



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

DANILO GALVÃO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS**

FORTALEZA
2018

DANILO GALVÃO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho

Coorientador: Francisco Vagnaldo Fachine

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R1a ROCHA, DANILO GALVÃO.

Avaliação do efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos / DANILO GALVÃO ROCHA. – 2018.

93 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

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

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru.

1. Vasodilatadores. 2. Artérias mesentéricas. 3. Canais de Cálcio. 4. Óxido Nítrico. I.
Título.

CDD 615.1

DANILO GALVÃO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em: 21/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Gilmara Holanda da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Crispim Moraes Lima Ribeiro
Centro Universitário Christus (Unichristus)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família, em especial meus pais, Neide e Júnior, e minha irmã, Camila, por todo o suporte familiar e apoio que sempre me deram.

À Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Farmacologia e Fisiologia e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, pela oportunidade da realização do trabalho, além de todo o suporte e estrutura oferecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, por sempre acreditar no meu potencial durante todos esses anos como orientador, desde a graduação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine, por todos esses anos de parceria e ensinamentos, por ter me iniciado na vida científica, sempre ter me apoiado e confiado em mim e por ter sido um exemplo de pesquisador, ético e sempre buscando estudar e aprender mais.

Aos professores das bancas de qualificação, Prof. Dr. Daniel Freire, Prof. Dr. Ricardo de Freitas e Prof^a. Dr^a. Roberta Jeane, e de defesa, Prof^a. Dr^a. Gilmara Holanda e Prof. Dr. João Crispim, pelo tempo disponibilizado para avaliação do trabalho, bem como pelas sugestões para engrandecimento do mesmo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pelas contribuições para o meu crescimento científico e meu conhecimento e, em especial, às Prof^a. Maria Elisabete Amaral e Helena Serra Azul, pelas contribuições ao meu projeto.

A todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Afrânio Craveiro e Prof. Dr. Claudio Costa pela ajuda com a caracterização química do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*.

Às secretárias Adelânia, Maria Tereza e Fabia, por sempre estarem dispostas a ajudar no que fosse preciso.

Aos funcionários do biotério, Wesley, Francisco e Diego, por todo o cuidado com os nossos animais.

Aos meus colegas de laboratório, Thais Muratori, João Alison, Pedro e Behatriz, por todo o suporte e ajuda durante esses anos.

Aos meus colegas do LFAVET Natacha, Paula Leticia, Paula Priscila, Junior, Rafael, Pedro e Aline, por sempre me receberem de portas abertas no laboratório.

À minha amiga Luri, por sempre ter me incentivado e acreditado no meu potencial, as vezes mais do que eu mesmo.

Aos meus amigos Ana Virginia, Talysson, Larissa e Ravena pelos momentos de descontração necessários para aguentar toda a correria e pressão da pós-graduação.

Aos meus colegas de pós-graduação Camilla Mateus, Emanuela Diniz, Lucas Brito, Thais Brito e Pedro Everson, pelos momentos compartilhados.

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança.”

(Stephen Hawking)

RESUMO

Avaliação do efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos. Danilo Galvão Rocha. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018.

A *Alpinia zerumbet* é uma planta da família *Zingiberaceae*, popularmente conhecida como Colônia e utilizada no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e da ansiedade. Já foram realizadas diversas pesquisas com a *Alpinia zerumbet* mostrando atividade anti-hipertensiva, vasodilatadora, antioxidante, dentre outras, porém, nenhuma pesquisa verificou o efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) em vasos de resistência. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito vasodilatador do OEAz em artérias de resistência isoladas de rato Wistar, bem como estudar o seu mecanismo de ação. Para tanto, foi verificado o efeito do OEAz (3 – 3000 µg/mL) na tensão isométrica mensurada em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica (SSRAM), com endotélio íntegro, pré-contraídos com KCl (80 mM) ou U-46619 (3 µM). Além disso, para se avaliar o mecanismo de ação do OEAz, foi verificada a influência da presença do endotélio, bem como a interferência da incubação com inibidores de diversas vias de relaxamento muscular (TEA, 4-AP, Glibenclamida, Atropina, L-NAME, ODQ, Indometacina) no efeito vasodilatador do OEAz em SSRAM pré-contraídas com U-46619. Foram realizados, ainda, alguns protocolos visando verificar o efeito do OEAz no influxo de Ca²⁺, mediante contração induzida por CaCl₂ em meio com alta concentração de K⁺, bem como na liberação dos estoques intracelulares de Ca²⁺, através da contração induzida por Fenilefrina e por Cafeína em meio sem Ca²⁺. Foi observado um efeito vasodilatador independente de endotélio do OEAz em SSRAM, com CE₅₀ de 33,17 µg/mL (IC95%: 28,11 – 39,38) em artérias pré-contraídas com KCl e CE₅₀ de 21,52 µg/mL (IC95%: 17,68 – 25,95) em artérias pré-contraídas com U-46619, tendo sido observada uma potência significativamente maior (P<0,01) do OEAz em SSRAM pré-contraídas com U-46619, quando comparadas às pré-contraídas com KCl. Com relação aos inibidores, os únicos que causaram uma alteração significativa na CE₅₀ do OEAz, quando comparados ao controle, foram o ODQ, com CE₅₀ de 39,47 µg/mL (IC95%: 36,7 – 42,44) (P<0,001), e o L-NAME, com CE₅₀ de 35,15 µg/mL (IC95%: 33,41 – 37,03) (P<0,001), entretanto os inibidores não causaram uma redução no E_{max}. Com relação aos protocolos de contração induzida por CaCl₂ em meio rico em K⁺, e por cafeína e fenilefrina em meio sem Ca²⁺, foi observada uma redução da contração muscular, nos três protocolos, causada pela incubação com o OEAz, de maneira dose-dependente. Portanto, os resultados encontrados sugerem que o OEAz causa um efeito vasodilatador independente de endotélio, mediante inibição do influxo de Ca²⁺ e da liberação dos estoques intracelulares de Ca²⁺, bem como uma ativação da via NOS/GCs.

Palavras-chave: Vasodilatadores; Artérias mesentéricas; Canais de cálcio; Óxido nítrico.

ABSTRACT

Evaluation of effect of essential oil of *Alpinia zerumbet* on vascular reactivity of rat resistance arteries. Danilo Galvão Rocha. Advisor: Prof. Ph.D. Manoel Odorico de Moraes Filho. Master's Degree Dissertation. Postgraduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, 2018.

Alpinia zerumbet is a plant from Zingiberaceae family, popularly known in Brazil as "Colônia", used for anxiety and systemic arterial hypertension treatment. Several studies have already demonstrated its anti-hypertensive, vasodilator and antioxidant activities, among others, but no research aimed to verify the vasodilator effect of essential oil from *Alpinia zerumbet* (EOAz) in resistance vessels. Thus, the aim of this study was to evaluate the vasorelaxant effect of EOAz and to assess its mechanism of action in mesenteric small arteries isolated from Wistar rats. Therefore, the effect of EOAz (03 to 3000 µg/mL) was verified by isometric tension, measured in rings of second-order branch of the mesenteric artery (SOBMA), with intact endothelium, pre-contracted by KCl (80 mM) and U-46619 (03 µM). To study the mechanism of action, it was evaluated the influence of endothelium presence, and the influence of several inhibitors (TEA, 4-AP, Glybenclamide, Atropine, L-NAME, ODQ and indomethacin) on vasodilator effect of EOAz in SOBMA pre-contracted by U-46619. Some protocols were also performed targeting to study Ca²⁺ influx, through CaCl₂ contraction in high K⁺ medium, as well as Ca²⁺ release from intracellular storages by caffeine and phenylephrine induced contraction in Ca²⁺ free medium. Results showed an endothelium-independent vasorelaxant effect of EOAz on SOBMA pre-contracted by KCl, with an EC₅₀ of 33.17 µg/mL (CI95%: 28.11 to 39.38), and U-46619, with an EC₅₀ of 21.52 µg/mL (CI95%: 17.68 to 25.95). Significantly higher potency (P<0,01) was observed for SOBMA pre-contracted by U-46619, when compared to those pre-contracted by KCl. Regarding the inhibitors, only ODQ and L-NAME produced significant alteration on EC₅₀ when compared to Control, with values of 39.47 µg/mL (CI95%: 36.7 to 42.44; P<0,001), and 35.15 µg/mL (CI95%: 33.41 to 37.03), respectively. However, the inhibitors did not cause an E_{max} reduction. Concerning calcium assays, reduction on muscle contraction caused by incubation with EOAz was observed in all three protocols in a dose-dependent manner. Hence, our results suggest that essential oil of *Alpinia zerumbet* causes a vasodilator effect, mediated by inhibition of Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular storages, as well as an activation of NOS/GCs pathway.

Key-words: Vasodilator agents; Mesenteric Arteries; Calcium channels; Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Imagem ilustrativa do músculo liso.....	18
Figura 2 -	Esquema do processo de contração do músculo liso.....	20
Figura 3 -	Esquema do processo de relaxamento do músculo liso.....	21
Figura 4 -	Esquema do mecanismo de vasorrelaxamento induzido pelo óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e pela prostaciclina.....	24
Figura 5 -	Imagem ilustrativa da <i>Alpinia zerumbet</i>	28
Figura 6 -	Estruturas químicas do Terpinen-4-ol e do 1,8-cineol.....	33
Figura 7 -	Foto ilustrativa da exsicata da <i>Alpinia zerumbet</i>	39
Figura 8 -	Imagem do miógrafo de fio.....	41
Figura 9 -	Vista superior das cubas do miógrafo.....	42
Figura 10 -	Imagem do modulo DMT <i>normalization</i>	43
Figura 11 -	Traçado típico do teste de viabilidade.....	44
Figura 12 -	Figura esquemática com os passos do procedimento experimental.....	44
Figura 13 -	Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl (80 mM).....	45
Figura 14 -	Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).....	46
Figura 15 -	Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica com endotélio desnudo pré-contraídos com U-46619 (3 μ M) ou KCl (80 mM).....	47
Figura 16 -	Representação esquemática do protocolo para verificar a influência dos canais de potássio no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).....	48
Figura 17 -	Representação esquemática do protocolo para verificar a influência dos receptores muscarínicos, da NOS e da GCs	

no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).....	49
Figura 18 - Representação esquemática do protocolo para verificar a participação dos prostanoídes no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).....	49
Figura 19 - Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito do OEAz no influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.....	51
Figura 20 - Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito do OEAz na liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} através de receptores de IP3 e de rianodina.....	52
Figura 21 - Traçado típico do efeito vasodilatador do OEAz em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl (80 mM) e com U-46619 (3 μ M).....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito do OEAz (n=6) e do veículo (Tween) (n=6) em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com KCl (80 mM).....	56
Gráfico 2 -	Efeito do OEAz (n=6) e do veículo (Tween) (n=6) em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (n=6) pré-contraídas com U-46619 (3 μ M).....	57
Gráfico 3 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) pré-contraídas com KCl (80 mM) (n=6) e U-46619 (3 μ M) (n=6)..	58
Gráfico 4 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) (n=6) e desnudo (E-) (n=6) pré-contraídas com KCl (80 mM).....	60
Gráfico 5 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) (n=6) e desnudo (E-) (n=6) pré-contraídas com U-46619 (3 μ M).....	61
Gráfico 6 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio desnudo (E-) pré-contraídas com KCl (80 mM) (n=6) e U46619 (3 μ M) (n=6)...	62
Gráfico 7 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Tetraetilamônio (TEA, 10 μ M).....	63
Gráfico 8 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Glibenclamida (Glib, 10 μ M).....	64
Gráfico 9 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de 4-Aminopiridina (4-AP, 10 μ M).....	65

