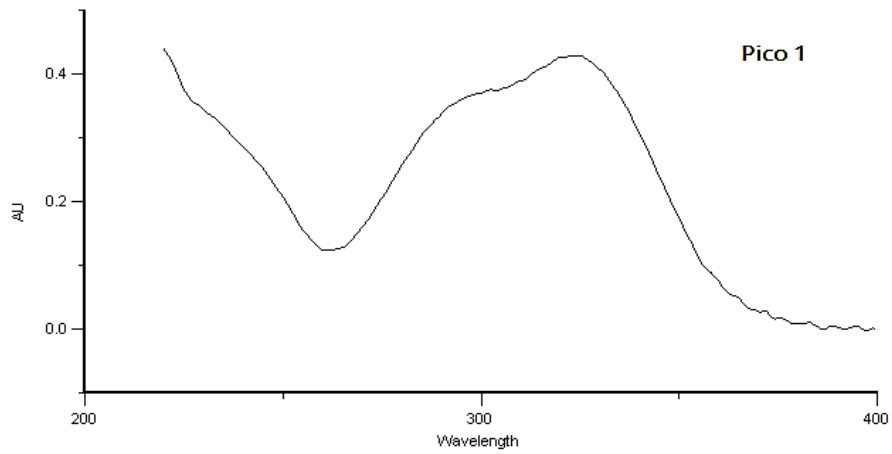
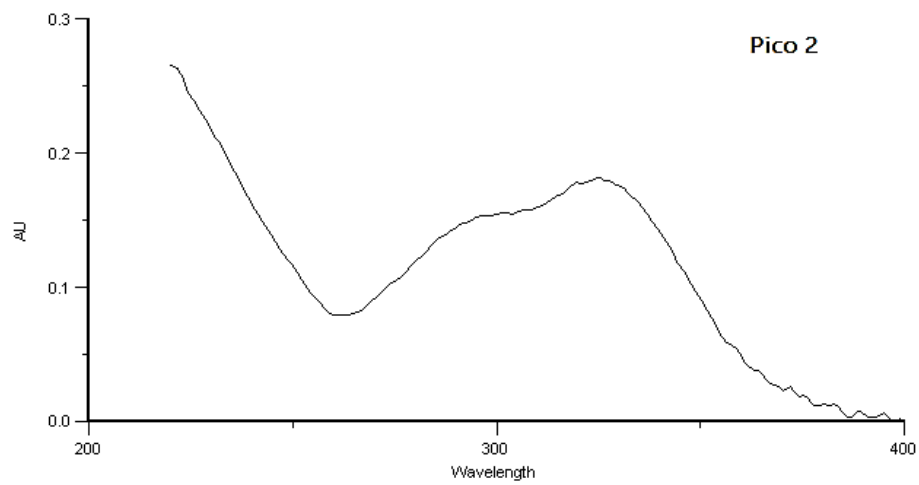


Fig. 13- Perfil HPLC/DAD dos ácidos fenólicos/flavonóides das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (Outubro 2014).

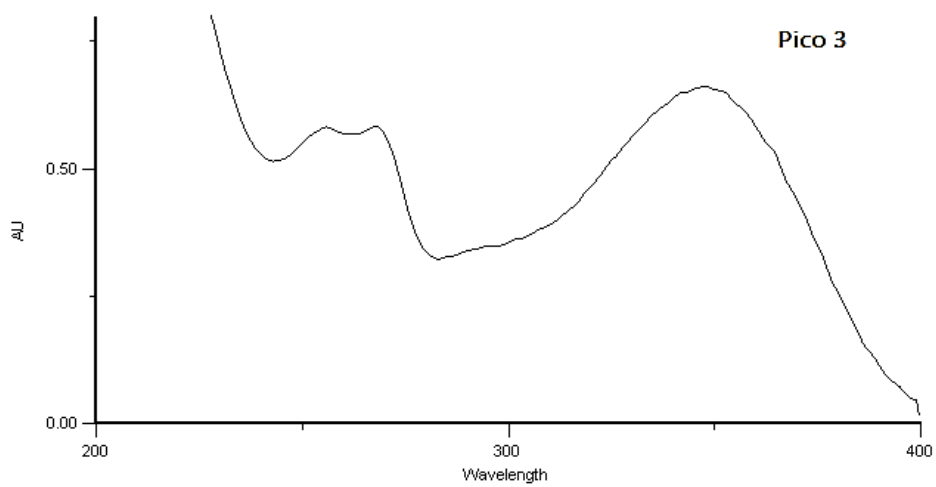
- A seguir, estão representados os espectros UV dos 11 compostos identificados (11 picos):