Gráfico 10 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Atropina (1 μ M).....	66
Gráfico 11 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de L-NAME (100 μ M).....	67
Gráfico 12 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de ODQ (10 μ M).....	68
Gráfico 13 -	Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Indometacina (Indo, 10 μ M).....	69
Gráfico 14 -	Efeito do CaCl ₂ em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro que passaram por um processo para depleção dos estoques intracelulares de cálcio, mantidas em meio sem cálcio contendo KCl 80 mM, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 μ g/mL (OEAz30, n=6), 100 μ g/mL (OEAz100, n=6), ou 300 μ g/mL (OEAz300, n=6).....	72
Gráfico 15 -	Efeito da Fenilefrina (PHE, 10 μ M) em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro, mantidas em meio sem cálcio, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 μ g/mL (n=6), 100 μ g/mL (n=6), ou 300 μ g/mL (n=6).....	73
Gráfico 16 -	Efeito da Cafeína (30 mM) em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro, mantidas em meio sem cálcio, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 μ g/mL (n=6), 100 μ g/mL (n=6), ou 300 μ g/mL (n=6).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de Krebs-Henseleit modificada.....	37
Tabela 2 - Composição da solução de Krebs-Henseleit sem cálcio.....	37
Tabela 3 - Fármacos utilizados no estudo, juntamente com sua concentração e descrição.....	38
Tabela 4 - Caracterização química do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM).....	54
Tabela 5 - Dados do diâmetro interno normalizado dos segmentos de artéria mesentérica.....	55
Tabela 6 - Efeito vasodilatador do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) (n=6) ou KCl (80 mM) (n=6) com (E+) (n=6) ou sem (E-) (n=6) endotélio íntegro.....	62
Tabela 7 - Efeito vasodilatador do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídas com U-46619 com endotélio desnudo (E-), ou íntegro na presença de L-NAME, ODQ, Atropina, Indometacina, Tetraetilamônio, Glibenclamida, ou 4-aminopiridina (n=6).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIOCEN-UFC	Biotério central da UFC
CAM	Calmodulina
CE ₅₀	Concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima
CEUA-UFC	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DL ₅₀	Dose letal em 50% da amostra
EAAz	Extrato aquoso de <i>Alpinia zerumbet</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
E _{max}	Efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
FHDE	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
FMOEAz	Fração metanólica do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>
Glib	Glibenclamida
GCs	Guanilato Ciclase solúvel
GDP	Difosfato de guanosina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IC1	Circunferência Interna equivalente a 10% da IC100
IC100	Circunferência interna a 100 mmHg
INDO	Indometacina
IP3	1,4,5-Trifosfato de inositol

IP3R	Receptor do 1,4,5-Trifosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	<i>N_ω-Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride</i>
LFPC	Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MLC	Cadeia leve de miosina
NO	Óxido nítrico
NOAEL	Dose sem efeitos adversos observáveis
NOS	Óxido nítrico sintase
NPDM	Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos
ODQ	<i>1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i>
OEAs	Óleo essencial de <i>Alpinia speciosa</i>
OEFAz	Óleo essencial do fruto de <i>Alpinia zerumbet</i>
OEAz	Óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico
PAS	Pressão arterial sistêmica
PGI ₂	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
ROCC	Canal de Ca ²⁺ dependente de ligantes
RVP	Resistência vascular periférica
RyR	Receptor de Rianodina
SSRAM	Segmento de segundo ramo de artéria mesentérica
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco/endoplasmático
TEA	Tetraetilamônio
TXA ₂	Tromboxano
U-46619	<i>9,11-diedoxy-11α,9α-epoxymethanoprostaglandin F_{2α}</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VOCC	Canal de Ca ²⁺ operado por voltagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	MÚSCULO LISO VASCULAR	18
1.1.1	<i>Mecanismo de contração</i>	19
1.1.2	<i>Mecanismos de relaxamento</i>	21
1.2	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	24
1.3	FITOTERAPIA	25
1.4	ALPINIA ZERUMBET	27
1.4.1	<i>Botânica</i>	27
1.4.2	<i>Toxicologia</i>	28
1.4.3	<i>Propriedades farmacológicas</i>	30
1.4.4	<i>Óleo essencial de Alpinia zerumbet</i>	33
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	ANIMAIS	36
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	36
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	36
4.4	FÁRMACOS E REAGENTES	36
4.4.1	<i>Solução de Krebs-Henseleit</i>	36
4.4.2	<i>Fármacos</i>	38
4.4	ÓLEO ESSENCIAL DE ALPINIA ZERUMBET	39
4.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.5.1	<i>Efeito vasodilatador do óleo essencial de Alpinia zerumbet (OEAz) em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl</i>	44
4.5.2	<i>Efeito vasodilatador do óleo essencial de Alpinia zerumbet em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619</i>	45

4.5.3 Avaliação da influência do endotélio vascular no efeito vasodilatador do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl ou U-46619.	46
4.5.4 Avaliação da influência dos canais de potássio no efeito vasodilatador do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>.	47
4.5.5 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos, Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Guanilato Ciclase solúvel (GCs) no efeito vasodilatador do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>.	48
4.5.6 Avaliação da participação de prostanóides no efeito vasodilatador do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>.	49
4.5.7 Avaliação da influência do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> na contração induzida por Ca^{2+} na presença de alta concentração de K^+ após depleção do Ca^{2+} intracelular.	50
4.5.8 Avaliação da influência do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> na contração induzida por fenilefrina ou cafeína na ausência de Ca^{2+} extracelular.	51
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO OEAZ	54
5.2 DIÂMETRO INTERNO NORMALIZADO	54
5.3 EFEITO VASODILATADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ALPINIA ZERUMBET</i> (OEAZ) EM SEGMENTOS DE SEGUNDO RAMO DE ARTÉRIA MESENTÉRICA (SSRAM) PRÉ-CONTRAÍDAS COM KCL OU U-46619.	55
5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ENDOTÉLIO VASCULAR NO EFEITO VASODILATADOR DO OEAZ EM SSRAM PRÉ-CONTRAÍDOS COM KCL OU U-46619.	59
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO VASODILATADOR DO OEAZ.	62
5.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS, DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) E DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCs) NO EFEITO VASODILATADOR DO OEAZ.	65
5.5 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS PROSTANÓIDES NO EFEITO VASODILATADOR DO OEAZ.	68

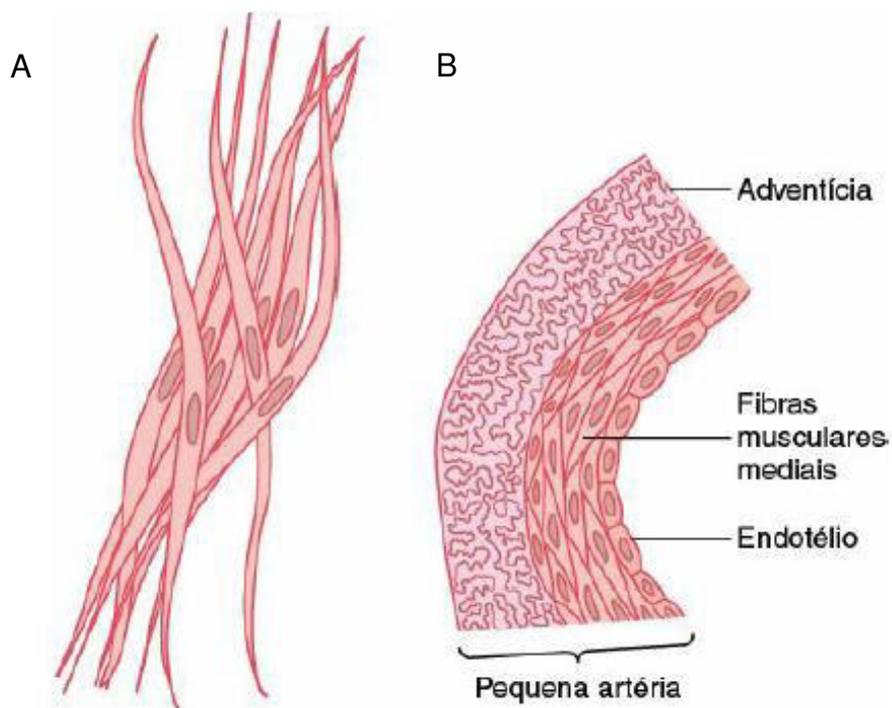
5.6	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO OEAZ NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR Ca^{2+} NA PRESENÇA DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE K^+ APÓS DEPLEÇÃO DO Ca^{2+} INTRACELULAR.....	70
5.7	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO OEAZ NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR FENILEFRINA OU CAFEÍNA NA AUSÊNCIA DE Ca^{2+} EXTRACELULAR.	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
8	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFC).....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Músculo liso vascular

O músculo liso pode ser dividido em dois grandes grupos, o músculo liso multiunitário e o músculo liso unitário (Figura 1), sendo o primeiro composto por fibras musculares separadas e discretas, em que cada fibra opera independente das outras, e o controle é exercido principalmente por sinais nervosos, enquanto o segundo é composto por massas de centenas a milhares de fibras musculares lisas que se contraem ao mesmo tempo, como uma só unidade; além disso, a maior parte do controle do músculo liso unitário é exercida por sinais não nervosos. Alguns exemplos de músculo liso multiunitário são os músculos piloerectores e o músculo da íris do olho, enquanto exemplos de músculo liso unitário são os músculos encontrados no trato gastrointestinal, útero e diversos vasos sanguíneos (HALL, 2017).

Figura 1 – Imagem ilustrativa do músculo liso multiunitário (A) e do músculo liso unitário (B).



Fonte: HALL, 2017

As artérias de resistência são os vasos que mais contribuem para a resistência vascular periférica (RVP), um dos fatores preditores da pressão arterial, juntamente com o débito cardíaco. Assim, a pressão arterial está diretamente ligada ao tônus do músculo liso vascular presente na camada média das artérias, uma vez que a RVP é determinada pelo diâmetro do lúmen das artérias (MULVANY; AALKJAER, 1990).

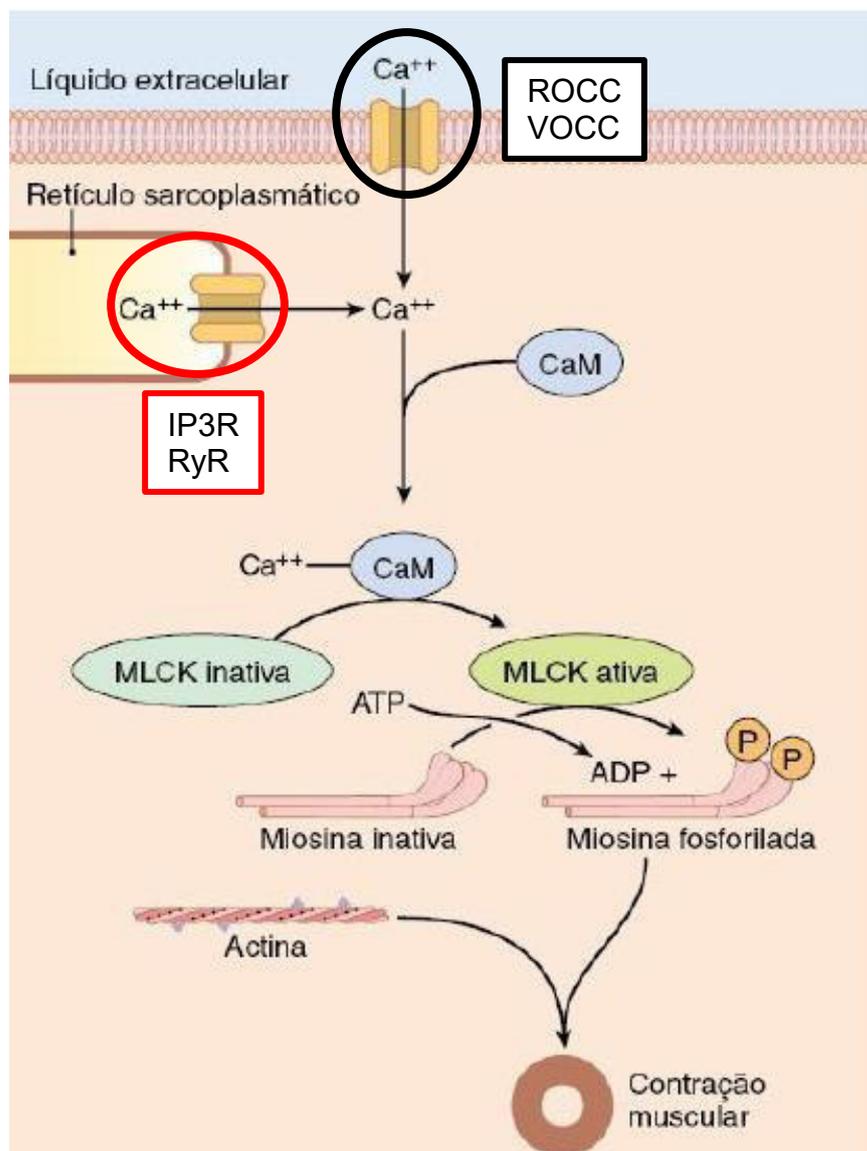
1.1.1 Mecanismo de contração

A fibra muscular lisa, assim como a esquelética, é composta por filamentos de miosina e actina, que são longas moléculas proteicas responsáveis pela contração muscular. A contração muscular lisa se inicia com o aumento intracelular de íons Ca^{2+} , que pode ser causado por estimulação nervosa, hormonal, estiramento da fibra muscular lisa, ou alterações químicas no ambiente da fibra (HALL, 2017).

O aumento de Ca^{2+} na célula muscular lisa pode ocorrer por influxo ou por liberação dos estoques intracelulares. O influxo ocorre por canais iônicos presentes na membrana plasmática, ocorrendo principalmente através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC) do tipo L, com contribuição de outros canais, como os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T e canais de Ca^{2+} dependentes de ligantes (ROCC). O retículo sarcoplasmático é o local onde fica armazenado o Ca^{2+} intracelular, a liberação desses estoques ocorre por meio de dois tipos de canais iônicos, os receptores de Rianodina (RyR) e os receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3R) (AMBERG; NAVEDO, 2013; RAINBOW; MACMILLAN; MCCARRON, 2009).

O Ca^{2+} intracelular resultante do influxo ou da liberação dos estoques intracelulares se liga de forma reversível a uma proteína chamada Calmodulina (CAM), formando um complexo CAM-Cálcio que é responsável pela regulação de diversos processos celulares, entre eles a contração muscular, por meio da ativação da enzima quinase de cadeia leve de miosina, cuja função é fosforilar a cadeia reguladora leve, presente nas cabeças da miosina. A fosforilação da cadeia reguladora inicia as ligações cíclicas da cabeça da miosina com os filamentos de actina, promovendo contração das células musculares lisas (Figura 2) (HALL, 2017; WALSH, 2011).

Figura 2 – Esquema do processo de contração do músculo liso.



Fonte: Adaptado de HALL, 2017

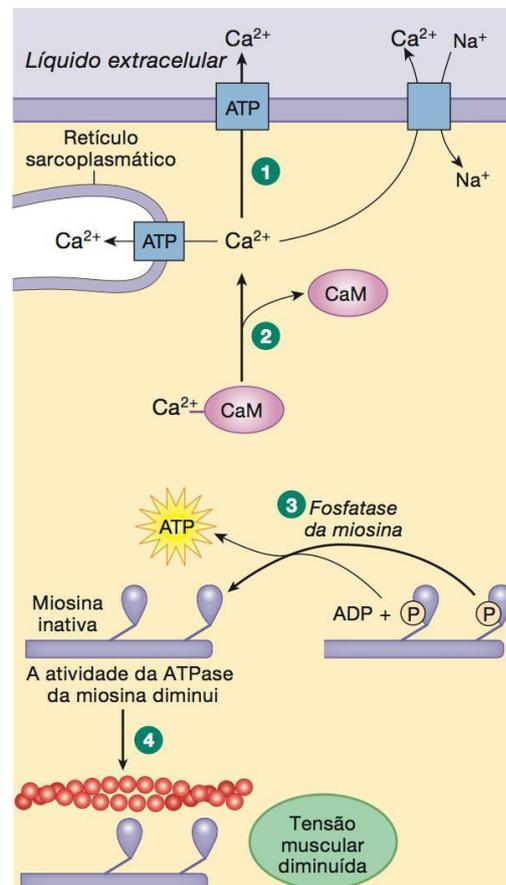
Existem ainda alguns mecanismos de contração muscular independentes de Ca^{2+} . A RhoA é uma enzima cuja forma inativa é ligada ao Difosfato de guanosina (GDP) e a forma ativa é ligada ao Trifosfato de guanosina (GTP). A RhoA-GTP age ativando a enzima Rho quinase, que é responsável por fosforilar a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLC-fosfatase), inativando-a. A MLC-fosfatase é responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina causando uma inativação da mesma, portanto a Rho quinase promove um aumento do estado fosforilado da miosina, promovendo a contração muscular (AMANO *et al.*, 1996; HILGERS; WEBB, 2005).

A proteína quinase C (PKC), também está envolvida no processo de contração independente de Ca^{2+} de alguns agonistas, como o 12,13-dibutirato de forbol. A ativação da PKC causa uma fosforilação direta da cadeia leve de miosina, por meio de uma cascata de eventos que ainda não estão bem estabelecidos, mas a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) parece estar envolvida com essa via de ativação (HARNETT; BIANCANI, 2003; TROCKMORTON; PACKER; BROPHY, 1998).

1.1.2 Mecanismos de relaxamento

O relaxamento da fibra muscular lisa ocorre após múltiplas etapas, que envolvem a diminuição do Ca^{2+} citosólico (1) com, conseqüentemente, um desligamento do complexo CAM-Cálcio (2), a enzima fosfatase de miosina desfosforila a cadeia leve de miosina (3), inibindo as ligações da miosina com a actina, promovendo um relaxamento (4) (Figura 3) (SILVERTHORN, 2010).

Figura 3 – Esquema do processo de relaxamento do músculo liso.



Fonte: Silverthorn, 2010

O endotélio é uma camada de células presente na camada íntima dos vasos e está diretamente ligado ao tônus vascular, liberando diversas substâncias vasodilatadoras, como fator hiperpolarizante derivado do endotélio, óxido nítrico e prostaciclina, bem como substâncias vasoconstritoras, como angiotensina II, endotelina-1 e espécies reativas de oxigênio, além de diversas outras funções, como crescimento e remodelamento vascular, adesão celular, resposta inflamatória e manutenção da fluidez sanguínea (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; XIAO *et al.*, 2014).

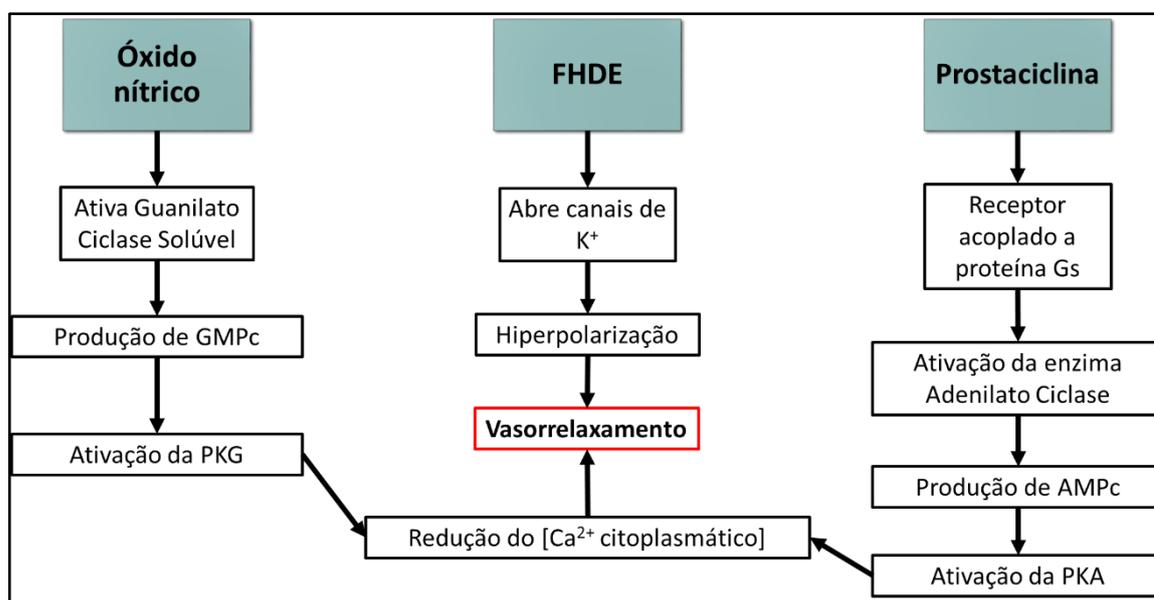
O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso produzido endogenamente através da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*), que utiliza L-arginina como substrato, bem como oxigênio molecular e NADPH como co-substratos. Existem 3 isoformas da NOS, a NOS neuronal (NOS I ou NOS_n) está presente em alguns neurônios do sistema nervoso central e periférico; a NOS induzível (NOS II ou NOS_i) não é expressa normalmente em células, porém tem sua expressão induzida, normalmente em macrófagos, por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas, entre outros, estando, portanto, ligada a resposta imune e inflamação; e a NOS endotelial (NOS III ou NOS_e), que está presente nas células endoteliais e tem diversas funções, dentre elas controle do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, estimulação da angiogênese, entre outras (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