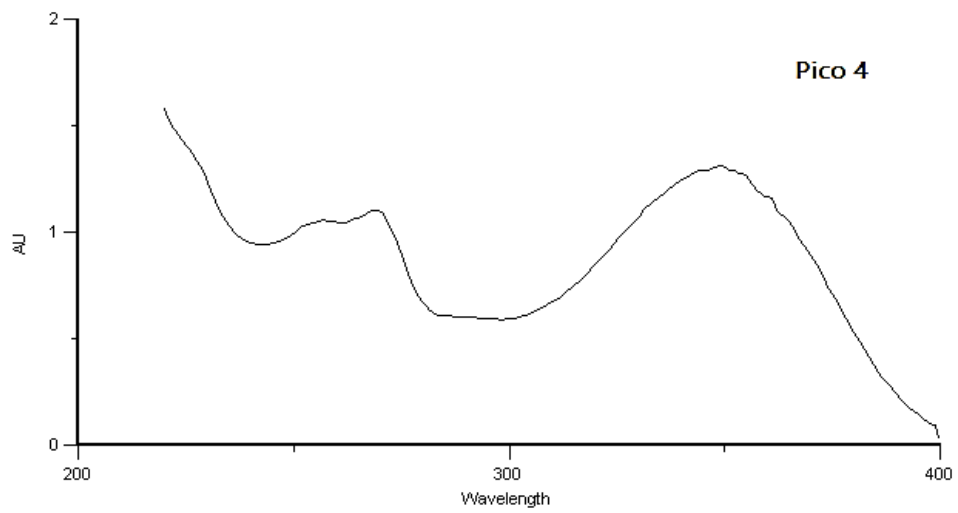
Tempo de retenção: a) 19.12; b) 19.42



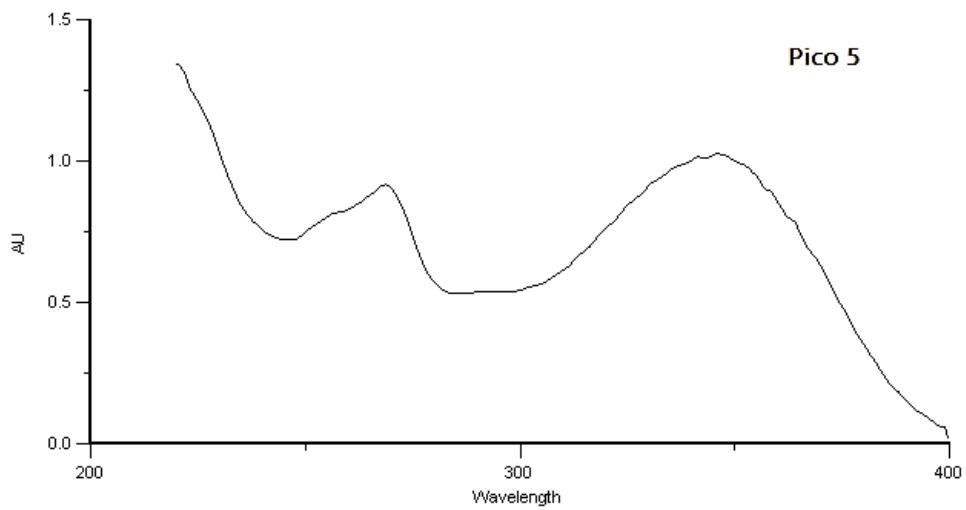
Tempo de retenção: 31.69



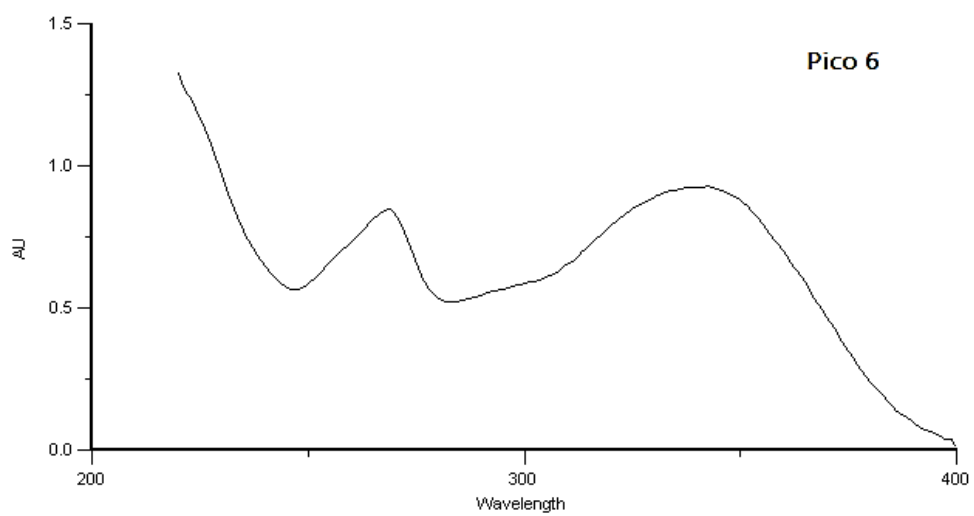
Tempo de retenção: 35.12



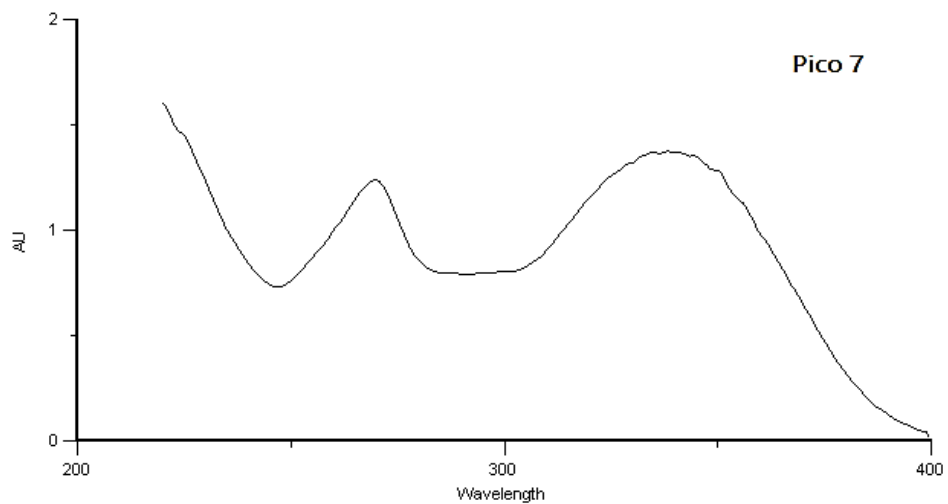
Tempo de retenção: 35.82



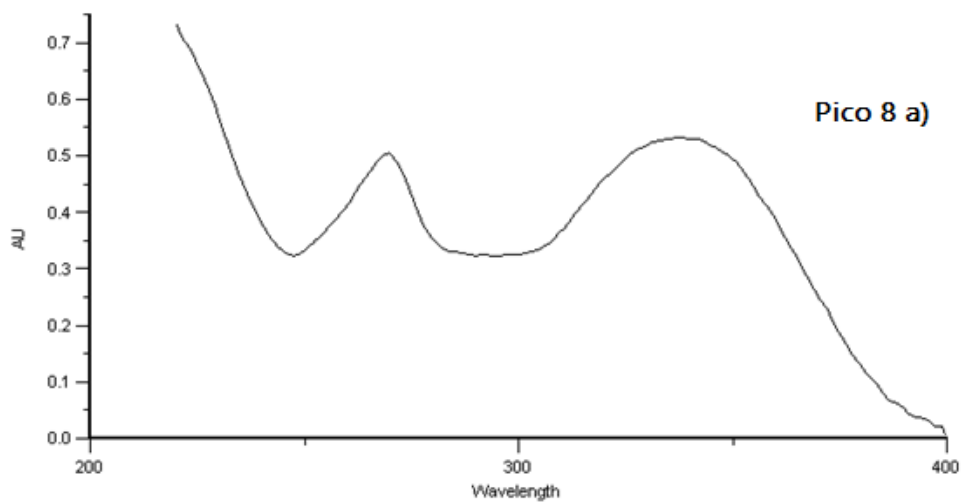
Tempo de retenção: 36.12



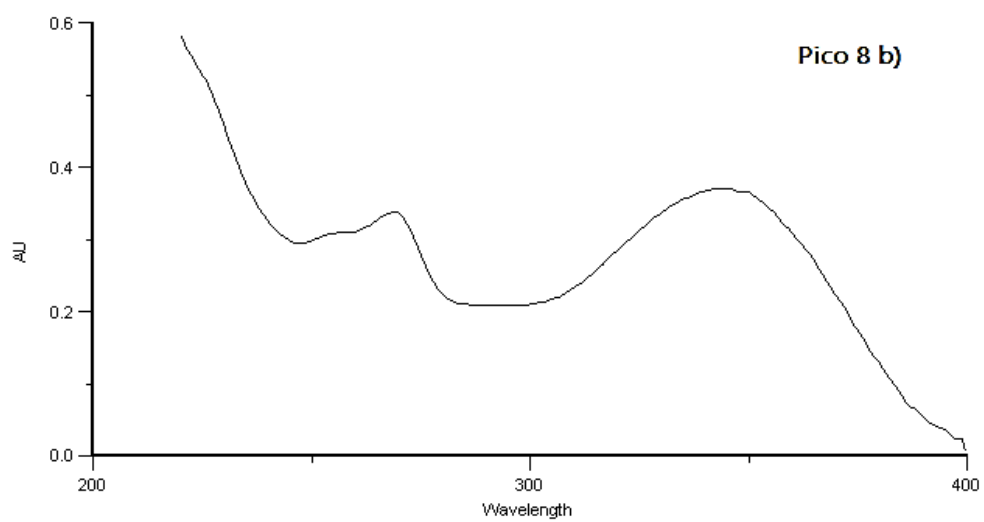
Tempo de retenção: 36.37



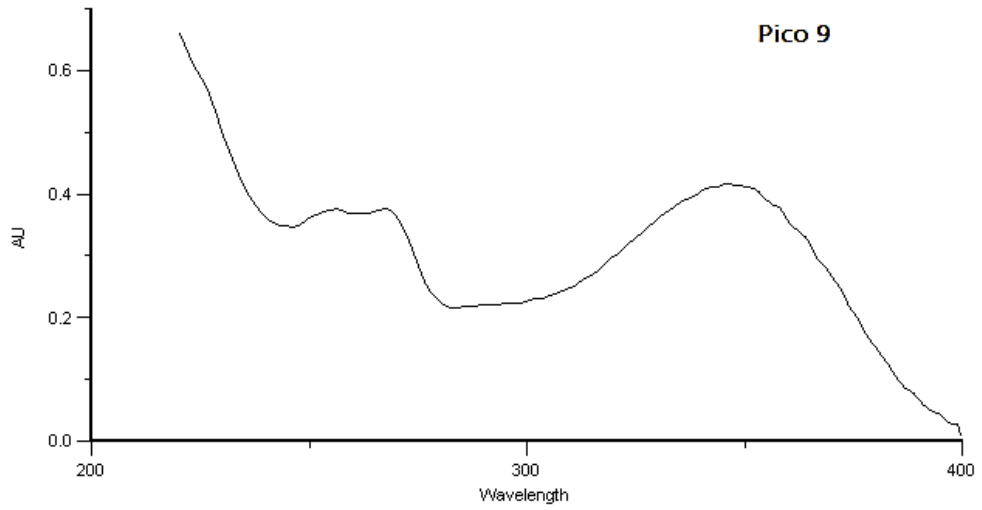
Tempo de retenção: 38.00



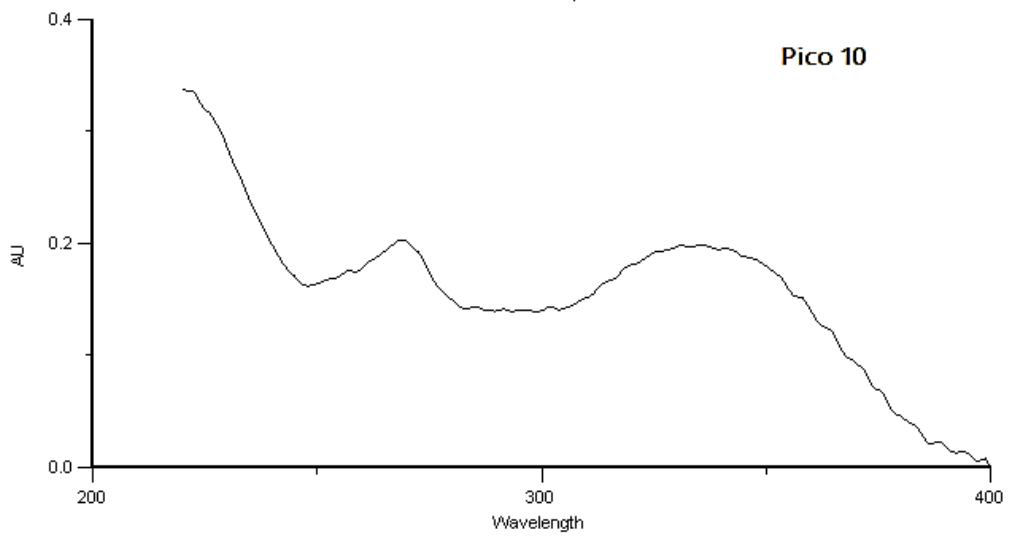
Tempo de retenção: 38.65



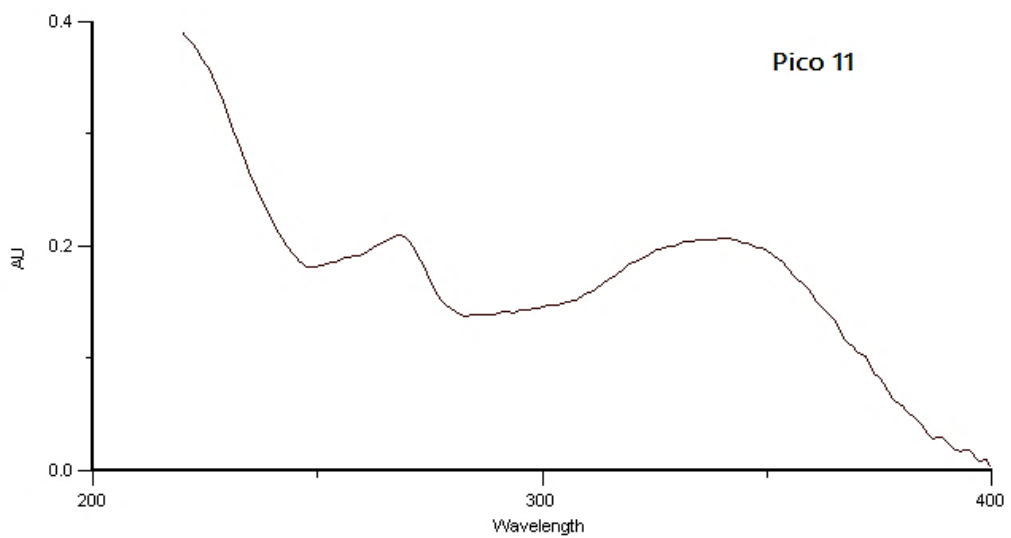
Tempo de retenção: 38.86



Tempo de retenção: 39.12



Tempo de retenção: 40.37



Tempo de retenção: 41.13

4.1.4 Verificação da atividade antirradicalar pelo teste do DPPH

Tabela 6- Análise da atividade antirradicalar do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. utilizando o teste do DPPH (Outubro 2014).

μL	ABS	DPPH (%)	Atividade (%)	Amostra (μg)
25	0,676	69,3	30,7	375
50	0,411	42,1	57,9	750
75	0,247	25,3	74,7	1125
100	0,127	13	87	1500
150	0,063	6,5	93,5	2250

*Nota: concentração da amostra fresca - 260 mg/ml.

4.2 Artéria mamária interna humana

As respostas contrácteis da AMIH à curva concentração-resposta da NA com pré-incubação da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L., da noradrenalina com pré-incubação de cada um dos fármacos utilizados e da NA com pré-incubação de cada um dos fármacos e da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L., foram representadas em percentagem de contração máxima obtida na curva de concentração-resposta à NA, em cada anel.

Os resultados finais foram expressos relativamente à percentagem de resposta obtida para os anéis controlo (curvas de concentração-resposta da NA). Posteriormente, os resultados foram expressos em termos de mN de tensão.

A contração máxima registada ($E_{m\acute{a}x}$) representa a atividade intrínseca de cada composto. O logaritmo negativo da concentração molar de agonista capaz de induzir metade da resposta máxima (pEC_{50}), exprime a potência de cada composto.

Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa concentração-resposta em escala semilogarítmica (% da contração máxima versus (vs.) logaritmo da concentração em μM), com o auxílio do programa GraphPad Prisma 5.03[®].

As diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pEC_{50} calculados para cada fármaco foram avaliadas, tal como as diferenças entre as respostas contrácteis da curva concentração-resposta da NA com pré-incubação da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. e/ou com os antagonistas dos recetores adrenérgicos utilizados, em relação ao controlo, com o auxílio do teste de Tukey. Uma vez verificada pela análise de variância (ANOVA) que a amostra não provinha da mesma população, fizeram-se comparações múltiplas entre o efeito inibitório de cada concentração utilizada da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml-concentrações no banho de órgãos) em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH. Depois, foram feitas também, comparações entre o efeito inibitório de cada fármaco e a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (concentração 10,4mg/ml) em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH.

Os valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados estão apresentados como médias +/-

erro padrão da média (“Standard Error of the Mean”, SEM) do número de experiências (n) indicado.

As respostas contrácteis da artéria mamária interna humana foram registadas em PowerLab® e AD Instruments® acoplados a um computador para leitura de dados.

Os fármacos utilizados neste estudo foram: prazosina, antagonista seletivo dos recetores adrenérgicos α_1 concentração; ioimbina, antagonista seletivo dos recetores adrenérgicos α_2 e fentolamina, antagonista dos recetores adrenérgicos α , adquiridos à Reagente 5.

De seguida, são apresentados os resultados obtidos nas experiências realizadas.

• **Resposta da artéria mamária interna humana à fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L (0,104-10,4 mg/ml)**

A figura em baixo representa a resposta da artéria mamária interna humana à adição de concentrações crescentes (*Oxalis* 1 a 7) da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L..

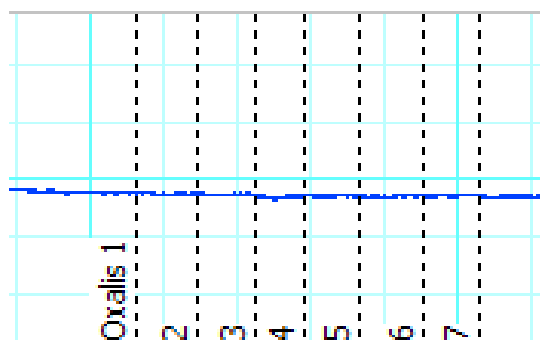


Fig.14- Resposta contráctil da AMIH à fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L..

• **Resposta da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M)**

A figura em baixo representa a resposta da AMIH à adição de concentrações crescentes de NA (NA 1 a NA 7). A escala vertical encontra-se em grama (g).

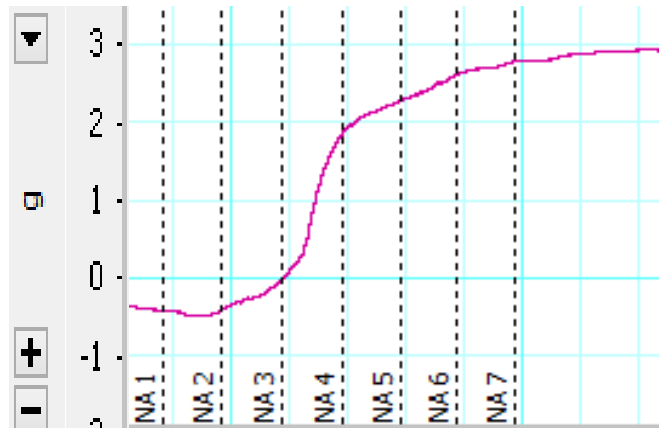


Fig.15- Resposta contráctil da AMIH à NA.

- Resposta da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (2,6 mg/ml)

A figura em baixo representa a resposta da AMIH à adição de concentrações crescentes de NA e a resposta da AMIH à adição de concentrações crescentes de NA com pré-incubação de 15 minutos da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (2,6 mg/ml), no mesmo anel. Os traços a picotado nas figuras representam as sete adições de concentrações crescentes de NA. A escala vertical encontra-se em grama (g).