O NO é um potente vasodilatador, que age estimulando a enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) nas células musculares lisas dos vasos, induzindo a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O GMPc ativa a proteinocinase G (PKG), que catalisa a fosforilação de diversas proteínas diminuindo o influxo de cálcio via canais de cálcio operados por voltagem (VOCC), reduzindo a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelos receptores de IP3 (IP3R) e promovendo a reentrada de cálcio no retículo sarcoplasmático através da SERCA (do inglês *sarco/endoplasmic reticulum Calcium ATPase*). A diminuição do cálcio citoplasmático causa uma inativação da Calmodulina, inativando, conseqüentemente, a quinase de cadeia leve de miosina, responsável pela contração do músculo liso, bem como aumenta a atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina, responsável pela desfosforilação das cadeias reguladoras leves da miosina, resultando em vasodilatação (Figura 4) (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

No músculo liso vascular existem 4 tipos principais de canais de K⁺, são eles: (1) Canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺, (2) sensíveis ao ATP, (3) retificadores de influxo e (4) os dependentes de voltagem (STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014). Os canais de potássio são de extrema importância para a manutenção do potencial de membrana, e a abertura de tais canais promove uma saída de K⁺ da célula, provocando uma hiperpolarização da célula muscular lisa, com consequente relaxamento (MILLER, 2000; SOBEY, 2001; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014). O fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) é um fator cuja identidade molecular permanece controversa, tendo autores que sugerem que o FHDE é um grupo de substâncias, incluindo peróxido de hidrogênio, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, entre outras. O FHDE age, principalmente, abrindo canais de K⁺ na célula muscular lisa dos vasos, causando uma hiperpolarização, com consequente vasorrelaxamento (Figura 4) (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010; GILES *et al.*, 2012).

Os prostanóides são produtos da biotransformação do ácido araquidônico pela via da ciclo-oxigenase, eles podem ser as prostaglandinas, o tromboxano (TXA₂) ou a prostaciclina (PGI₂), sendo esse último um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária produzido nas células endoteliais (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A ativação dos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas provoca ativação da enzima adenilato ciclase, levando a um aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc causa uma estimulação da proteinocinase A (PKA), que tem atividade similar a PKG, causando uma saída do cálcio intracelular, inibindo a maquinaria contrátil (Figura 4) (BATLOUNI, 2001; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Figura 4 – Esquema do mecanismo de vasorrelaxamento induzido pelo óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e pela prostaciclina.



Fonte: Elaborada pelo autor

1.2 Doenças Cardiovasculares

Os medicamentos vasodilatadores são utilizados para diversas doenças cardiovasculares. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos, que incluem doença coronariana, doenças cerebrovasculares, doenças arteriais periféricas, doenças no coração devido à febre reumática, doenças cardíacas congênitas, trombose venosa e embolia pulmonar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os 4 principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares são dieta não saudável, caracterizada pela alta ingestão de sal, gorduras e açúcares, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A pressão arterial sistêmica (PAS) é igual o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica, ou seja, a PAS é diretamente proporcional a esses dois fatores (MULVANY, 2012). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, a hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis pressóricos sistólico e/ou diastólico maior ou igual a 140 e 90 mmHg, respectivamente,

e contribui direta ou indiretamente com 50% das mortes por doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

A hipertensão arterial pode ser classificada em hipertensão primária ou hipertensão secundária. A hipertensão primária, ou essencial, é uma hipertensão sem causa definida e corresponde a 90-95% dos casos de hipertensão; enquanto a secundária possui uma causa definida, como estenose da artéria renal, feocromocitoma ou aldosteronismo primário (MULVANY, 2012).

Nos estágios iniciais da hipertensão essencial, a atividade simpática e o débito cardíaco geralmente estão aumentados, porém, nos estágios mais avançados da doença tais parâmetros ficam normais (LUND-JOHANSEN, 1980; MULVANY, 2012), enquanto a resistência vascular periférica fica aumentada devido a alterações funcionais dos vasos, tais como disfunção endotelial e mudanças estruturais (BRANDES, 2014; RIZZONI; AGABITI-ROSEI, 2012).

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortes no mundo. Estima-se que em 2013 houve um total de 54 milhões de mortes no mundo, sendo 17,3 milhões (31,5%) causadas por doenças cardiovasculares. Além do impacto social, as doenças cardiovasculares também têm um impacto econômico muito grande, estima-se que em 2010 o custo mundial causado por tais doenças foi aproximadamente US\$863 bilhões (BENJAMIN *et al.*, 2017). No Brasil, aproximadamente 29,8% dos óbitos foram por doenças cardiovasculares em 2013, sendo a principal causa de morte no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

1.3 Fitoterapia

As plantas são utilizadas para tratar diversas enfermidades desde tempos imemoriáveis, existindo evidências do uso de plantas medicinais que datam de milhares de anos antes de Cristo (DUTRA *et al.*, 2016). Dentre os principais registros, estão os antigos dos sumérios, de cerca de 5000 anos atrás; o livro chinês “*Pen Ts’ao*”, que descreve diversas plantas utilizadas até hoje devido a seus efeitos farmacológicos; e um dos mais importantes registros, o livro “*De Materia Medica*”, escrito pelo “pai da farmacognosia”, o greco-romano Dioscorides, que descreveu mais

de 1000 drogas, sendo aproximadamente dois terços delas de origem vegetal (PETROVSKA, 2012; RAFIEIAN-KOPAEI; SEWELL, 2014).

Diversos fármacos usados atualmente na clínica foram obtidos de plantas, exemplos importantes dessas substâncias são a digoxina, obtida da *Digitalis spp.*, que é usada no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva; quinina e quinidina, obtidas da *Cinchona spp.*, são utilizadas como antimalárico e antiarrítmico, respectivamente; vincristina e vimblastina, extraídas a partir da *Catharanthus roseus*, sendo utilizadas como antineoplásicos; atropina, que é um antimuscarínico e foi isolada a partir da *Atropa belladonna*, dentre diversas outras (DUTRA *et al.*, 2016; RATES, 2001). Além de substâncias isoladas, como as supracitadas, as plantas medicinais também são muito utilizadas em sua totalidade na forma de fitoterápicos, sejam os caseiros, na forma de chás, ou os industrializados, na forma de xaropes e cápsulas, dentre outras formas farmacêuticas.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos fitoterápicos são obtidos com uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade, enquanto os produtos tradicionais fitoterápicos são obtidos com uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia seja baseada em dados publicados na literatura técnico-científica e, tais produtos, devem ser concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico, portanto não podem se referir a doenças ou condições consideradas graves, não podem conter matérias-primas em concentração com risco tóxico e não devem ser administrados por via injetável ou oftálmica (ANVISA, 2015).

O mercado mundial de fitoterápicos vem crescendo bastante. Em 2011 o mercado global de medicamentos atingiu U\$800 bilhões, enquanto o de fitoterápicos atingiu U\$26 bilhões, sendo o maior mercado na Europa (30%), principalmente na Alemanha, seguido da Ásia (29%) e América do Norte (18%), enquanto a América Latina, com diversos países considerados megabiobiodiversos, participaram com apenas 5% do mercado mundial de fitoterápicos (ALVES, 2013). O Brasil contém aproximadamente 20 a 22% da flora existente no planeta, por isso, os pesquisadores e algumas indústrias vêm aumentando o investimento nesse mercado no Brasil, aumentando o número de produtos fitoterápicos, bem como a quantidade de

pesquisas pré-clínicas e clínicas para comprovar as atividades farmacológicas de tais plantas (DUTRA *et al.*, 2016).

A fitoterapia é uma prática muito comum em pacientes com doenças cardiovasculares, como a hipertensão, sendo muitas vezes feita automedicação sem o conhecimento ou orientação de um profissional da área da saúde (MANTOVANI *et al.*, 2017). Isso pode ocorrer pelo fato de muitas pessoas acreditarem que as plantas medicinais não possuem efeitos adversos, porém tais produtos são potencialmente tóxicos, portanto são necessários estudos para compreender todos os efeitos das plantas medicinais, bem como são necessários treinamentos dos profissionais da saúde para que possa haver uma melhor identificação de tais efeitos e uma maior segurança para o paciente (NASRI; SHIRZAD, 2013; NETO *et al.*, 2014).

1.4 *Alpinia zerumbet*

1.4.1 Botânica

A *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Figura 5) é uma planta popularmente conhecida como Colônia e é encontrada na literatura com as sinônimas de *Alpinia speciosa* K. Shum, *Costus zerumbet* Pers., *Languas speciosa* Small e *Zerumbet speciosum* J. C. Wendel (LORENZI; SOUZA 2001). Pertencente da família Zingiberaceae, ordem Zingiberales, é uma planta originária da Ásia Oriental que foi introduzida no Brasil no século XIX, por D. Pedro II, quando o primeiro exemplar foi trazido ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro (MATOS, 2002; CORREA; LIMA; COSTA, 2010).

Figura 5 – Imagem ilustrativa da *Alpinia zerumbet*



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014

É uma planta herbácea, rizomatosa, com 2 a 3 metros de altura, hastes numerosas, recurvadas, folhas coriáceas e espessas (LORENZI; SOUZA, 2001). O caule é aéreo, curto, com folhas lanceoladas em disposição dística, de base aguda e ápice cuspidado. As folhas são curto-pecioladas, com longa bainha aberta e lígule desenvolvida (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004).

1.4.2 Toxicologia

Oliveira (2008) realizou um estudo toxicológico pré-clínico com o extrato aquoso de *Alpinia zerumbet* (EAAz) e com o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz), realizando diversos testes para avaliar citotoxicidade, genotoxicidade e toxicidade aguda. Para se estudar a citotoxicidade foram utilizados os ensaios do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo) em diversas linhagens de

células tumorais, o Alamar *blue* em células mononucleares do sangue periférico de camundongos e o teste de hemólise, realizado em hemácias de camundongos. O EAAz e o OEAz não apresentaram atividade citotóxica ou hemolítica nos testes citados. O estudo de toxicidade aguda foi realizado apenas com o EAAz, em dose oral única de 2000, 2750, 3500, 4250 ou 5000 mg/kg, em camundongos, não sendo verificada nenhuma dose tóxica, com apenas alguns efeitos observados (piloereção, fotofobia e redução da atividade). Realizaram-se os ensaios do cometa e do micronúcleo com o EAAz e OEAz, a fim de verificar o efeito genotóxico, por meio do qual concluíram que o EAAz e o OEAz não foram considerados genotóxicos. Assim, Oliveira (2008) concluiu que o EAAz e o OEAz não são tóxicos nas condições em que o estudo foi realizado.

Foi realizado um estudo toxicológico agudo e crônico mais aprofundado com o OEAz em camundongos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Dados não publicados). Com relação à toxicologia aguda, utilizou-se doses de 30 a 5000 mg/kg, e observou-se que as doses de 30 a 1000 mg/kg não ocasionaram letalidade ou alterações comportamentais, enquanto a dose de 5000 mg/kg ocasionou mortalidade de 60% nos camundongos machos e de 90% nos camundongos fêmeas, além de alterações comportamentais, tais como resposta ao toque, segurar cauda, reflexo corneal, tônus corporal e aumento da frequência cardíaca e respiratória. Nenhuma dose testada causou alterações macroscópicas ou no peso dos órgãos e glândulas (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008).

No estudo de toxicologia crônica, também realizado pela UFSC (Dados não publicados), estimou-se a dose letal em 50 % da amostra (DL₅₀) em 503 mg/kg para camundongos machos e 448 mg/kg para camundongos fêmeas. Além disso, foram observadas diversas alterações morfológicas, como aumento do peso do coração e fígado; histopatológicas, tais como hiperplasia linfonoidal no pulmão e baço, congestão hepática e inflamação crônica nos rins; bioquímicas, por exemplo aumento dos níveis de albumina, creatinina, sódio e potássio. O estudo concluiu que a NOAEL (Dose sem efeitos adversos observáveis, do inglês *no observable adverse effect level*) está entre 100 e 200 mg/kg para camundongos (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2008).

Em um estudo que visou avaliar a segurança do chá de *Alpinia zerumbet* em voluntários saudáveis, os voluntários receberam chá ou placebo, por 4 semanas, e foi

realizada avaliação clínica-laboratorial, bem como teste do cometa nos linfócitos dos voluntários. O estudo concluiu que o chá de *Alpinia zerumbet* é seguro na dose estudada, não sendo observados efeitos clinico-laboratoriais nos voluntários ou no teste do cometa (SANTANA, 2009).

Para se verificar o efeito genotóxico e mutagênico do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz), foram realizados testes alamar *blue*, azul de tripan e cometa em leucócitos humanos além dos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos humanos; em todos os testes não foram encontrados efeitos citotóxicos, genotóxicos ou multagênicos até a concentração de 300 µg/mL, porém tais efeitos foram encontrados na de 500 µg/mL. Além disso, foi estudado o efeito genotóxico e multagênico *in vivo*, através dos testes do cometa e dos micronúcleos, em camundongos após dose oral única de 400 mg/kg do OEAz, não sendo encontrado nenhum efeito genotóxico ou multagênico (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

1.4.3 Propriedades farmacológicas

Na região Nordeste do Brasil, a *Alpinia zerumbet* é amplamente utilizada na medicina popular, na forma de chás e infusões, para o tratamento de ansiedade e, principalmente, hipertensão (MATOS, 2002). As propriedades farmacológicas da *Alpinia zerumbet* vêm sendo largamente estudadas no mundo, principalmente no Brasil e em alguns países da Ásia, e diversas atividades farmacológicas já foram comprovadas.

Um dos primeiros trabalhos publicados com relação ao seu efeito farmacológico verificou o efeito hipotensor, em cães e ratos, do extrato hidroalcoólico da *Alpinia speciosa*, bem como observou um efeito cronotrópico e inotrópico negativo em átrio de rato isolado (MENDONÇA *et al.*, 1991).

Já foram demonstrados na literatura diversos efeitos da *Alpinia zerumbet*, dentre eles, efeito antioxidante (CAVALCANTI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014; CHOMPOO *et al.*, 2012a; DE ARAÚJO *et al.*, 2011; TU; TAWATA, 2015), antiespasmódico (BEZERRA *et al.*, 2000), inibidor do potencial de ação do nervo ciático (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004), antinociceptivo (DE ARAÚJO PINHO *et al.*, 2005), antipsicótico e sedativo (DE ARAÚJO *et al.*, 2011), hipolipidêmico (CHUANG *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2008), antiobesidade (TU; TAWATA, 2014), antiaterogênico

(CHOMPOO *et al.*, 2012b), protetor de células endoteliais (CHEN *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2014), além de diversos efeitos cardiovasculares.

Lahlou *et al.* (2002b) investigaram o efeito da administração intravenosa de OEAz e do seu principal constituinte, o terpinen-4-ol, e foi observado efeito hipotensor independente do sistema nervoso autônomo, sugerindo um efeito vasodilatador direto do OEAz. O 1,8-cineol, também presente no OEAz, foi avaliado quanto aos seus efeitos cardiovasculares, e observou-se que o 1,8-cineol, quando administrado por via intravenosa, causa diminuição da pressão arterial em ratos normotensos anestesiados e conscientes, provavelmente, devido a um efeito vasodilatador ativo (LAHLOU *et al.*, 2002a).

Foram realizados testes para avaliação do efeito anti-hipertensivo do OEAz e terpinen-4-ol em ratos conscientes hipertensos pelo modelo DOCA-Sal, que consiste em realizar uma nefrectomia unilateral nos ratos e, após a recuperação, administrar acetato de desoxicorticosterona por via subcutânea, além de NaCl 1% na água de beber. Observou-se que os dois tratamentos, quando administrados por via intravenosa, causaram uma diminuição da pressão arterial de forma dose-dependente (LAHLOU *et al.*, 2003).

Foi observado, em um estudo que verificou o efeito do extrato hidroalcoólico de *Alpinia zerumbet*, cultivada *in vitro* sob diferentes reguladores de crescimento, no leito mesentérico de ratos wistar, que o extrato tem um efeito vasodilatador, sendo tal efeito otimizado nas culturas em que houve um aumento da concentração de compostos fenólicos (VICTÓRIO *et al.*, 2009).

Pinto *et al.* (2009) verificaram o efeito do OEAz e do 1,8-Cineol em anéis de aorta de rato. Foi observado um efeito vasodilatador do OEAz que não parece ser devido exclusivamente ao seu principal constituinte, o 1,8-cineol, mas tem grande participação dele, além de observarem que tal efeito parece ser totalmente dependente de endotélio.

Lobo Filho (2011) avaliou o efeito cardioprotetor do OEAz em um modelo de infarto induzido por administração de isoproterenol e observou que o pré-tratamento com OEAz apresentou um efeito cardioprotetor, pois atenuou as elevações de TGO, troponina I, bem como reduziu o estresse oxidativo no miocárdio, porém, não exerceu efeito sobre a mortalidade e alterações histopatológicas do ventrículo esquerdo.

Em um estudo que visou estudar o efeito do óleo essencial de *Alpinia speciosa* (OEAs) na contratilidade cardíaca de átrio esquerdo isolado estimulado eletricamente, átrio direito isolado batendo espontaneamente, além de cardiomiócitos isolados de ventrículos, através da técnica de *Whole-cell patch-clamp*, foi observado que o OEAs diminuiu a força de contração, bem como a frequência cardíaca, ou seja tem efeito inotrópico e cronotrópico negativo, respectivamente, de forma reversível e dependente de concentração. Nos experimentos com cardiomiócitos isolados, o OEAs causou uma diminuição significativa das correntes de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, mostrando que esse é o possível mecanismo de ação que explica os efeitos cronotrópico e inotrópico negativo do OEAs (SANTOS *et al.*, 2011).

Cunha *et al.* (2013) investigaram a resposta vasodilatadora *in vitro* em anéis de aorta isolados, bem como o efeito anti-hipertensivo *in vivo* em ratos hipertensos utilizando um modelo de inibição crônica do óxido nítrico, induzida pela administração de N_{ω} -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, da fração metanólica do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (FMOEAz). Observou-se que a FMOEAz (100 mg/kg) tem uma ação anti-hipertensiva quando administrada por gavagem, e observou-se, ainda, que essa fração tem um efeito vasodilatador independente de endotélio, agindo principalmente devido ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} .

Segundo uma pesquisa que visou avaliar o efeito do óleo essencial do fruto de *Alpinia zerumbet* (OEFAz), o mesmo tem uma atividade vasodilatadora dependente de endotélio, em anéis de aorta isolados de rato, em um mecanismo relacionado com a ativação do sistema óxido nítrico sintase/Guanilato Ciclase solúvel (TAO; HU; SHEN, 2013).

Holanda (2015) verificou o efeito do pré-tratamento com OEAz na função cardiovascular e autonômica de ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol e observou que o OEAz não foi capaz de reverter as alterações hemodinâmicas e eletrocardiográficas induzidas pelo infarto, porém, causou uma modulação autonômica reduzindo a atividade simpática sobre o coração, sugerindo um efeito cardioprotetor do OEAz nesse aspecto.

Em um estudo que comparou a atividade anti-hipertensiva e vasodilatadora do OEAz, bem como de suas frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz), em ratos com hipertensão induzida por L-NAME e em anéis

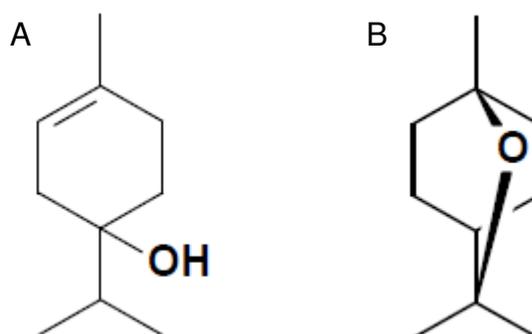
de aorta isolados de ratos, respectivamente, foi observado que a FMOEAz possui uma potência maior que o OEAz e outras frações em seu efeito vasodilatador, porém, o efeito anti-hipertensivo foi similar em todas as frações (CUNHA *et al.*, 2016).

1.4.4 Óleo essencial de *Alpinia zerumbet*

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são misturas complexas de substâncias lipofílicas e voláteis compostas, em sua maioria, por hidrocarbonetos e compostos oxigenados derivados desses hidrocarbonetos (EVANS, 1996; VITTI; BRITO, 2003). Os óleos essenciais, geralmente, têm sabor ácido, são incolores ou levemente amarelados e são instáveis, principalmente na presença de luz, calor, ar, umidade e metais (VITTI; BRITO, 2003).

As folhas de *Alpinia zerumbet* contém óleo essencial rico em mono e sequiterpenos, com maior concentração de cineol e terpineol (Figura 6). Os componentes mais importantes do óleo essencial são alguns flavonoides com ação anti-hipertensiva e kavapironas com ação ansiolítica (MATOS, 2002).