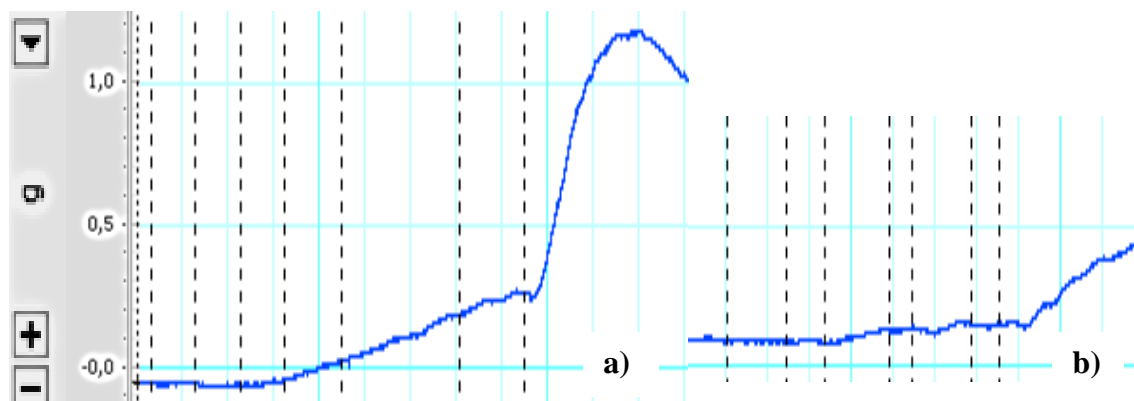
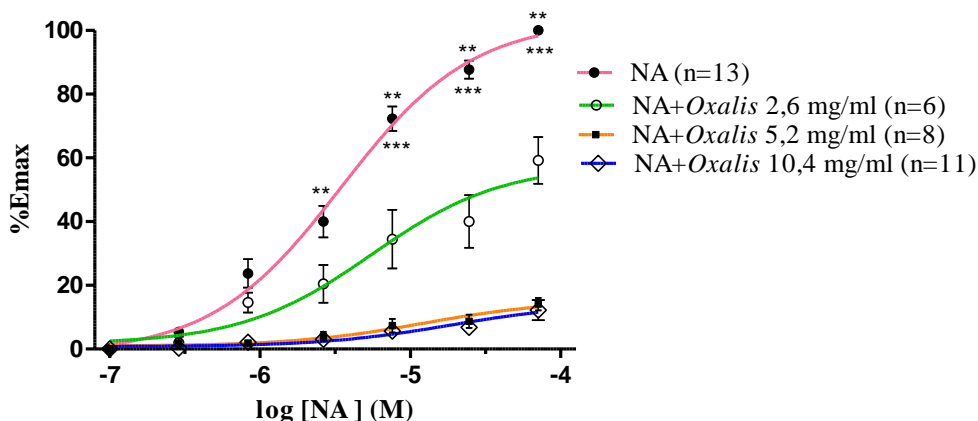


Fig.16- a) Resposta contráctil da AMIH à NA; **b)** Resposta contráctil da AMIH à NA com pré-incubação de *Oxalis pes caprae* L..

4.2.1 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação de *Oxalis pes-caprae* L. (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis da AMIH à NA (controlo) e à NA com pré-incubação de 15 minutos de fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. nas várias concentrações utilizadas: 0,26 mg/ml, 5,2 mg/ml e 10,4 mg/ml. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.



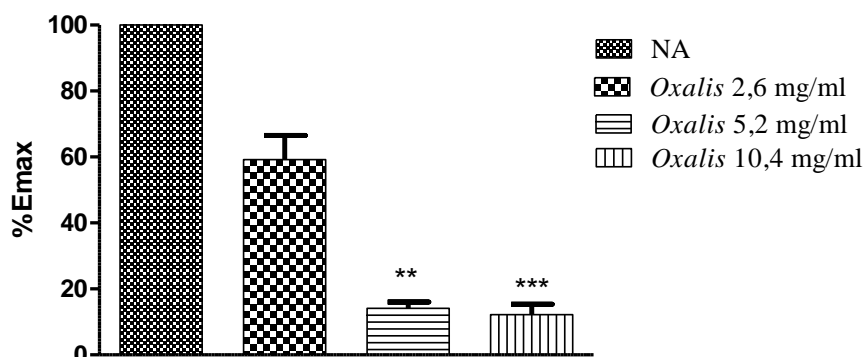
Legenda: **p < 0,01 *Oxalis pes-caprae* L. 5,2 mg/ml vs. Controlo
***p < 0,001 *Oxalis pes-caprae* L. 10,4 mg/ml vs. Controlo

Gráfico 1- Ação inibitória da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml) em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente ao controlo.

4.2.2 Respostas contrácteis máximas da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação de *Oxalis pes-caprae* L. (2,6; 5,2; 10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis máximas da AMIH à NA (controlo) e à NA com pré-incubação de 15 minutos de fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. nas várias concentrações utilizadas: 0,26 mg/ml, 5,2 mg/ml e 10,4 mg/ml.

As barras verticais representam a contração máxima induzida na artéria mamária interna humana e, por cima destas, está representado o S.E.M associado.



Legenda: **p < 0,01 Oxalis 5,2 mg/ml vs. Controlo
 ***p < 0,001 Oxalis 10,4 mg/ml vs. Controlo

Gráfico 2 – Comparação do efeito inibitório máximo das três concentrações utilizadas de *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente ao controlo.

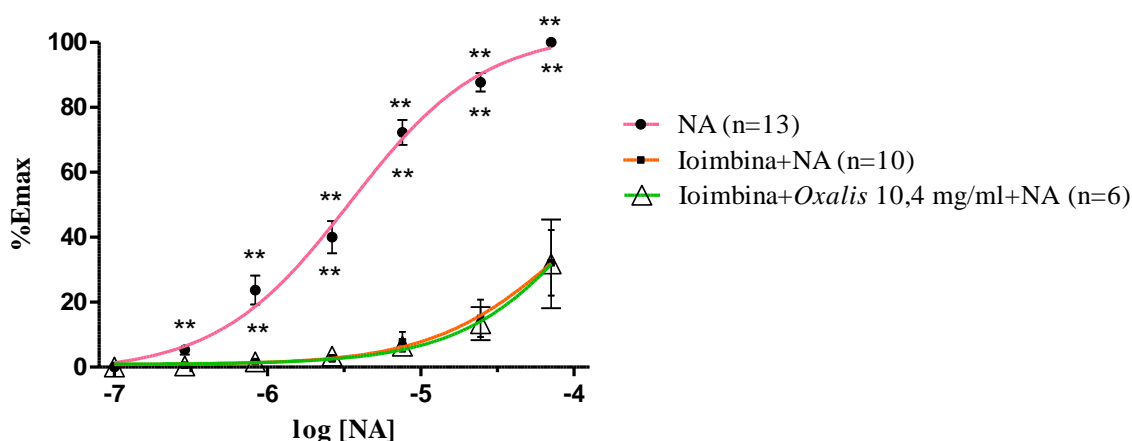
Tabela 7- Comparação de dois parâmetros – $E_{max} \pm SEM$ (%) e $pEC_{50} \pm SEM$ - da NA com pré-incubação respetiva das três concentrações utilizadas de fração polifenólica do extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml), em relação ao controlo.

Curvas	E_{max} (%)	pEC_{50}	n
Controlo	100	5,460±0,0642	13
<i>Oxalis</i> 2,6 mg/ml	59,188±7,320	5,258±0,233	6
<i>Oxalis</i> 5,2 mg/ml	14,093±1,987**	4,911±0,282**	8
<i>Oxalis</i> 10,4 mg/ml	12,239±3,174***	4,725±0,337***	11

Legenda: **p < 0,01 *Oxalis* L. 5,2 mg/ml vs. Controlo
 ***p < 0,001 *Oxalis* L. 10,4 mg/ml vs. Controlo

4.2.3 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação de ioimbina (1×10^{-3} M) e *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis da AMIH à NA (controlo), à NA com pré-incubação de ioimbina de 30 minutos e à NA com uma pré-incubação de ioimbina de 30 minutos e de *Oxalis pes-caprae* L. de 15 minutos. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.



Legenda: **p < 0,01 Ioimbina + NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Ioimbina+ *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

Gráfico 3 - Ação inibitória do fármaco ioimbina e da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente à ação inibitória do fármaco ioimbina e ao controlo.

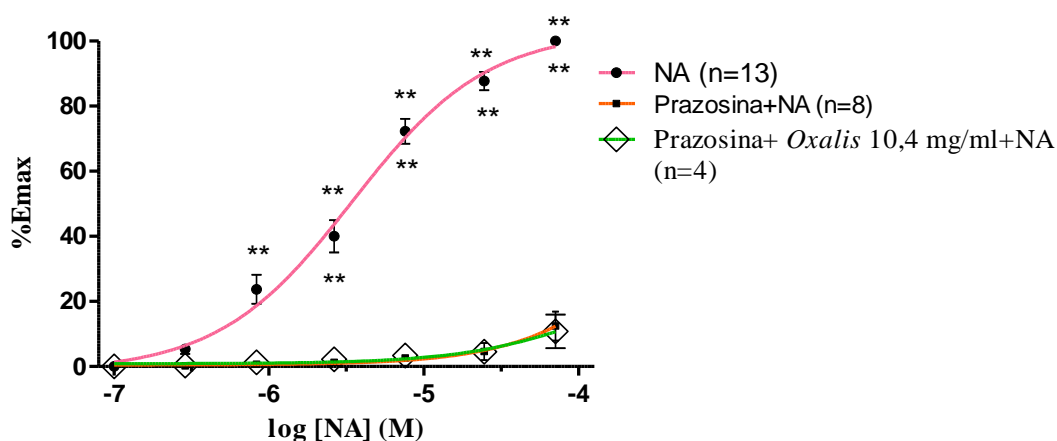
Tabela 8- Comparação de dois parâmetros – $E_{max} \pm SEM$ (%) e $pEC_{50} \pm SEM$ - da NA com pré-incubação de ioimbina e com pré-incubação de ioimbina e fração polifenólica do extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml), em relação ao controlo.

Curvas	E_{max} (%)	pEC_{50}	n
Controlo	100	$5,460 \pm 0,0642$	13
Ioimbina	$32,112 \pm 10,110^{**}$	$4,045 \pm 0,6107^{**}$	10
Ioimbina + <i>Oxalis</i>	$31,778 \pm 13,677^{**}$	$3,774 \pm 1,138^{**}$	6

Legenda: **p < 0,01 Ioimbina + NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Ioimbina+ *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

4.2.4 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação de prazosina (0,1 μ M) e *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis da AMIH à NA (controlo), à NA com pré-incubação de prazosina de 30 minutos e à NA com uma pré-incubação de prazosina de 30 minutos e de *Oxalis pes-caprae* L. de 15 minutos. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.



Legenda: **p < 0,01 Prazosina + NA vs. Controlo

**p < 0,01 Prazosina+ *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

Gráfico 4 – Ação inibitória do fármaco prazosina e da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente à ação inibitória do fármaco prazosina e ao controlo.

Tabela 9- Comparação de dois parâmetros – $E_{max} \pm SEM$ (%) e $pEC_{50} \pm SEM$ - da NA com pré-incubação de prazosina e com pré-incubação de prazosina e fração polifenólica do extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* (10,4 mg/ml), em relação ao controlo.

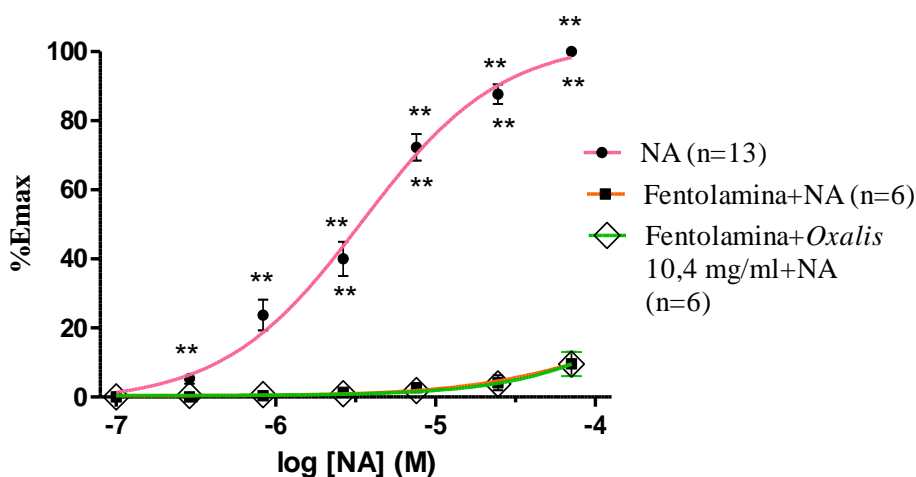
Curvas	E_{max} (%)	pEC_{50}	n
Controlo	100	5,460 \pm 0,0642	13
Prazosina	12,429 \pm 4,442**	3,297 \pm 2,672**	8
Prazosina+ <i>Oxalis</i>	10,812 \pm 5,173**	3,850 \pm 1,303**	4

Legenda: **p < 0,01 Prazosina + NA vs. Controlo

**p < 0,01 Prazosina+ *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

4.2.5 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μ M) com pré-incubação de fentolamina (10 μ M) e *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis da AMIH à NA (controlo), à NA com pré-incubação de fentolamina de 30 minutos e à NA com uma pré-incubação de fentolamina de 30 minutos e de *Oxalis pes-caprae* de 15 minutos. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.



Legenda: **p < 0,01 Fentolamina + NA vs. Controlo

**p < 0,01 Fentolamina + *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

Gráfico 5 - Ação inibitória do fármaco fentolamina e da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente à ação inibitória do fármaco fentolamina e ao controlo.

Tabela 10- Comparação de dois parâmetros – E_{max}±SEM (%) e pEC₅₀±SEM- da NA com pré-incubação de fentolamina e com pré-incubação de fentolamina e fração polifenólica do extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml), em relação ao controlo.