Figura 6 – Estruturas químicas do terpinen-4-ol (A) e do 1,8-cineol (B).



Fonte: Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica (LFPC)

A maioria dos estudos que realizam algum método para quantificação dos constituintes do OEAz afirmam que as substâncias presentes em maior quantidade são terpinen-4-ol e 1,8-cineol. Deve-se ressaltar, no entanto, que a composição química de óleos essenciais pode variar de acordo com a época da coleta da planta, região de cultivo, e até mesmo com o período do dia em que é realizada a colheita, dentre outros fatores (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são um dos grandes problemas de saúde pública do mundo, tanto do ponto de vista social, quanto do ponto de vista econômico, e os maus hábitos alimentares, bem como o envelhecimento da população, vêm agravando essa situação. Os vasodilatadores são uma classe de medicamentos usados pra diversas patologias cardiovasculares, incluindo a hipertensão, que é um fator preditivo para diversas complicações cardiovasculares, como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. A *Alpinia zerumbet* já foi estudada com relação a diversos efeitos farmacológicos, principalmente com relação aos seus efeitos cardiovasculares, tendo sido demonstrada propriedades anti-hipertensiva, vasodilatadora, cronotrópica e inotrópica negativa, dentre outras. A atividade vasodilatadora de diversos extratos da *Alpinia zerumbet* já foram estudadas em aorta, que é uma artéria de condutância de grande calibre, de rato, porém, é sabido que o controle da resistência vascular periférica, que é um dos fatores que influenciam a pressão arterial, juntamente com o débito cardíaco, se dá principalmente em artérias de resistência, local cuja atividade vasodilatadora da *Alpinia zerumbet* ainda não foi testada. Além disso, as artérias de resistência têm uma composição histológica diferente das artérias de condutância, portanto, o efeito vasodilatador de uma determinada substância pode diferir dependendo do tipo de artéria. Assim, é de fundamental importância conhecermos a atividade vasodilatadora da *Alpinia zerumbet*, bem como seu mecanismo de ação, em artérias de resistência, para que possamos entender melhor o seu efeito anti-hipertensivo e, posteriormente, sejam realizados estudos clínicos acerca dessa planta com mais segurança.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) na reatividade vascular de artérias de resistência isoladas de ratos, bem como caracterizar seu mecanismo de ação.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do OEAz em preparações de artérias isoladas pré-contraídas com KCl ou U-46619, determinando a concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (CE₅₀) e o efeito máximo (E_{max});
- Observar a influência do endotélio no efeito vasodilatador do OEAz, através da retirada física do endotélio, bem como bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina;
- Avaliar a influência dos canais de potássio, mediante bloqueio com Tetraetilamonio, 4-Aminopiridina e Glibenclamida, no efeito do OEAz;
- Verificar a influência da via do óxido nítrico/Guanilato ciclase solúvel, por meio do bloqueio com L-NAME e ODQ;
- Observar a participação dos prostanóides produzidos na via das ciclooxigenases, mediante bloqueio da ciclooxigenase com indometacina;
- Verificar o efeito do OEAz na entrada de Ca²⁺ nas células musculares, bem como na sua liberação intracelular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, Rodentia, Mammalia) da linhagem Wistar, machos, com idade variando entre 14 e 16 semanas, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN-UFC). Durante todo o período do estudo os ratos ficaram alojados no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (gaiolas convencionais de polipropileno com uma tampa de metal que contém divisórias para ração e água – 4 ratos por gaiola) com ração e água fornecidas *ad libitum*.

4.2 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LFPC) integrante do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza - Ceará, o qual possui infraestrutura necessária para realização dos experimentos.

4.3 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa intitulado “**Efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em artérias de resistência isoladas de ratos**” foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) e aprovado sob protocolo nº 103/2017 (ANEXO A). Neste estudo, foram seguidas as normas de boas práticas indicadas para a realização de pesquisas que envolvem o uso de animais experimentais de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4 Fármacos e reagentes

4.4.1 Solução de Krebs-Henseleit

A solução de Krebs-Henseleit foi utilizada para manter o tecido viável durante todo o experimento. Foram utilizadas duas soluções diferentes, a solução de Krebs-

Henseleit modificada (Tabela 1) e a solução de Krebs-Henseleit sem cálcio (Tabela 2), sendo a última utilizada nos protocolos envolvendo o estudo dos canais de cálcio. Todos os reagentes utilizados no estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs-Henseleit modificada.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	113
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
Glicose	11

Fonte: Brito (2015)

Tabela 2 – Composição da solução de Krebs-Henseleit sem cálcio.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	122
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
Glicose	11

Fonte: Brito (2015)

4.4.2 Fármacos

Todos os fármacos utilizados no estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) (Tabela 3).

Tabela 3 – Fármacos utilizados no estudo, juntamente com sua concentração e descrição.

Fármaco	Concentração	Descrição
Cloreto de potássio (KCl)	80 mM	Na concentração utilizada causa uma vasoconstrição por despolarização de membrana
Fenilefrina (PHE)	10 μ M	Agonista dos receptores α
Acetilcolina (ACh)	5 μ M	Agonista dos receptores muscarínicos
9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F2 α (U-46619)	3 μ M	Agonista do receptor de tromboxano
Tetraetilamônio (TEA)	5 mM	Bloqueador não seletivo dos canais de K ⁺
4-aminopiridina (4-AP)	200 μ M	Bloqueador dos canais de K ⁺ dependentes de voltagem
Glibenclamida (GLIB)	1 μ M	Bloqueador dos canais de K ⁺ dependentes de ATP
Atropina	1 μ M	Antagonista dos receptores muscarínicos
N ω -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)	100 μ M	Inibidor da enzima Óxido Nítrico Sintase
1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	10 μ M	Inibidor da enzima Guanilato Ciclase-solúvel
Indometacina (INDO)	10 μ M	Inibidor da enzima ciclooxygenase
<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> (EGTA)	1 mM	Quelante de íons Ca ²⁺
Cafeína	30 mM	Agonista dos receptores de rianodina

4.4 Óleo essencial de *Alpinia zerumbet*

O OEAz foi produzido a partir de folhas de *Alpinia zerumbet*. As folhas foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no município de Maranguape, Ceará. A localização exata é 3°59'26,49" de latitude sul e 38°42'59,10" de longitude oeste. A identificação botânica foi realizada no Herbário Prisco Bezerra, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal do Ceará, estando depositada sob exsicata de número 50312 (Figura 7).

Figura 7: Foto ilustrativa da exsicata da *Alpinia zerumbet*.



Fonte: LFPC

O OEAz foi obtido por técnica de destilação por arraste de vapor d'água, que é um método utilizado para isolar substâncias que se decompõem em uma temperatura próxima ao seu ponto de ebulição e imiscíveis com água. O método consiste em fazer uma destilação das folhas imersas em água, para que o óleo essencial evapore em uma temperatura menor que a temperatura em que os componentes se decomponham, pois, de acordo com lei de Dalton, num sistema contendo vapores

imiscíveis, cada componente exerce a sua própria pressão de vapor, independente dos outros componentes presentes, portanto, a pressão de vapor total sobre a mistura é igual à soma de vapores de cada componente, desta maneira, a temperatura de destilação por arraste de vapor d'água ocorre, geralmente, entre 80 e 100°C. (CUNHA, 2012; SIMÕES; SPITZER, 1999).

O OEAz foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, para determinação da composição química, na Central Analítica do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC-UFC), coordenado pelo prof. Afrânio Craveiro.

4.5 Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados com Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e, posteriormente, sacrificados por exsanguinação mediante incisão dos vasos cervicais. Após eutanaziados, os animais foram colocados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão abdominal para então retirar cuidadosamente todo o intestino delgado, juntamente com os vasos mesentéricos, que eram dispostos em forma de arco em uma placa de petri com solução de Krebs-Henseleit modificada oxigenada (Composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, glicose 5,5), onde o segundo ramo da artéria mesentérica era dissecado, com auxílio de um microscópio cirúrgico (modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo) e montado horizontalmente, em forma de anel, em um miógrafo de fio com 4 câmaras (modelo 620M, DMT, Aarhus, Dinamarca) (Figura 8), ligado a um sistema de aquisição PowerLab (AdInstruments, Austrália), que processou o sinal da tensão isométrica para o software LabChart v8.0.8 (AdInstruments, Austrália), onde foi realizado o registro temporal da tensão, bem como análise dos dados obtidos.

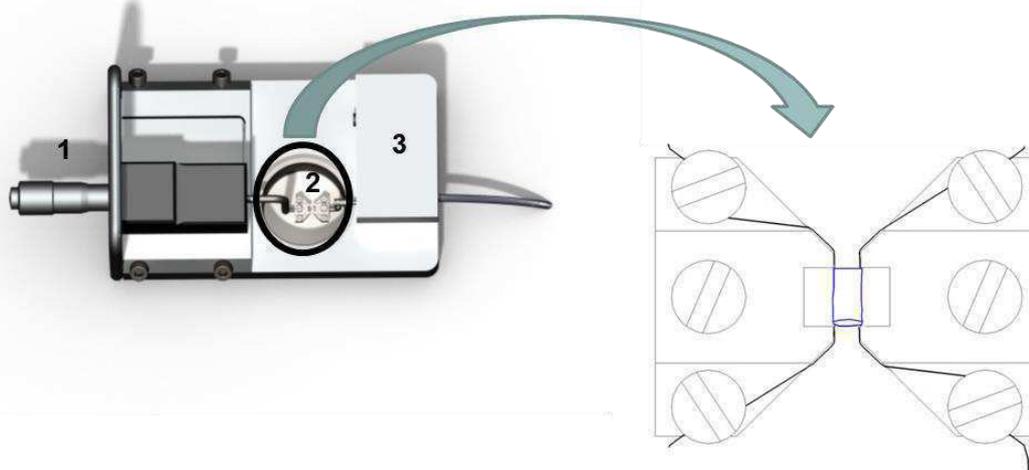
Figura 8 – Imagem do miógrafo de fio (modelo 620M, DMT, Aarhus, Dinamarca) utilizado para experimentos de contratilidade em microvasos. Pode-se observar o painel *touch-screen* na parte frontal, que contém as informações do experimento, e é utilizado para calibração, configuração, além de outras funcionalidades. Na parte superior observam-se as 4 cubas, cada uma contendo um transdutor de força, um micrômetro, um sistema de aeração e um de sucção do líquido.



Fonte: Danish Myo Technology, 2013

Para montagem, foram inseridos dois fios de tungstênio de 40 μm na luz dos segmentos, de modo que um fio foi fixado ao transdutor de força, que realizou a mensuração isométrica da força em mN, e o outro conectado ao micrômetro para que fosse feito o procedimento de normalização e ajuste da tensão sobre o vaso (Figura 9). Eram retirados 4 segmentos de segundo ramo da artéria mesentérica de 1,5 a 2,0 mm de comprimento de cada animal, e cada segmento era montado em cubas individuais contendo 6 mL de solução de Krebs-Henseleit modificada, pH 7,4, mantidas a 37° C e aerada com carbogênio (uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂).