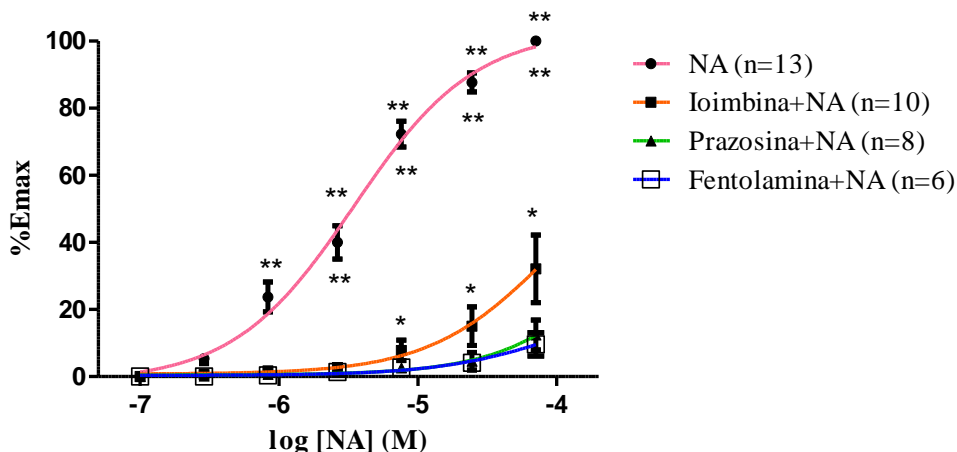
Curvas	E _{max} (%)	pEC ₅₀	n
Controlo	100	5,460±0,0642	13
Fentolamina	9,606±3,510**	3,981±0,803**	6
Fentolamina+ <i>Oxalis</i>	9,544±3,479**	3,483±1,726**	6

Legenda: **p < 0,01 Fentolamina + NA vs. Controlo

**p < 0,01 Fentolamina + *Oxalis* 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

4.2.6 Respostas contrácteis da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μM) com pré-incubação de ioimbina (1×10^{-3} M), com pré-incubação de prazosina (0,1 μM) e com pré-incubação de fentolamina (10 μM)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis da AMIH à NA (controlo) e à NA com pré-incubação de 30 minutos de ioimbina, prazosina e fentolamina, respetivamente. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.

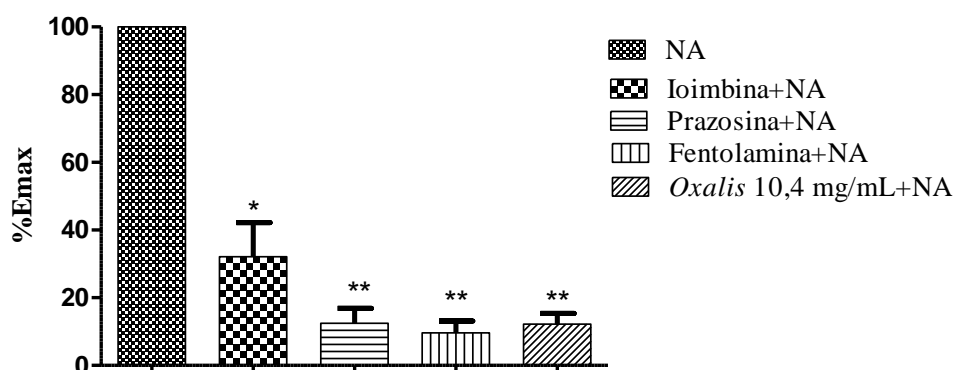


Legenda: *p < 0,05 Ioimbina+NA vs. Controlo
**p < 0,01 Prazosina+NA vs. Controlo
**p < 0,01 Fentolamina+NA vs. Controlo

Gráfico 6 – Ação inibitória dos fármacos ioimbina, prazosina e fentolamina, em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente ao controlo.

4.2.7 Respostas contrácteis máximas da artéria mamária interna humana à noradrenalina (1-60 μM) com pré-incubação de ioimbina (1×10^{-3} M), com pré-incubação de prazosina (0,1 μM), com pré-incubação de fentolamina (10 μM) e com pré-incubação de *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml)

O gráfico em baixo representa as respostas contrácteis máximas da AMIH à NA (controlo), à noradrenalina com pré-incubação de 30 minutos de ioimbina, prazosina e fentolamina, respetivamente. Os resultados das curvas concentração-resposta estão expressos em valores médios \pm S.E.M. O n representa o número de experiências. As barras verticais representam o S.E.M.



Legenda: *p < 0,05 Ioimbina+NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Prazosina+NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Fentolamina+ NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Oxalis 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo

Gráfico 7 – Comparação do efeito inibitório máximo da ioimbina, prazosina, fentolamina e *Oxalis pes-caprae* L. em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, relativamente ao controlo.

Tabela 11- Comparação de dois parâmetros – $E_{max} \pm SEM$ (%) e $pEC_{50} \pm SEM$ - da NA com pré-incubação de ioimbina (1×10^{-3} M), prazosina (0,1 μ M), fentolamina (10 μ M) e *Oxalis pes-caprae* L. (10,4 mg/ml), em relação ao controlo.

Curvas	E_{max} (%)	pEC_{50}	n
Controlo	100	5,460±0,0642	13
Ioimbina+NA	32,112±10,110*	4,045±0,6107*	10
Prazosina+NA	12,429±4,442**	3,297±2,672**	8
Fentolamina+NA	9,606±3,510**	3,981±0,803**	6
<i>Oxalis</i> +NA	12,239±3,174**	4,725±0,337**	11

Legenda: *p < 0,05 Ioimbina+NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Prazosina+NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Fentolamina+ NA vs. Controlo
 **p < 0,01 Oxalis 10,4 mg/ml+ NA vs. Controlo



CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 *Oxalis pes-caprae* L.

Analisando os espectros UV do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. de Abril de 2014, observa-se que o composto 1 (pico 1) é um ácido fenólico, derivado do ácido cafeico. Todos os outros compostos são flavonóides.

Os compostos 2, 3, 4 e 8 são derivados da luteolina. Os derivados da luteolina geralmente dão origem a duas bandas principais de absorção UV: a banda I a λ_{\max} 350.0 nm e a banda II com dois picos- banda IIa a λ_{\max} 267.0 nm e a banda IIb a λ_{\max} 257.0 nm. A banda I apresenta maior absorvância que a banda II. Assim, pode concluir-se que estes compostos são flavonas. A banda II, com maior absorvância da banda IIa em relação à banda IIb, mostra uma possível substituição no carbono 6 (Campos e Markham, 2007) [182].

Os compostos 5 a 7 e 9 e 10 são derivados da apigenina. O espectro UV sugere a existência de um núcleo de flavona semelhante aos compostos anteriores. A banda I tem uma absorvância maior que a banda II e ocorre substituição no carbono 7 naqueles em que não existe um “ombro” de absorção entre 280 a 310 nm.

Comparando os espectros UV do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. de Outubro de 2014 com os espectros conhecidos do extrato das folhas desta planta (Dellagreca, et al., 2008-2010) [145-147] e com os espectros UV do extrato analisado em Abril de 2014, podemos concluir que o composto 1 do espectro UV provavelmente alterou-se para 1 a) e 1 b). Isto pode ter ocorrido devido ao período de tempo longo de conservação do extrato no frigorífico. Ambos são ácidos fenólicos, possivelmente enantiómeros. Ainda se observa o aparecimento de um composto novo, o composto 2, também um derivado do ácido cafeico, que pode ter resultado de uma hidrólise ou alteração de pH. O composto 8 também se desdobrou em 8 a) (com um espectro muito semelhante ao composto 7 de Abril de 2014) e 8 b); o composto 8 a) parece ser um derivado da apigenina e o 8 b) um derivado da luteolina. Todos os outros compostos, 3 a 7 e 9 a 11 (secção 4.1.3), derivados da apigenina e luteolina analisados em Outubro, permaneceram semelhantes aos analisados em Abril e correspondem aos compostos 2 a 6 e 8 a 10 (secção 4.1.1).

Relativamente ao teste do DPPH, a espécie utilizada como antioxidante foi o extrato das folhas de *Oxalis pes-caprae* L. de Abril e, depois, de Outubro de 2014. Foram preparadas

várias soluções (5) com quantidades diferentes de extrato em tubos de ensaio com 1 ml de solução etanólica de DPPH. Em seguida, foi medida a absorvância destas soluções a 517 nm.

A partir dos valores de absorvância para cada concentração testada, foram determinadas as percentagens de DPPH remanescentes (% DPPH). A percentagem de atividade antioxidante (% atividade) corresponde à quantidade de DPPH• consumida.

A quantidade de radicais DPPH vai diminuindo com o aumento da quantidade de extrato adicionado, isto é, com o aumento da quantidade de moléculas antioxidantes (tabelas 5 e 6). Este aumento de atividade antioxidante resulta numa diminuição da absorvância que, por sua vez, leva a uma mudança observável da cor da solução de violeta para amarelo (não incolor, dado que alguns dos flavonóides em solução possuem esta cor).

O EC₅₀ (concentração de uma determinada substância necessária para induzir metade do efeito máximo) calculado para o extrato de Abril foi 1400 µg e o EC₅₀ calculado para o extrato de Outubro foi 600 µg. A atividade antirradicalar do extrato de Outubro parece ser mais do dobro da de Abril. No entanto, deve ter-se em conta que, a concentração do extrato testado em Outubro foi mais do dobro (260 mg/ml) do que a concentração do extrato testado em Abril (100 mg/ml). Desta forma, e realizados os devidos cálculos, conclui-se que a atividade do extrato analisada em Abril e Outubro é praticamente a mesma, pelo que se considerou que o extrato de Outubro estava em boas condições de conservação para ser usado nas experiências com as AMIHs.

Todas as alterações que ocorreram nos compostos parecem não ter alterado significativamente a atividade antirradicalar do extrato. O extrato testado nas experiências com AMIHs, induziu o efeito esperado, confirmando a sua atividade. Os compostos que parecem ser responsáveis pela atividade do extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. são os derivados da apigenina e da luteolina, uma vez que são a grande maioria, não descartando o elevado potencial dos compostos derivados do ácido cafeico presentes (picos 1 e 2).

São necessários mais estudos para estabelecer a relação estrutura-atividade de cada composto presente na fração polifenólica estudada.

5.2 Artéria mamária interna humana

Ao longo desta discussão, os termos afinidade, eficácia/atividade intrínseca e potência de um fármaco vão ser muito utilizados pelo que, a seguir, se faz um breve esclarecimento destes conceitos.

A tendência de um fármaco se ligar ao recetor é determinada pela sua afinidade. A tendência, uma vez ligado, de ativar o recetor é indicada pela sua eficácia.

A eficácia ou atividade intrínseca reflete a resposta terapêutica potencial máxima que um fármaco pode induzir. A eficácia prática de um fármaco para alcançar uma resposta final terapêutica, por exemplo, o aumento da contractibilidade cardíaca, pode ser limitada pela propensividade do fármaco para causar um efeito tóxico (por exemplo arritmia cardíaca), mesmo que o fármaco tenha um efeito terapêutico elevado.

A potência refere-se à concentração de um fármaco necessária para produzir 50% do efeito máximo. Depende em parte, da afinidade dos recetores para se ligar a esse fármaco e, em parte, da eficiência do acoplamento fármaco-recetor para produzir uma resposta.

Os agonistas totais possuem uma eficácia máxima, os agonistas parciais têm uma eficácia intermédia e os antagonistas apresentam, no caso mais simples, eficácia zero.

Dos resultados obtidos, verificou-se que a adição de concentrações crescentes de *Oxalis pes-caprae* L., 0,104 a 10,4 mg/ml, não tem efeito contráctil na AMIH (fig.14). Desta forma, conclui-se que a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. não mostrou atividade intrínseca na AMIH, na gama de concentrações testadas.

Assim, a fração polifenólica não deve ser um agonista, nem total nem parcial, dos recetores existentes na AMIH aos quais, eventualmente, se liga. São necessários mais estudos com concentrações mais elevadas da fração polifenólica para confirmar esta análise.

Verificou-se que a NA, adições de concentrações crescentes de 1 a 60 μ M, induziu contrações dependentes da concentração (fig.15). A NA mostrou ser um agonista total dos recetores adrenérgicos existentes na artéria mamária interna humana, responsáveis pelo seu efeito vasoconstritor.

A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. mostrou um efeito inibitório em resposta às contrações produzidas pela NA na AMIH (fig.16). Isto verificou-

se em todas as concentrações utilizadas da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml) (gráficos 1 e 2).

De facto, já existiam estudos que mencionam as propriedades vasodilatadoras dos flavonóides. *Occhiutto, et al.* (1991), mostraram que os flavonóides produzem efeitos antiarrítmicos e cronotrópicos positivos [153] e segundo *Beretz, Stoclet e Anton* (1980), *Laekeman, et al.* (1986) e *Ko, Huang e Teng* (1991) a maioria deles, possui efeitos vasodilatadores [154-156]. Estudos realizados por *Duarte, et al.* em 1993, na aorta de rato, mostraram que vários flavonóides, incluindo as flavonas luteolina e apigenina (10^{-6} - 10^{-3} M), relaxam as contrações induzidas pela NA (10^{-5} M) e KCl (80 mM) [157].