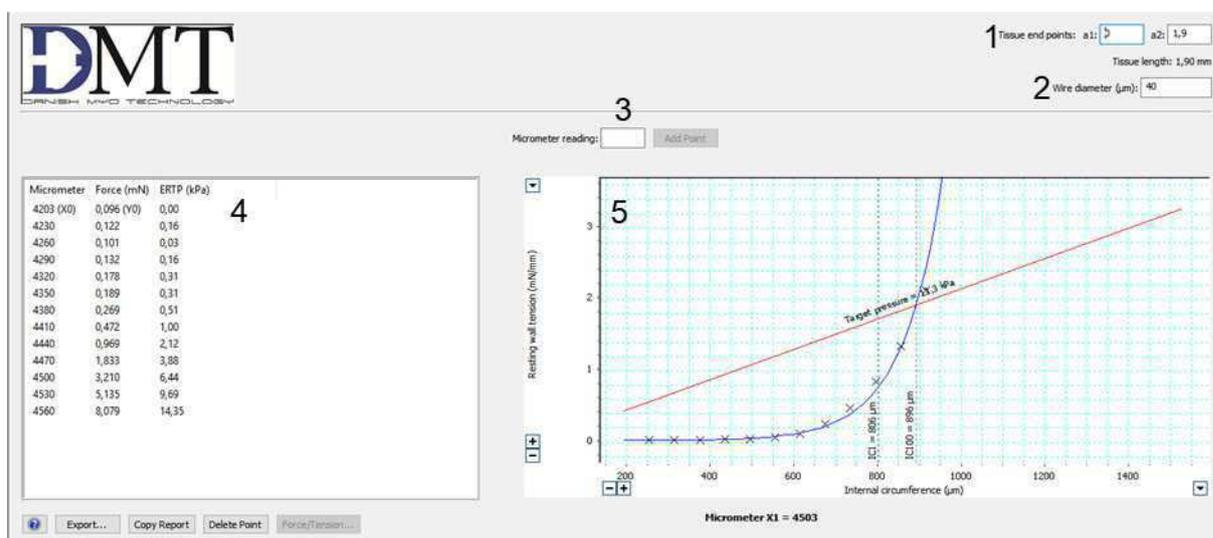
Figura 9 – Vista superior de uma das cubas do miógrafo, onde pode-se observar o micrômetro (1), os dois ganchos para fixação dos fios e da artéria (2) e o transdutor de força (3).



Fonte: Adaptado de Danish Myo Technology, 2013

Após a montagem, os segmentos de artéria mesentérica passaram por um período de 30 minutos de estabilização para posterior realização da normalização, que tem como objetivo encontrar a tensão ideal a ser aplicada sobre cada segmento de artéria mesentérica para que haja uma máxima atividade contrátil. A normalização foi realizada através de um módulo específico do LabChart (*DMT Normalization Module*, AdInstruments, Austrália) (Figura 10) e consiste em distender o segmento, aos poucos, registrando a leitura do micrômetro no software, até se obter uma pressão transmural de 100 mmHg, ou 13,3 kPa, tal pressão é calculada pelo software, a partir da tensão isométrica, mensurada pelo transdutor de força, e do comprimento do segmento de artéria mesentérica, e resulta em uma circunferência interna chamada IC100. No momento em que a IC100 é atingida, o software calcula a IC1 através da fórmula $IC1 = 0,9 \times IC100$, sendo IC1 a circunferência interna na qual é aplicada uma tensão ideal para que ocorra uma resposta contrátil máxima do tecido, e fornece o ponto de leitura do micrômetro equivalente à IC1 para aquele segmento de artéria. A partir da IC1 calculou-se o diâmetro interno normalizado, através da divisão de IC1 pelo valor de π (3,14) (MULVANY; HALPERN, 1977; MULVANY, 1988).

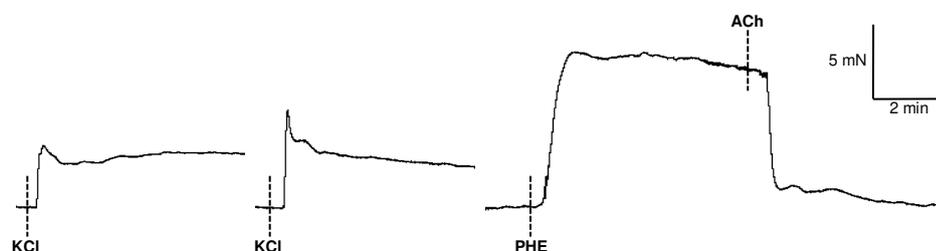
Figura 10 – Imagem do módulo *DMT normalization*, utilizado para fazer a normalização. Pode-se observar os espaços para colocarmos o comprimento do tecido (1), o diâmetro do fio utilizado (2) e a leitura do micrômetro (3). Após colocar a leitura do micrômetro, o *software* registra a força e calcula a pressão transmural (4) e coloca cada ponto lido no gráfico ao lado (5).



Fonte: LFPC

Os segmentos passaram por mais um período de 30 minutos de estabilização após a normalização, para então serem realizados os testes de viabilidade muscular e endotelial. Os testes de viabilidade consistiram em 3 passos, (1) inicialmente era realizada uma contração com KCl (80 mM), porém em alguns casos era observada uma contração submáxima, portanto os segmentos eram lavados com solução de Krebs e (2) era realizada uma segunda contração com KCl (80 mM). Uma vez verificada a viabilidade muscular com o KCl, os segmentos eram lavados novamente com solução de Krebs, (3) e então era feita, com objetivo de verificar a viabilidade endotelial, uma contração com fenilefrina (10 μM) com posterior relaxamento com acetilcolina (5 μM). Foi considerado um segmento com endotélio íntegro quando a acetilcolina causava um relaxamento maior que 70% da contração induzida pela fenilefrina (Figura 11). Após os testes de viabilidade tecidual, os segmentos eram lavados novamente e então era iniciado um dos protocolos experimentais descritos a seguir. Cada segmento de artéria mesentérica passou por apenas um protocolo. A figura 12 mostra todos os passos, de forma sequencial, do procedimento experimental.

Figura 11 – Traçado típico do teste de viabilidade, com duas contrações com KCl (80 mM), seguido de contração com fenilefrina (PHE) (10 μ M) e relaxamento com acetilcolina (ACh) (5 μ M).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 12 – Figura esquemática com os passos do procedimento experimental.



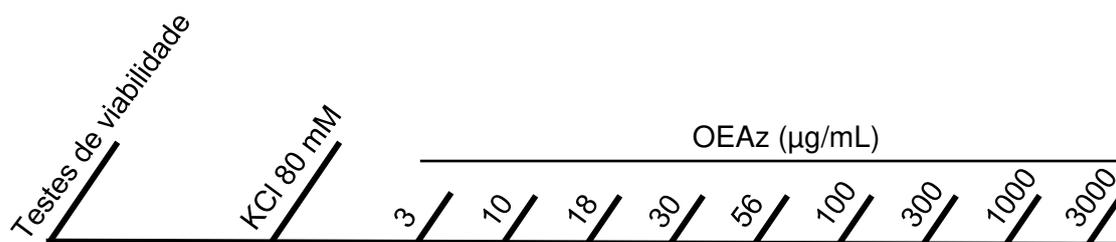
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.1 Efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl.

Com o objetivo de se verificar o efeito vasodilatador do OEAz, os segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica (SSRAM) com endotélio íntegro (n=6) foram pré-contraídos, após os testes de viabilidade tecidual, com KCl (80 mM), para então ser realizada uma curva concentração-resposta do OEAz (3 - 3000 μ g/mL). Para tanto, o OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contração, em concentrações

acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 13).

Figura 13 – Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl (80 mM).

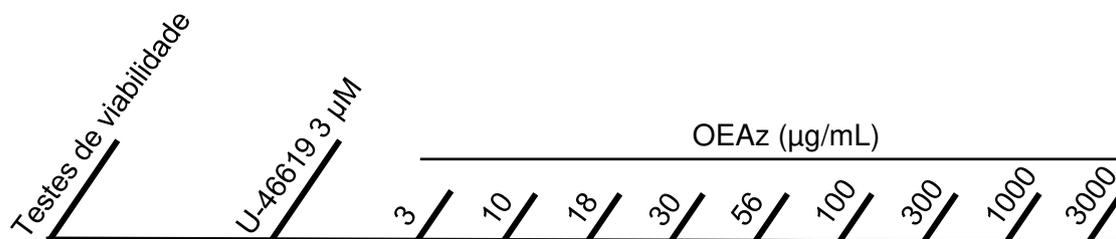


Fonte: LFPC

4.5.2 Efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619.

Nesse protocolo utilizou-se um análogo de tromboxano, o 9,11-diedoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F_{2 α} (U-46619) (3 μ M), para realização da pré-contração dos SSRAM com endotélio íntegro (n=6), para posterior realização da curva concentração-resposta do OEAz (3 – 3000 μ g/mL). O U-46619 causa uma vasoconstrição sustentada a partir da ativação dos receptores de tromboxano, que são receptores 7 transmembrana que agem via ativação da enzima Fosfolipase C, aumentando o trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contração, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 14).

Figura 14 – Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).

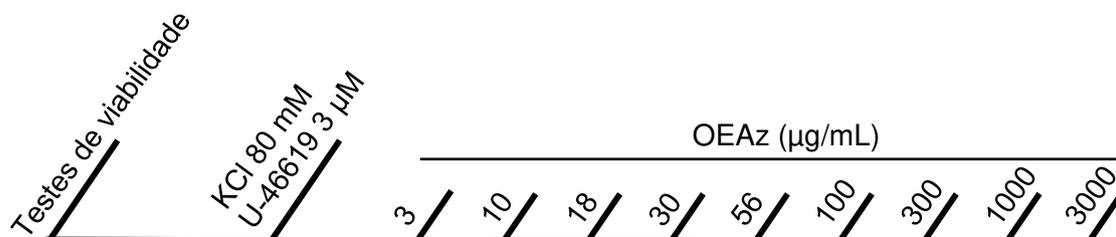


Fonte: LFPC

4.5.3 Avaliação da influência do endotélio vascular no efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com KCl ou U-46619.

Esse protocolo teve como objetivo verificar se a remoção do endotélio influencia no efeito vasodilatador do OEAz. Para isso, antes da montagem no miógrafo, o endotélio dos SSRAM foi removido com auxílio do próprio fio de tungstênio, através da rolagem dos anéis de artéria mesentérica na placa de Petri, e a remoção do endotélio foi confirmada nos testes de viabilidade tecidual, cujo relaxamento induzido pela acetilcolina foi menor que 10% da contração induzida pela fenilefrina. Assim, os SSRAM com endotélio desnudo (n=6) foram pré-contraídos com KCl (80 mM) ou com U-46619 (3 μ M), e foi realizada uma curva concentração-resposta com o OEAz (3 – 3000 μ g/mL). O OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contração, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 15).