Comparando as três concentrações utilizadas da fração polifenólica observou-se que, as concentrações 5,2 mg/ml e 10,4 mg/ml (com um E_{max} (%) de $14,093 \pm 1,987$ e $12,239 \pm 3,174$, respetivamente) têm um efeito inibitório significativamente maior do que a concentração 2,6 mg/ml (com um E_{max} (%) de $59,188 \pm 7,320$). As concentrações 5,2 e 10,4 mg/ml da fração polifenólica utilizada apresentam curvas concentração-resposta à NA muito semelhantes (gráfico 1).

As frações polifenólicas do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. com concentrações 5,2 mg/ml e 10,4 mg/ml, reduziram significativamente o efeito vasoconstritor máximo da NA (de 100% para 14,093% e de 100% para 12,239%, respetivamente) (tabela 7).

A fração polifenólica utilizada neste estudo pode ser um antagonista dos recetores onde, eventualmente, se liga, isto é, não mostrou atividade intrínseca mas pode ter afinidade para os recetores adrenérgicos existente na AMIH, nas concentrações utilizadas (0,104-10,4 mg/ml). Como ocorreu um desvio da curva concentração-resposta da NA para a direita, com diminuição do efeito máximo à medida que a concentração da fração polifenólica utilizada foi aumentando, a fração polifenólica pode ser um antagonista do tipo não competitivo. Devem ser realizados mais estudos com concentrações mais elevadas da fração polifenólica, para confirmar esta observação.

Apesar de o efeito final da NA com pré-incubação da fração polifenólica na AMIH ter sido um efeito inibitório, o vaso-relaxamento, a fração polifenólica não parece atuar nos recetores adrenérgicos da AMIH. No entanto, a fração polifenólica, pode ligar-se a pelo menos um dos subtipos de recetores onde a NA atua, impedindo que a NA se ligue, diminuindo assim a eficácia e a potência da NA nesses recetores com consequente

diminuição do efeito máximo da NA nos recetores adrenérgicos da AMIH- a vasoconstricção.

Os recetores adrenérgicos são os responsáveis pela contração da AMIH em resposta à NA. Como a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. utilizada neste estudo relaxou as contrações induzidas pela NA na AMIH, a fração polifenólica pode ter afinidade para um ou mais subtipos de recetores adrenérgicos.

A NA tem afinidade para todos os recetores adrenérgicos; geralmente os recetores β são referenciados como os principais envolvidos no processo de vaso-relaxamento e os recetores α , os principais envolvidos na vasoconstricção.

Os estudos de *Bevilacqua, et al.* (1991) e de *Giessler, et al.* (2002) mostram que são principalmente os recetores α os responsáveis por mediar a contração induzida por NA na AMIH [135,136] e, segundo *Pešia, et al.* (2003), a população dos recetores adrenérgicos β em comparação com os recetores α , na AMIH isolada, aparenta ser baixa [142]. Desta forma, com base nesta informação teórica e com vista ao objetivo final, neste estudo, utilizaram-se antagonistas seletivos dos recetores α_1 e/ou α_2 .

A ioimbina é um alcalóide de nucleo índolico e é um antagonista seletivo competitivo dos recetores α_2 tendo um efeito inibitório às contrações induzidas pela NA na AMIH comprovado neste estudo (gráfico 3).

A resposta inibitória da ioimbina às contrações induzidas pela NA na AMIH mostrou-se estatisticamente significativa quando comparada com o controlo, analisando os valores da atividade intrínseca, E_{max} e da potência, pEC_{50} . A ioimbina (1×10^{-3} M) reduziu o efeito contráctil máximo da NA de 100% para 32,112% (tabela 8).

Verifica-se que a curva concentração-resposta da NA com pré-incubação da fração polifenólica e da ioimbina, foi muito semelhante à curva concentração-resposta da NA com pré-incubação de ioimbina, na AMIH (gráfico 3). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas curvas (tabela 8).

Assim, se a fração polifenólica atuasse nos recetores α_1 , era de esperar uma diminuição significativa do efeito contráctil máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de ioimbina e de 15 minutos da fração polifenólica, em comparação com o efeito máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de ioimbina.

No entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores da % de E_{max} e de pEC_{50} da NA com pré-incubação de ioimbina ($32,112 \pm 10,110$ e $4,045 \pm 0,6107$,

respetivamente) e nos valores da % de E_{max} e de pEC_{50} da NA na presença de ioimbina e da fração polifenólica ($31,778 \pm 13,677$ e $3,774 \pm 1,138$, respetivamente) (tabela 8). Desta forma, a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L., parece não ter afinidade para os recetores α_1 .

A prazosina é uma quinazolina piperazinil. É um inibidor seletivo competitivo dos recetores α_1 e tal como se previa, teve um efeito inibitório às contrações induzidas pela NA na AMIH (gráfico 4).

O efeito inibitório da prazosina em resposta às contrações induzidas pela NA mostrou-se estatisticamente significativo quando comparado com o controlo, analisando os valores da atividade intrínseca, E_{max} e da potência, pEC_{50} . A prazosina ($0,1 \mu M$) reduziu o efeito contráctil máximo da NA na AMIH de 100% para 12,429 % (tabela 9).

Verifica-se que a curva concentração-resposta da NA com pré-incubação da fração polifenólica e da prazosina, é muito semelhante à curva concentração-resposta da NA com pré-incubação de prazosina, na AMIH (gráfico 4). Não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de E_{max} e pEC_{50} entre elas (tabela 9).

Assim, se a fração polifenólica atuasse nos recetores α_2 era de esperar uma diminuição significativa do efeito contráctil máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de prazosina e de 15 minutos da fração polifenólica, em comparação com o efeito máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de prazosina.

No entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de % de E_{max} e de pEC_{50} da NA na presença de prazosina ($12,429 \pm 4,442$ e $3,297 \pm 2,672$, respetivamente) e os valores de % de E_{max} e de pEC_{50} da NA na presença de prazosina e da fração polifenólica ($10,812 \pm 5,173$ e $3,850 \pm 1,303$, respetivamente) (tabela 9). Desta forma, a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. parece não ter afinidade para os recetores α_2 .

Com o intuito de se comprovarem os resultados obtidos com os antagonistas seletivos dos recetores α_2 e depois dos recetores α_1 , foram feitos estudos com um antagonista dos recetores α - a fentolamina.

A fentolamina é um antagonista competitivo potente dos recetores adrenérgicos α_1 e α_2 . Tal como os outros antagonistas, a fentolamina também tem um efeito inibitório às contrações induzidas pela NA na AMIH, o que foi comprovado neste estudo (gráfico 5).

O efeito da fentolamina em resposta às contrações induzidas pela NA mostrou-se estatisticamente significativo quando comparado com o controlo, analisando os valores da atividade intrínseca, E_{max} e da potência, pEC_{50} . A fentolamina (10 μ M) reduziu o efeito contráctil máximo da NA na AMIH de 100% para 9,606% (tabela 10).

Verifica-se que a curva concentração-resposta da NA com pré-incubação da fração polifenólica e da fentolamina, é muito semelhante à curva concentração-resposta da NA com pré-incubação de fentolamina, na AMIH (gráfico 5). Não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de E_{max} e pEC_{50} entre elas (tabela 10).

Se a fração polifenólica atuasse nos recetores α_1 e/ou α_2 era de esperar uma diminuição significativa do efeito contráctil máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de fentolamina e de 15 minutos da fração polifenólica, em comparação com o efeito máximo da NA na AMIH com uma pré-incubação de 30 minutos de fentolamina. No entanto, também neste caso, não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de % de E_{max} e de pEC_{50} da NA na presença de fentolamina ($9,606 \pm 3,510$ e $3,981 \pm 0,803$, respetivamente) e os valores de % de E_{max} e de pEC_{50} da NA na presença de prazosina e da fração polifenólica ($9,544 \pm 3,479$ e $3,483 \pm 1,726$, respetivamente) (tabela 10).

Assim, confirmando os resultados obtidos anteriormente, a fração polifenólica presente no extrato de *Oxalis pes-caprae* L. utilizada neste estudo, parece não ter afinidade para os recetores adrenérgicos α_1 e α_2 . Devem ser realizados mais estudos com concentrações mais elevadas da fração polifenólica para confirmar estas conclusões.

Uma vez que os fármacos antagonistas dos recetores α utilizados tiveram uma ação inibitória muito significativa às contrações induzidas pela NA, confirmou-se a existência dos recetores α_1 e α_2 na AMIH.

Comparando o vaso-relaxamento induzido pela fração polifenólica (10,4 mg/ml) e a ação inibitória dos antagonistas utilizados neste estudo, ioimbina, prazosina e fentolamina nas concentrações mencionadas anteriormente (gráfico 6), em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH, conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre eles (gráfico 6 e 7, tabela 11).

Pode, ainda, verificar-se que todos mostraram um efeito inibitório estatisticamente significativo às contrações induzidas pela NA na AMIH, apesar de esse efeito ser ligeiramente menor no caso da ioimbina, comparativamente aos outros antagonistas.

Assim, os recetores α_1 parecem ser os principais responsáveis pela vasoconstrição da NA na AMIH. Os estudos realizados por *Giessler, et al.* em 2002, em AMIHs, já referiam os recetores α_1 como os principais responsáveis por mediar a contração induzida pela NA, apesar de os α_2 também estarem presentes na AMI [136] e também serem responsáveis pelas contrações induzidas pela NA em vasos sanguíneos isolados [136, 142]. *Giessler, et al.* (2002) utilizaram os mesmos antagonistas dos recetores α utilizados neste estudo, estes também induziram um desvio da curva concentração-resposta da NA para a direita [136] e a prazosina mostrou-se um antagonista mais potente das contrações induzidas pela NA na AMIH comparativamente à ioimbina [136].

Dos resultados obtidos na AMIH, a fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. parece não atuar nos subtipos de recetores α_1 e α_2 .

É importante referir que, as AMIHs utilizadas neste estudo, foram provenientes de doentes sujeitos a uma cirurgia de revascularização coronária, muitos dos quais, para além de problemas cardiovasculares, têm outras patologias associadas como, por exemplo, diabetes, que podem alterar as suas características contrácteis.

Tal como mencionado no capítulo 1, tanto o avanço da idade como algumas patologias, levam a alterações nos recetores adrenérgicos [105,107-109,111,112,160]. Essas alterações não foram tidas em conta nestas experiências, no entanto, podem ter afetado os resultados. Por exemplo, com o avançar da idade e na insuficiência cardíaca crónica, parece ocorrer uma dessensibilização dos recetores β , principalmente dos recetores β_1 . A densidade de recetores α_1 parece aumentar, os níveis no coração passam de cerca de 11% para 25% [111,112]. Desta forma, em doentes com idades mais avançadas e/ou com determinadas patologias associadas, os recetores adrenérgicos α parecem passar a ter um papel mais importante do que os recetores β , o que pode não se verificar em pessoas mais jovens e/ou sem determinadas patologias associadas.

A inibição da vasoconstrição, induzida pela NA nos recetores adrenérgicos, mediada pela fração polifenólica, poderá ser mediada por recetores adrenérgicos β . Devem ser realizadas experiências com agonistas específicos desse tipo de recetores.

Estudos de *He, et al.* (1989), *Ferro, Kaumann e Brown* (1993), *Pešić, et al.* (2003), *Dessy, et al.* (2004) e *Rozec, et al.* (2005), mencionam a presença dos recetores adrenérgicos β na AMIH [138-142] e a estimulação dos recetores β_1 e β_2 causou vaso-relaxamento [138]. Através de abordagens complementares de biologia molecular, bioquímica e farmacologia

realizadas por *Dessy, et al.* (2004) e *Rozec, et al.* (2005), demonstrou-se a presença dos recetores β_3 na AMIH, capazes de, após estimulação, induzirem vaso-relaxamento [140,141].

De facto, os antagonistas dos recetores β , encontram-se entre os fármacos mais bem-sucedidos na história da medicina e continuam a ser uma terapêutica importante em diversas patologias, como na HTA [160].

Os efeitos benéficos dos flavonóides no sistema cardiovascular, alguns semelhantes aos descritos para os antagonistas dos recetores β , já foram mencionados em vários estudos. O estudo de *Abdalla, Zarga e Sabri* (1994) descreve os efeitos da luteolina no músculo liso vascular isolado do porquinho-da-Índia e, em concentrações elevadas, a vasodilatação induzida pela luteolina predominou sobre os seus efeitos cardíacos estimulatórios, com consequente diminuição da pressão e volume sanguíneos [193]. Estudos epidemiológicos de *Riemersma, et al.* (2001) sugerem a correlação entre uma dieta rica em flavonóides e um risco baixo de doenças cardiovasculares coronárias [178]. *Sucro, et al.* (2004) descrevem as flavonas apigenina e luteolina como inibidores potentes da formação de óxido nítrico pelos macrófagos ativados, componentes celulares envolvidos na aterosclerose [194].

Na revisão bibliográfica de *Vita* (2005), podem encontrar-se estudos sobre os efeitos benéficos dos flavonóides na disfunção endotelial e no tónus vascular, um efeito benéfico no lúmen arterial nas síndromes coronárias e um efeito inibitório na agregação plaquetar [179]. *Buwa, et al.* (2015), avaliaram os efeitos da apigenina no stresse oxidativo e no enfarte do miocárdio induzidos pelo isoproterenol durante a estimulação dos recetores adrenérgicos β em ratos através de alterações bioquímicas, histológicas e hemodinâmicas [192]. A apigenina (75mg/Kg) melhorou a função miocárdica, aumentou os antioxidantes endógenos no tecido pela diminuição do stresse oxidativo e diminuiu os danos no miocárdio [192].

Um estudo relativamente recente de *Fu, et al.* (2005) com a orientina, um derivado da luteolina, do extrato das folhas de bambu (*Phyllostachys nigra*), em anéis de artéria aorta torácica isolada de coelhos da Nova Zelândia, sugere que a orientina relaxa os anéis pré-contraídos utilizados pela via do NO-cGMP; os mecanismos que envolvem os canais K^+ , os recetores β e o cAMP não parecem envolvidos [190]. A pré-incubação de orientina (0,1-30 mM) inibiu as contrações induzidas pela NA em anéis de aorta sem endotélio, reforçando a ideia da ação direta da orientina nas células do músculo liso [190]. Devem ser

realizados mais estudos no sentido de perceber se os efeitos cardiovasculares da fração polifenólica podem ser úteis no tratamento de algumas patologias e se os recetores β participam, ou não, nesse efeito.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que, principalmente nas concentrações utilizadas mais elevadas da fração polifenólica, ocorre um vaso-relaxamento muito significativo em resposta às contrações induzidas pela NA na AMIH. Devem ser realizados estudos semelhantes a este com a A, para verificar se a fração polifenólica da *Oxalis pes-caprae* L. tem um efeito inibitório às contrações induzidas pela A semelhante ao verificado para a NA. Segundo os estudos de *Ferro, Kaumann e Brown* (1993), a NA relaxou a AMIH com uma potência e eficácia significativamente menores que a A [138], pelo que a A mostrou uma eficácia maior do que a NA nos recetores β_2 da AMIH. Desta forma, será de esperar um efeito contráctil máximo da A na AMIH menor do que o efeito contráctil máximo da NA na AMIH.

A fração polifenólica tem um efeito inibitório às contrações induzidas pela NA na AMIH, muito semelhante ao efeito inibitório dos antagonistas utilizados.

Uma vez que os fármacos prazosina e fentolamina ainda podem ser utilizados, em algumas situações, no controlo de patologias associadas com o aumento da ação da atividade do sistema nervoso simpático, é interessante verificar que estes e a fração polifenólica provocam uma diminuição, quantitativamente semelhante, do efeito contráctil máximo da NA na AMIH. Tanto os recetores α como os recetores β parecem estar envolvidos neste aumento da atividade do sistema nervoso simpático que, segundo estudos de *Izzo, et al.* (1999), *Reims, et al.* (2005), *Brotman, Golden, Wittstein* (2007), *Flaa, et al.* (2008) e *Pereira e Ribeiro* (2012), pode contribuir para o desenvolvimento da HTA e outras complicações cardiovasculares [99,161,164,165,170]. Segundo *Pereira e Ribeiro* (2012), as catecolaminas, que se encontram em níveis elevados, vão ativar os recetores adrenérgicos β_1 que exercem uma ação estimulante direta (inotropismo, cronotropismo e dromotropismo positivos), aumentando o DC e, conseqüentemente, a PA [99]. Por outro lado, níveis elevados de catecolaminas circulantes promovem vasoconstrição, especialmente nos vasos de resistência pré-capilares (da pele, mucosa e rins) juntamente com marcada constrição venosa, mediada pelos recetores α (sobretudo os recetores α_1). Estes fatores contribuem para o aumento da RVP, o que provoca o aumento da PA [99].

Em doentes com HTA moderada a severa, os fármacos mais eficazes incluem agentes que inibem a ação do sistema nervoso simpático [80]. E, portanto, independentemente dos recetores adrenérgicos onde os flavonóides presentes no extrato das folhas da *Oxalis pes-caprae* L. se possam ligar, ocorreu um efeito vasodilatador em resposta às contrações induzidas pela NA, capaz de atenuar o aumento da ação do sistema nervoso simpático causado pelo aumento dos níveis de catecolaminas que ocorre em algumas patologias, como a HTA.

Existem estudos recentes que testam as propriedades anti-hipertensoras dos flavonóides em animais, com resultados muito promissores.

Estudos “in vivo” em ratos (*Makarova e Makarov, 2010*) mostraram os efeitos anti-hipertensores de derivados da luteolina com diminuição da pressão sistólica e diastólica [189]. São vários os estudos que descrevem os efeitos anti-hipertensores dos flavonóides luteolina e apigenina, presentes em diversas espécies de plantas e frutos [191].

Vasant, et al. (2012) avaliaram o efeito anti-hipertensor e a atividade diurética do extrato de folhas (rico em derivados da luteolina e apigenina) da *Colocasia esculenta* Linn em ratos. Os flavonóides presentes no extrato podem ser responsáveis por efeitos anti-hipertensores e efeitos diuréticos fracos. O efeito anti-hipertensor pode ser devido à inibição da enzima conversora da angiotensina; pode ocorrer inibição da fosfodiesterase ou uma ação direta no endotélio vascular através do aumento da libertação de EDHF, com consequente vasodilatação [195].

Os estudos relativos à planta *Oxalis pes-caprae* L. e aos efeitos cardiovasculares dos flavonóides presentes no extrato das suas folhas são muito reduzidos. São necessários, em particular, mais estudos que comprovem que as propriedades desta planta podem dar uma contribuição importante no controlo/tratamento de patologias relacionadas com um aumento da atividade do sistema nervoso simpático, nomeadamente na HTA.



CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A noradrenalina (1-60 μM) provocou contrações dose-dependentes na artéria mamária interna humana.
- A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. não provocou contrações dose-dependentes na artéria mamária interna humana, na gama de concentrações utilizadas (0,104-10,4 mg/ml).
- A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. não mostrou atividade intrínseca para os recetores existentes na artéria mamária interna humana. Pode ser um antagonista, provavelmente não competitivo.
- Todas as concentrações da fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. utilizadas neste estudo (2,6; 5,2 e 10,4 mg/ml) reduziram o efeito contráctil máximo da noradrenalina na artéria mamária interna humana.
- Os compostos derivados da apigenina e da luteolina, presentes na fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L., parecem ser os principais responsáveis pelo seu efeito inibitório às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana.
- As concentrações utilizadas mais elevadas da fração polifenólica (5,2 e 10,4 mg/ml) do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. reduziram significativamente o efeito contráctil máximo da noradrenalina na artéria mamária interna humana, sem diferenças consideráveis entre si.
- A ioimbina (1×10^{-3} M) teve um efeito inibitório significativo às contrações induzidas pela noradrenalina.
- A pré-incubação com a fração polifenólica (10,4 mg/ml) e ioimbina (1×10^{-3} M) não alterou significativamente o efeito contráctil máximo da noradrenalina comparativamente ao efeito contráctil máximo da noradrenalina com pré-incubação de ioimbina, na artéria mamária interna humana. A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. parece não atuar nos recetores adrenérgicos α_1 .
- A prazosina (0,1 μM) teve um efeito inibitório significativo às contrações induzidas pela noradrenalina.

- A pré-incubação com a fração polifenólica (10,4 mg/ml) e prazosina (0,1 μ M) não alterou significativamente o efeito contráctil máximo da noradrenalina em relação ao efeito contráctil máximo da noradrenalina com pré-incubação de prazosina, na artéria mamária interna humana. A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. parece não atuar nos recetores adrenérgicos α_2 .
- A ioimbina (1×10^{-3} M) teve um efeito inibitório às contrações induzidas pela noradrenalina na artéria mamária interna humana menor que a prazosina (0,1 μ M). Os recetores α_1 parecem mais envolvidos no efeito vasoconstritor da noradrenalina, na artéria mamária humana, do que os recetores α_2 .
- A fentolamina (10 μ M) mostrou um efeito inibitório significativo às contrações induzidas pela noradrenalina.
- A pré-incubação com a fração polifenólica (10,4 mg/ml) e fentolamina (10 μ M) não alterou significativamente o efeito contráctil máximo da noradrenalina comparativamente ao efeito contráctil máximo da noradrenalina com pré-incubação de fentolamina, na artéria mamária humana. A fração polifenólica do extrato de folhas da *Oxalis pes-caprae* L. parece não atuar nos recetores adrenérgicos α_1 e α_2 .
- A fração polifenólica (10,4 mg/ml) e todos os fármacos antagonistas, utilizados nas concentrações anteriormente referidas, reduziram significativamente o efeito contráctil máximo da noradrenalina na artéria mamária interna humana, sem diferenças consideráveis entre si.

Referências bibliográficas

1. HEIN, Lutz. The Neuroendocrine Adrenergic System and Cardiovascular Function. In: *The Cardiovascular Adrenergic System*. Springer International Publishing, 2015. p. 117-132.
2. VULPIAN, Edme Félix Alfred. Note sur quelques réactions propres à la substance des capsules surrénales. *CR Acad Sci*, 1856, 43: 663-665.
3. OLIVER, George; SCHÄFER, Edward A. The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *The Journal of physiology*, 1895, 18.3: 230-276.
4. KOPIN, IRWIN J.; LAKE, RAYMOND C.; ZIEGLER, MICHAEL. Plasma levels of norepinephrine. *Annals of internal medicine*, 1978, 88.5: 671-680.
5. TAKAMINE, Jokichi. The isolation of the active principle of the suprarenal gland. *J Physiol*, 1901, 27: 29-30.
6. WEVERS, R. A., et al. A review of biochemical and molecular genetic aspects of tyrosine hydroxylase deficiency including a novel mutation (291delC). *Journal of inherited metabolic disease*, 1999, 22.4: 364-373.
7. WESTFALL, Thomas C.; WESTFALL, David P. Adrenergic agonists and antagonists. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. New York, McGraw-Hill, 2006, 237-315.*
8. WANG, Yan-Min, et al. Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biological psychiatry*, 1999, 46.9: 1124-1130.
9. AXELROD, J.; KOPIN, I. J. The uptake, storage, release and metabolism of noradrenaline in sympathetic nerves. *Prog Brain Res*, 1969, 31: 21-32.
10. LOEWI, O. Quantitative und qualitative Untersuchungen über den Sympathicusstoff. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 1936, 237.1: 504-514.
11. JARROTT, B. Uptake and metabolism of catecholamines in the perfused hearts of different species. *British journal of pharmacology*, 1970, 38.4: 810-821.
12. FULLER, Ray W. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1982, 22.1: 31-55.

13. STOLK, J. M., et al. Assessment of the functional role of brain adrenergic neurons: chronic effects of phenylethanolamine N-methyltransferase inhibitors and alpha adrenergic receptor antagonists on brain norepinephrine metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1984, 230.3: 577-586.
14. BAO, Xuping, et al. Epinephrine is required for normal cardiovascular responses to stress in the phenylethanolamine N-methyltransferase knockout mouse. *Circulation*, 2007, 116.9: 1024-1031.
15. SUN, Ping, et al. Epinephrine regulation of hemodynamics in catecholamine knockouts and the pithed mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1148.1: 325-330.
16. MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annual review of neuroscience*, 1979, 2.1: 113-168.
17. REIS, D. J., et al. Role of adrenaline neurons of ventrolateral medulla (the C1 group) in the tonic and phasic control of arterial pressure. *Clinical and Experimental Hypertension*, 1984, 6.1-2: 221-241.
18. ROSS, Christopher A., et al. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 1984, 228.2: 168-185.
19. JOHANSSON, Mats, et al. Cardiorenal epinephrine kinetics: evidence for neuronal release in the human heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1997, 273.5: H2178-H2185.
20. VON EULER, U. S. Pathophysiological aspects of catecholamine production. *Clinical chemistry*, 1972, 18.12: 1445-1448.
21. AXELROD, Julius. Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237.5: 1657-1660.
22. NAGATSU, Toshiharu, et al. Genes of human catecholamine-synthesizing enzymes. In: *Parkinson's Disease. From Clinical Aspects to Molecular Basis*. Springer Vienna, 1991. p. 19-38.
23. ZIGMOND, Richard E.; SCHWARZSCHILD, Michael A.; RITTENHOUSE, A. R. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annual review of neuroscience*, 1989, 12.1: 415-461.

24. SCHULDINER, Shimon. A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *Journal of neurochemistry*, 1994, 62.6: 2067-2078.
25. MASSON, J., et al. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*, 1999, 51.3: 439-464.
26. ERICKSON, Jeffrey Disbrow; EIDEN, Lee E.; HOFFMAN, Beth J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89.22: 10993-10997.
27. SCHULDINER, Shimon; FISHKES, Hanna; KANNER, Baruch I. Role of a transmembrane pH gradient in epinephrine transport by chromaffin granule membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978, 75.8: 3713-3716.
28. NJUS, David; KELLEY, Patrick M.; HARNADEK, Gordon J. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 1986, 853.3: 237-265.
29. ROTTENBERG, Hagai. Energetics of proton transport and secondary transport. *Methods in enzymology*, 1985, 125: 3-15
30. JOHNSON, R. G. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev*, 1988, 68.1: 232-307.
31. AHNERT-HILGER, Gudrun, et al. The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *The EMBO journal*, 1998, 17.2: 406-413.
32. HÖLTJE, Markus, et al. The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go2. *The Journal of Neuroscience*, 2000, 20.6: 2131-2141.
33. HÖLTJE, Markus, et al. The Vesicular Monoamine Content Regulates VMAT2 Activity through Gαq in Mouse Platelets EVIDENCE FOR AUTOREGULATION OF VESICULAR TRANSMITTER UPTAKE. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278.18: 15850-15858.
34. TRENDELENBURG, U. The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In: Catecholamines I. *Springer Berlin Heidelberg*, 1988. p. 279-319.
35. COSTA, Vera Marisa, et al. *Adrenaline and Noradrenaline: Partners and Actors in the Same Play*. INTECH Open Access Publisher, 2012.

36. MANDELA, Prashant; ORDWAY, Gregory A. The norepinephrine transporter and its regulation. *Journal of neurochemistry*, 2006, 97.2: 310-333.
37. GERSTBREIN, K.; SITTE, H. H. Currents in neurotransmitter transporters. In: *Neurotransmitter Transporters*. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 95-111.
38. EISENHOFER, Graeme. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacology & therapeutics*, 2001, 91.1: 35-62.
39. BÖNISCH, H.; BRÜSS, M. The norepinephrine transporter in physiology and disease. In: *Neurotransmitter Transporters*. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 485-524.
40. SCHNAITMAN, Carl; ERWIN, V. Gene; GREENAWALT, John W. THE SUBMITOCHONDRIAL LOCALIZATION OF MONOAMINE OXIDASE An Enzymatic Marker for the Outer Membrane of Rat Liver Mitochondria. *The Journal of cell biology*, 1967, 32.3: 719-735.
41. EISENHOFER, Graeme, et al. Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, 83.6: 2175-2185.
42. MÄNNISTÖ, Pekka T.; KAAKKOLA, Seppo. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological reviews*, 1999, 51.4: 593-628.
43. KEARNEY, Edna B., et al. Structure of the covalently bound flavin of monoamine oxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 1971, 42.3: 490-496.
44. JOHNSTON, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical pharmacology*, 1968, 17.7: 1285-1297.
45. KITAICHI, Yuji, et al. Combined treatment with MAO-A inhibitor and MAO-B inhibitor increases extracellular noradrenaline levels more than MAO-A inhibitor alone through increases in β -phenylethylamine. *European journal of pharmacology*, 2010, 637.1: 77-82.
46. GONCALVES, J.; CARVALHO, F.; GUIMARÃES, S. Uptake inhibitors do not change the effect of imidazoline α 2-adrenoceptor agonists on transmitter release evoked by single pulse stimulation in mouse vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1989, 339.3: 288-292.

47. EISENHOFER, Graeme. Plasma normetanephrine for examination of extraneuronal uptake and metabolism of noradrenaline in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1994, 349.3: 259-269.
48. EISENHOFER, Graeme; FINBERG, J. P. Different metabolism of norepinephrine and epinephrine by catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, 268.3: 1242-1251.
49. FRIEDGEN, Bernd; WÖLFEL, Reinhard; GRAEFE, Karl-Heinz. The contribution by monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase to the total-body and pulmonary plasma clearance of catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1996, 353.2: 193-199.
50. BLOOM, Floyd E. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. New York, McGraw-Hill, 2006, 283-304*
51. GRAEFE, K. H.; TRENDELENBURG, U. Influence of intraneuronal inactivating mechanisms on the membrane-amine pump. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie*, 1969, 266.4: 336-337.
52. GRAEFE, K.-H.; HENSELING, M. Neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1983, 14.1: 27-33.
53. GOLDSTEIN, David S.; EISENHOFER, Graeme; KOPIN, Irwin J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 305.3: 800-811.
54. LANGLEY, John Newport. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of physiology*, 1905, 33.4-5: 374-413.
55. AI-ILQUIST, RAYLIOND P. A study of the adrenotropic receptors. *Amer J Physiol*, 1948, 154: 586.
56. ALEXANDER, Stephen PH; MATHIE, Alistair; PETERS, John A. Guide to receptors and channels (GRAC). *British journal of pharmacology*, 2008, 153.S2: S1-S1.
57. GUIMARÃES, Serafim; MOURA, Daniel. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews*, 2001, 53.2: 319-356.

58. GUIMARÃES, Serafim. Further study of the adrenoceptors of the saphenous vein of the dog: influence of factors which interfere with the concentrations of agonists at the receptor level. *European journal of pharmacology*, 1975, 34.1: 9-19.
59. MOREIRA, Irina S. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2014, 1840.1: 16-33.
60. HAMM, Heidi E. The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273.2: 669-672.
61. BOCKAERT, Joël. G Protein-Coupled Receptors. In: *eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*, 2014. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000118.pub3
62. DOWNES, G. B.; GAUTAM, N. The G protein subunit gene families. *Genomics*, 1999, 62.3: 544-552.
63. SPRANG, Stephen R. Structures of heterotrimeric G proteins and their complexes. *Functioning of Transmembrane Receptors in Signaling Mechanisms: Cell Signaling Collection*, 2011, 199.
64. MCCUDDEN, C. R., et al. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62.5: 551-577.
65. SRIDHARAN, Rajashri, et al. Fluorescent approaches for understanding interactions of ligands with G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, 1838.1: 15-33.
66. DOCHERTY, James R. Subtypes of functional α 1-and α 2-adrenoceptors. *European journal of pharmacology*, 1998, 361.1: 1-15.
67. ZHONG, Hongying; MINNEMAN, Kenneth P. α 1-Adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology*, 1999, 375.1: 261-276.
68. ROUOT, Bruno, et al. Go, a major brain GTP binding protein in search of a function: purification, immunological and biochemical characteristics. *Biochimie*, 1987, 69.4: 339-349.
69. COTECCHIA, Susanna, et al. Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265.1: 63-69.
70. SURPRENANT, Annmarie, et al. A point mutation of the alpha 2-adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science*, 1992, 257.5072: 977-980.

71. AANTAA, Riku; MARJAMÄKI, Anne; SCHEININ, Mika. Molecular pharmacology of α 2-adrenoceptor subtypes. *Annals of medicine*, 1995, 27.4: 439-449.
72. WISE, A., et al. Interactions of the α 2A-adrenoceptor with multiple Gi-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem. J*, 1997, 323: 863-864.
73. LIMBIRD, Lee E. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *The FASEB Journal*, 1988, 2.11: 2686-2695.
74. FRIELLE, Thomas, et al. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84.22: 7920-7924.
75. EMORINE, Laurent J., et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, 1989, 245.4922: 1118-1121.
76. BROWN, ARTHUR M. Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1990, 259.6: H1621-H1628.
77. ASANO, T., et al. Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by beta-adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259.15: 9351-9354.
78. CHAUDHRY, Archana, et al. Differential interaction of β 1- and β 3 adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cellular signalling*, 1994, 6.4: 457-465.
79. HOFFMANN, B.B. Adrenoceptor-Activating & Other Sympathomimetic Drugs. *In: Basic & Clinical Pharmacology 10 th, vol. (Katzung, B. G.) London: McGraw-Hill Medical, 2004.*
80. BIAGGINI, Italo; ROBERTSON, David et al. Adrenoceptor Agonists & Sympathomimetic Drugs. *In: Basic & Clinical Pharmacology 12 th, vol. (Katzung, B. G.) London: McGraw-Hill Medical, 2012.*
81. ARIENS, E. J. Intrinsic activity: partial agonists and partial antagonists. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1983, 5: S8-15.
82. COLQUHOUN, D. The link between drug binding and response: theories and observations. *In: General Principles and Procedures. Springer US, 1979. p. 93-142.*
83. ARIENS, E. J.; SIMONIS, A. M. A molecular basis for drug action*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1964, 16.3: 137-157.

84. ARIENS, E. J., et al. The pharmacone-receptor-effector concept. In: General principles and procedures. *Springer US*, 1979. p. 33-91.
85. WILLIAM TANK, A.; LEE WONG, Dona. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. *Comprehensive Physiology*, 2015.
86. POCOCK, Gillian; RICHARDS, Christopher D.; RICHARDS, David A. Human physiology. *Oxford university press*, 2013.
87. BOEHM, Stefan; KUBISTA, Helmut. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacological reviews*, 2002, 54.1: 43-99.
88. GAUTHIER, Chantal; LANGIN, Dominique; BALLIGAND, Jean-Luc. β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends in pharmacological sciences*, 2000, 21.11: 426-431.
89. GAUTHIER, Chantal, et al. Functional β 3-adrenoceptor in the human heart. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 98.2: 556.
90. COTECCHIA, Susanna. The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2010, 30.6: 410-419.
91. MICHELOTTI, Gregory A.; PRICE, David T.; SCHWINN, Debra A. α 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics*, 2000, 88.3: 281-309.
92. PHILIPP, Melanie; HEIN, Lutz. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics*, 2004, 101.1: 65-74.
93. WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th ed. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. New York, McGraw-Hill*, 2006.
94. ALTMAN, John D., et al. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in α 2A-adrenergic receptor knockout mice. *Molecular Pharmacology*, 1999, 56.1: 154-161.
95. TRENDELENBURG, Anne-Ulrike, et al. All three α 2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2003, 368.6: 504-512.

96. MACMILLAN, Leigh B., et al. Central hypotensive effects of the α 2A-adrenergic receptor subtype. *Science*, 1996, 273.5276: 801-803.
97. BRODDE, Otto-Erich; MICHEL, Martin C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews*, 1999, 51.4: 651-690.
98. WACHTER, S. Blake; GILBERT, Edward M. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*, 2012, 122.2: 104-112.
99. PEREIRA, Mafalda Costa; RIBEIRO, Laura. Stresse, Catecolaminas e Risco Cardiovascular. *Arquivos de Medicina*, 2012, 26.6: 245-253.
100. SENBA, Emiko; UEYAMA, Takashi. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neuroscience research*, 1997, 29.3: 183-207.
101. ZAUGG, Michael, et al. β -Adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation*, 2000, 102.3: 344-350.
102. XIANG, Yang; DEVIC, Eric; KOBILKA, Brian. The PDZ binding motif of the β 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277.37: 33783-33790.
103. KRIEF, Stephanie, et al. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 91.1: 344.
104. SARTIANI, Laura, et al. Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2006, 40.2: 258-266.
105. BRODDE, Otto-Erich; BRUCK, Heike; LEINEWEBER, Kirsten. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *Journal of pharmacological sciences*, 2006, 100.5: 323-337.
106. SPADARI-BRATFISCH, Regina C.; DOS SANTOS, Iraides Nunes. Adrenoceptors and adaptive mechanisms in the heart during stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1148.1: 377-383.
107. SEALS, Douglas R.; ESLER, Murray D. Human ageing and the sympathoadrenal system. *The Journal of Physiology*, 2000, 528.3: 407-417.
108. WHITE, Michel, et al. Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation*, 1994, 90.3: 1225-1238.

109. BRODDE, O.-E., et al. Age-Dependent Changes in the [beta]-Adrenoceptor-G-Protein (s)-Adenylyl Cyclase System in Human Right Atrium. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1995, 26.1: 20.
110. FRANCIS, Gary S.; COHN, Jay N. The autonomic nervous system in congestive heart failure. *Annual review of medicine*, 1986, 37.1: 235-247.
111. O'CONNELL, Timothy D., et al. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacological reviews*, 2014, 66.1: 308-333.
112. JENSEN, Brian C., et al. Alpha-1-Adrenergic receptor subtypes in non-failing and failing human myocardium. *Circulation: Heart Failure*, 2009, CIRCHEARTFAILURE. 108.846212.
113. JENSEN, Brian C., et al. Functional alpha-1B adrenergic receptors on human epicardial coronary artery endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2010, 382.5-6: 475-482.
114. LYMPEROPOULOS, Anastasios; RENGO, Giuseppe; KOCH, Walter J. Adrenergic nervous system in heart failure pathophysiology and therapy. *Circulation research*, 2013, 113.6: 739-753.
115. GAUTHIER, Chantal, et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 102.7: 1377.
116. REITER, Eric; LEFKOWITZ, Robert J. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology & metabolism*, 2006, 17.4: 159-165.
117. GARCÍA-SÁINZ, J. Adolfo; VÁZQUEZ-PRADO, José; DEL CARMEN MEDINA, Luz. α 1-Adrenoceptors: function and phosphorylation. *European journal of pharmacology*, 2000, 389.1: 1-12.
118. HEUSCH, Gerd, et al. [alpha] 1 and [alpha] 2-Adrenoceptor-Mediated Vasoconstriction of Large and Small Canine Coronary Arteries In Vivo. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1984, 6.5: 961-968.
119. BARBATO, Emanuele. Role of adrenergic receptors in human coronary vasomotion. *Heart*, 2009, 95.7: 603-608.
120. FURCHGOTT, ROBERT F.; VANHOUTTE, PAUL M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, 1989, 3.9: 2007-2018.

121. CICCARELLI, Michele, et al. Endothelial G Protein–Coupled Receptor Kinase 2 Regulates Vascular Homeostasis Through the Control of Free Radical Oxygen Species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013, 33.10: 2415-2424.
122. IACCARINO, Guido, et al. Ischemic Neoangiogenesis Enhanced by β 2-Adrenergic Receptor Overexpression A Novel Role for the Endothelial Adrenergic System. *Circulation research*, 2005, 97.11: 1182-1189.
123. CICCARELLI, Michele, et al. Impaired neoangiogenesis in β 2–adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human β 2–adrenoceptor gene transfer and role of NF κ B and CREB transcription factors. *British journal of pharmacology*, 2011, 162.3: 712-721.
124. RATH, Géraldine; BALLIGAND, Jean-Luc; CHANTAL, Dessy. Vasodilatory mechanisms of beta receptor blockade. *Current hypertension reports*, 2012, 14.4: 310-317.
125. PALMER, R. MoJ; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327: 524-526.
126. SCHMIDT, Harald HHW; WALTER, Ulrich. NO at work. *Cell*, 1994, 78.6: 919-925.
127. QUEEN, Lindsay R., et al. Mechanisms underlying β 2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of physiology*, 2006, 576.2: 585-594.
128. BOCKMAN, Charles S.; JEFFRIES, William B.; ABEL, Peter W. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1993, 267.3: 1126-1133.
129. BOCKMAN, Charles S.; GONZALEZ-CABRERA, Isabel; ABEL, Peter W. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, 278.3: 1235-1243.
130. DOCHERTY, James R. The Adrenergic System in Vascular Smooth Muscle. In: *The Cardiovascular Adrenergic System*. Springer International Publishing, 2015. p. 45-74.

131. GOULOPOULOU, Styliani; WEBB, R. Clinton. Symphony of Vascular Contraction How Smooth Muscle Cells Lose Harmony to Signal Increased Vascular Resistance in Hypertension. *Hypertension*, 2014, 63.3: e33-e39.
132. ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine; HALL, Alan. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420.6916: 629-635.
133. LOOP, Floyd D., et al. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *New England Journal of Medicine*, 1986, 314.1: 1-6.
134. MULLER-SCHWEINITZER, E., et al. Age-Related Contractile Force of Human Vessels. *Angiol*, 2014, 2.122: 2.
135. BEVILACQUA, Maurizio, et al. α 1 Adrenoceptor subtype mediates noradrenaline induced contraction of the human internal mammary artery: radioligand and functional studies. *Cardiovascular research*, 1991, 25.4: 290-294.
136. GIESSLER, Christine, et al. Noradrenaline-induced contraction of human saphenous vein and human internal mammary artery: involvement of different α -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2002, 366.2: 104-109.
137. RUDNER, Xiaowen L., et al. Subtype specific regulation of human vascular α 1-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation*, 1999, 100.23: 2336-2343.
138. FERRO, A.; KAUMANN, A. J.; BROWN, M. J. β 1-and β 2-adrenoceptor-mediated relaxation in human internal mammary artery and saphenous vein: unchanged β - and α -adrenoceptor responsiveness after chronic β 1-adrenoceptor blockade. *British journal of pharmacology*, 1993, 109.4: 1053-1058.
139. HE, Guo-Wei, et al. Weak beta-adrenoceptor-mediated relaxation in the human internal mammary artery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1989, 97.2: 259-266.
140. ROZEC, Bertrand, et al. Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, 46.2: 351-359.
141. DESSY, Chantal, et al. Endothelial β 3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation*, 2004, 110.8: 948-954.

142. PEŠIÆ, Srđan, et al. Effect of the vascular endothelium on contractions induced by noradrenaline and phenylephrine in perforating branch of the human internal mammary artery. *Pol. J. Pharmacol*, 2003, 55: 581-593.
143. PIERCE, J. R. *Oxalis pes-caprae* L., *Plant Prot. Q.*, 1997, 12, 110-119.
144. SALA, A.; VERDAGUER, D.; VILÀ, M. Ann. Bot., Sensitivity of the invasive geophyte *Oxalis pes-caprae* to nutrient availability and competition. 2007, 99, 637-645.
145. DELLAGRECA, Marina, et al. Phenyl Cinnamate Derivatives from *Oxalis pes-caprae*. *Chemistry & biodiversity*, 2008, 5.11: 2408-2414.
146. DELLAGRECA, Marina, et al. Phytotoxic Aromatic Constituents of *Oxalis pes-caprae*. *Chemistry & biodiversity*, 2009, 6.4: 459-465.
147. DELLAGRECA, Marina; PREVITERA, Lucio; ZARRELLI, Armando. A new aromatic component from *Oxalis pes-caprae*. *Natural product research*, 2010, 24.10: 958-961.
148. HARBORNE, Jeffrey B.; WILLIAMS, Christine A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55.6: 481-504.
149. WANG, F., et al. Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2005, 4.5: 575-585.
150. NIELSEN, M.; FRØKJAER, S.; BRAESTRUP, C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Biochemical pharmacology*, 1988, 37.17: 3285-3287.
151. AVALLONE, R., et al. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical pharmacology*, 2000, 59.11: 1387-1394.
152. COLETA, M., et al. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytotherapy research*, 2006, 20.12: 1067-1073.
153. OCCHIUTO, F., et al. Comparative antiarrhythmic and anti-ischaemic activity of some flavones in the guinea-pig and rat. *Phytotherapy Research*, 1991, 5.1: 9-14.
154. BERETZ, A.; STOCLET, J. C.; ANTON, R. Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cyclic AMP phosphodiesterase inhibition. In: *Planta Medica. PO BOX 30 11 20, D-70451 STUTTGART, GERMANY: GEORG THIEME VERLAG*, 1980. p. 236-237.

155. LAEKEMAN, G.M., et al. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. *Planta medica*, 1986, 52.6: 433-437.
156. KO, Feng-Nien; HUANG, Tur-Fu; TENG, Che-Ming. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1991, 1115.1: 69-74.
157. DUARTE, J., et al. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1993, 24.4: 857-862.
158. SHOSHAN, Varda, et al. Quercetin inhibits Ca^{2+} uptake but not Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum in skinned muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77.8: 4435-4438.
159. MANCIA, Giuseppe, et al. 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). *Blood pressure*, 2013, 22.4: 193-278.
160. FISHER, Filip Y.; GRIMM, Daniela; WEHLAND, Markus. Third-Generation Beta-Adrenoceptor Antagonists in the Treatment of Hypertension and Heart Failure. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2015.
161. FLAA, Arnljot, et al. Sympathoadrenal stress reactivity is a predictor of future blood pressure an 18-year follow-up study. *Hypertension*, 2008, 52.2: 336-341.
162. BORKOWSKI, K. R.; QUINN, P. Adrenaline and the development of spontaneous hypertension in rats. *Journal of autonomic pharmacology*, 1985, 5.2: 89-100.
163. MANN, J. F. E., et al. Choice of therapy in primary (essential) hypertension: Recommendations. *UpToDate: www.uptodate.com*, 2013.
164. BROTMAN, Daniel J.; GOLDEN, Sherita H.; WITTSTEIN, Ilan S. The cardiovascular toll of stress. *The Lancet*, 2007, 370.9592: 1089-1100.
165. REIMS, Henrik M., et al. Adrenaline during mental stress in relation to fitness, metabolic risk factors and cardiovascular responses in young men. *Blood pressure*, 2005, 14.4: 217-226.
166. MAJEWSKI, H.; RAND, M. J.; TUNG, L. H. Activation of prejunctional beta-adrenoceptors in rat atria by adrenaline applied exogenously or released as a co-transmitter. *British journal of pharmacology*, 1981, 73.3: 669-679.
167. GIBSON, Jennifer A.; RAPHAEL, Brooke. Using beta-blockers with coronary artery disease. *Nursing2015 Critical Care*, 2015, 10.3: 6-10.

168. WEHLAND, Markus, et al. The effects of newer beta-adrenoceptor antagonists on vascular function in cardiovascular disease. *Current vascular pharmacology*, 2012, 10.3: 378-390.
169. www.uc.pt/invasoras
170. IZZO, J. L. The sympathetic nervous system in human hypertension. *Hypertension Primer. 2nd ed. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins*, 1999, 109-112.
171. AARONSON, Philip I.; WARD, Jeremy PT; CONNOLLY, Michelle J. Regulation of the vasculature by the endothelium. *In: The Cardiovascular System at a Glance 4th edn. John Wiley & Sons*, 2013.
172. LYMPEROPOULOS, Anastasios. Receptors Mediating the Effects of the Cardiovascular adrenergic system and Cardiovascular Effects of adrenergic system under normal conditions. *In: The Cardiovascular Adrenergic System. Cham: Springer International Publishing*, 2015.
173. BENOWITZ, Neel; MD. Antihypertensive Agents. *In: Basic & Clinical Pharmacology, 12 th, vol. (Katzung, B. G.), McGraw-Hill Medical*, 2012.
174. MELIN, Kyle. Antihypertensives. *In: Lippincott's illustrated reviews. Pharmacology. 6th ed. (Karen Whalen et al), Wolters Kluwer*, 2015.
175. AARONSON, Philip I.; WARD, Jeremy PT; CONNOLLY, Michelle J. Overview of the Cardiovascular system. *In: The Cardiovascular System at a Glance 4th edn. John Wiley & Sons*, 2013.
176. AARONSON, Philip I.; WARD, Jeremy PT; CONNOLLY, Michelle J. The control of blood pressure. *In: The Cardiovascular System at a Glance 4th edn. John Wiley & Sons*, 2013.
177. MOLENAAR, P., et al. Autoradiographic localization and function of β -adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *British journal of pharmacology*, 1988, 95.1: 225-233.
178. RIEMERSMA, R. A., et al. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Qjm*, 2001, 94.5: 277-282.
179. VITA, Joseph A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American journal of clinical nutrition*, 2005, 81.1: 292S-297S
180. JIANG, Fan; DUSTING, Gregory J. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current vascular pharmacology*, 2003, 1.2: 135-156.

181. GARCÍA-LAFUENTE, Ana, et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 2009, 58.9: 537-552.
182. DA GRAÇA CAMPOS, Maria; MARKHAM, Kenneth R. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. *Imprensa da Univ. de Coimbra*, 2007.
183. LEE, Jee-Young; JEONG, Ki-Woong; KIM, Yangmee. Flavonoids can be potent inhibitors of human phenylethanolamine N-methyltransferase (hPNMT). *Bull. Korean Chem. Soc*, 2009, 30.8: 1835.
184. SCHOEFFTER, Philippe; DION, Robert; GODFRAIND, Théophile. Modulatory role of the vascular endothelium in the contractility of human isolated internal mammary artery. *British journal of pharmacology*, 1988, 95.2: 531-543.
185. GOW, Iain F.; MITCHELL, Evelyn; WAIT, Martin. Adrenergic receptors in the bovine mammary artery. *Biochemical pharmacology*, 2003, 65.10: 1747-1753.
186. PAGÁN, Rosa María, et al. Endothelial and neural factors functionally involved in the modulation of noradrenergic vasoconstriction in healthy pig internal mammary artery. *Biochemical pharmacology*, 2012, 83.7: 882-892.
187. PIETRI-ROUXEL, F.; STROSBERG, A. D. Pharmacological characteristics and species-related variations of β_3 -adrenergic receptors. *Fundamental & clinical pharmacology*, 1995, 9.3: 211-218.
188. IWASE, Masanori, et al. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. *Hypertension Research*, 2000, 23.5: 503-510.
189. MAKAROVA, M. N.; MAKAROV, V. G. Molecular biology of flavonoids (chemistry, biochemistry, pharmacology): Manula for doctors. *Lemapublishing, St-Petersburg*, 2010, pp.272–290.
190. FU, Xiao-Chun, et al. Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28.1: 37-41.
191. SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, 2014, 84: 206-239.
192. BUWA, Chhabildas C., et al. *Apigenin Attenuates β -Receptor-Stimulated Myocardial Injury Via Safeguarding Cardiac Functions and Escalation of Antioxidant Defence System*. *Cardiovascular toxicology*, 2015, 1-12.

193. ABDALLA, S.; ZARGA, M. Abu; SABRI, S. Effects of the flavone luteolin, isolated from *Colchicum richii*, on guinea-pig isolated smooth muscle and heart and on blood pressure and blood flow. *Phytotherapy Research*, 1994, 8.5: 265-270.
194. SCURO, Loren S., et al. Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. *BMC biochemistry*, 2004, 5.1: 5.
195. VASANT, Otari Kishor, et al. Antihypertensive and diuretic effects of the aqueous extract of *Colocasia esculenta* Linn. leaves in experimental paradigms. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 2012, 11.2: 621.