Figura 15 – Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica com endotélio desnudo pré-contraídos com U-46619 (3 μ M) ou KCl (80 mM).



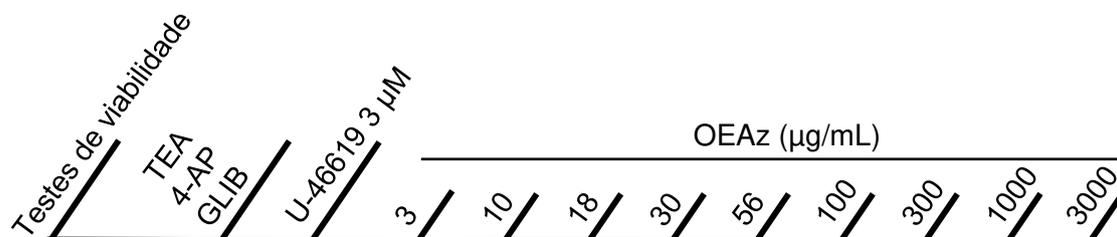
Fonte: LFPC

4.5.4 Avaliação da influência dos canais de potássio no efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*.

Para verificar a influência dos canais de potássio no efeito do OEAz, foram utilizados o Tetraetilamônio (TEA) (5 mM), um bloqueador não seletivo dos canais de potássio, a 4-aminopiridina (4-AP) (200 μ M), um bloqueador seletivo de canais de potássio dependente de voltagem, e a glibenclamida (GLIB) (1 μ M), um bloqueador seletivo de canais de potássio dependente de ATP.

Nesse protocolo foram utilizados SSRAM com endotélio íntegro (n=6), cada bloqueador foi testado separadamente, incubado por 20 minutos, para posterior pré-contracção com U-46619 (3 μ M) e realização da curva concentração-resposta com o OEAz (3 - 3000 μ g/mL). O OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contracção, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 16).

Figura 16 – Representação esquemática do protocolo para verificar a influência dos canais de potássio no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M).



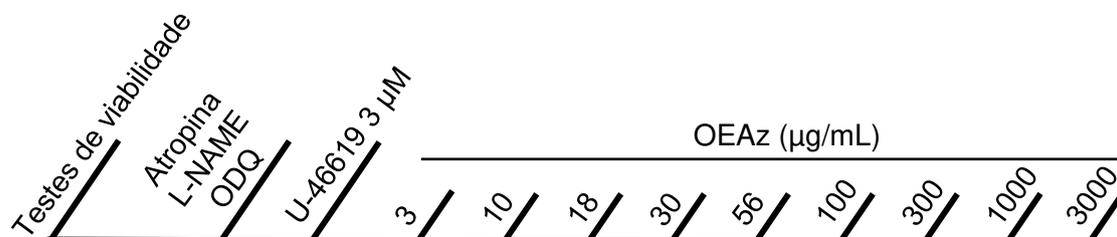
Fonte: LFPC

4.5.5 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos, Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Guanilato Ciclase solúvel (GCs) no efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*.

Utilizou-se a atropina (1 μ M), um antagonista dos receptores muscarínicos, o N ω -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (100 μ M), um inibidor da NOS, e o 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (10 μ), um inibidor da GCs, para avaliar a participação desses receptores no efeito vasodilatador do OEAz.

Para tanto, foram utilizados SSRAM com endotélio íntegro (n=6), cada antagonista foi testado separadamente, incubado por 20 minutos, para posterior pré-contracção com U-46619 (3 μ M) e realização da curva concentração-resposta com o OEAz (3 - 3000 μ g/mL). O OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contracção, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 17).

Figura 17 – Representação esquemática do protocolo para verificar a influência dos receptores muscarínicos, da NOS e da GCs no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contráídos com U-46619 (3 μ M).

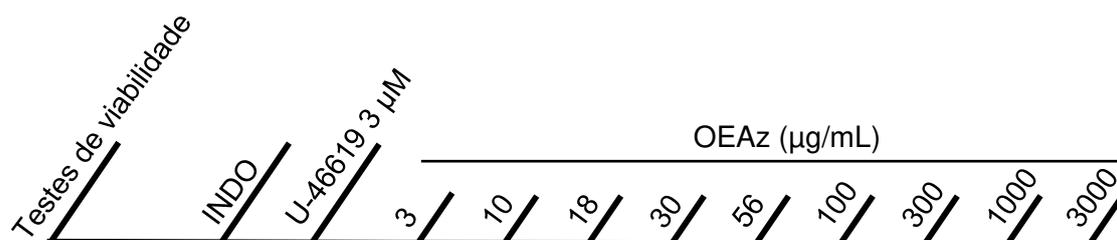


Fonte: LFPC

4.5.6 Avaliação da participação de prostanóides no efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*.

Nesse protocolo, os SSRAM com endotélio íntegro (n=6) foram incubados por 20 minutos com Indometacina (INDO) (10 μ M), um bloqueador não seletivo da Ciclooxigenase (COX), com o objetivo de verificar se o OEAz atua por meio de substâncias provenientes da bioconversão do ácido araquidônico pela COX. Após a incubação, os SSRAM foram pré-contráídos com U-46619 (3 μ M) e foi realizada a curva concentração-resposta com o OEAz (3 - 3000 μ g/mL). O OEAz foi adicionado às cubas, após o platô de contração, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 10 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 18).

Figura 18 – Representação esquemática do protocolo para verificar a participação dos prostanóides no efeito vasodilatador do OEAz em segmentos de artéria mesentérica pré-contráídos com U-46619 (3 μ M).



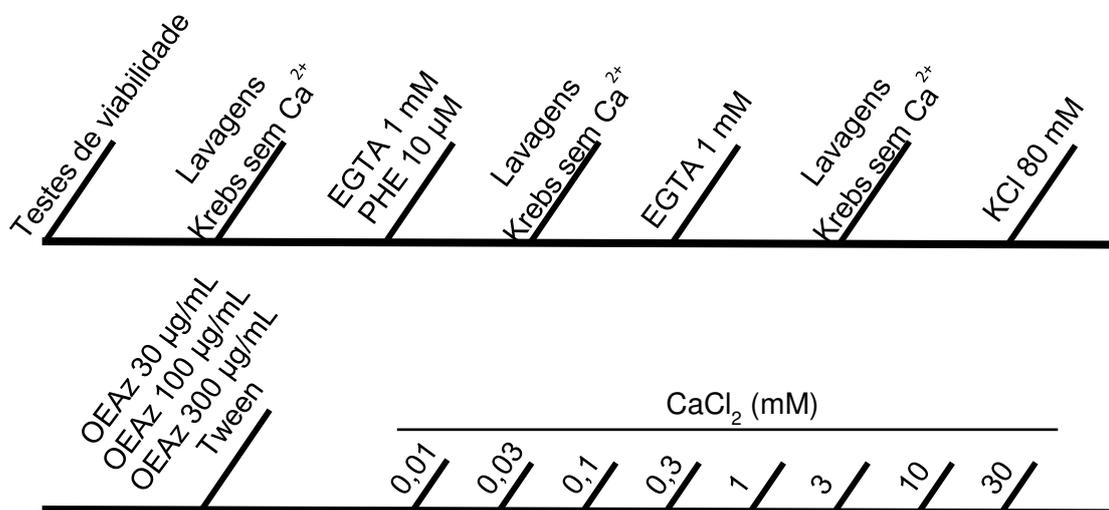
Fonte: LFPC

4.5.7 Avaliação da influência do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na contração induzida por Ca^{2+} na presença de alta concentração de K^+ após depleção do Ca^{2+} intracelular.

Esse protocolo teve como objetivo verificar se o OEAz bloqueia a entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas através dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCC, do inglês *voltage operated calcium channel*), em SSRAM na presença de alta concentração de K^+ .

As células musculares lisas têm estoques intracelulares de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, para que não ocorra interferência desses íons provenientes dos estoques intracelulares, inicialmente foi feito um procedimento para depleção do Ca^{2+} intracelular. Para isso, os SSRAM com endotélio íntegro (n=6) passaram por 6 lavagens consecutivas com solução de Krebs sem Ca^{2+} , foram incubados com *Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) (1 mM,) um quelante de íons Ca^{2+} , por 15 minutos, e então foi adicionado fenilefrina (10 μM) por mais 30 minutos, para que os estoques intracelulares de Ca^{2+} sejam liberados, para então serem realizadas mais 6 lavagens consecutivas com solução de Krebs sem Ca^{2+} , e em seguida foi adicionado novamente EGTA (1 mM) por 15 minutos, e foram realizadas mais 3 lavagens com solução de Krebs sem Ca^{2+} . Após o procedimento para depleção do Ca^{2+} , os SSRAM foram incubados, ainda em meio sem Ca^{2+} , com KCl 80 mM, para ativação dos VOCC, por 3 minutos, em seguida foi adicionado o OEAz nas concentrações 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou Tween, em concentração equivalente a maior dose de OEAz, por 10 minutos, e em seguida foi feita uma curva de concentração-resposta com CaCl_2 (0,01 – 30 mM) (Figura 19).

Figura 19 – Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito do OEAz no influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.



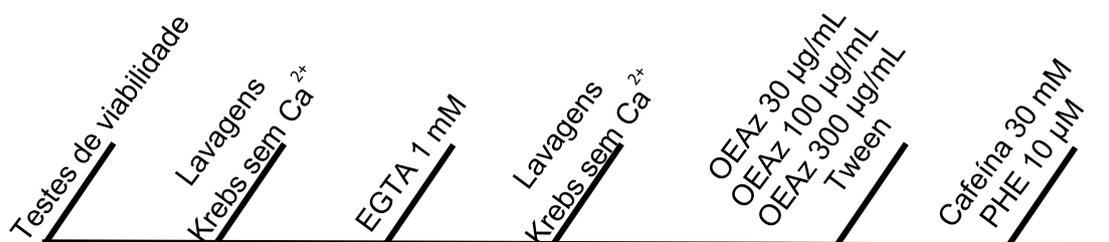
Fonte: LFPC

4.5.8 Avaliação da influência do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na contração induzida por fenilefrina ou cafeína na ausência de Ca^{2+} extracelular.

Esse protocolo teve como objetivo verificar a influência do OEAz na liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} por meio dos receptores de IP3 ou dos receptores de rianodina, através da contração com fenilefrina ou cafeína, respectivamente.

Para tanto, os SSRAM com endotélio íntegro ($n=6$), após os testes de viabilidade, foram lavados 6 vezes com solução de Krebs sem Ca^{2+} , em seguida foi incubado EGTA 1 mM por 15 minutos, foram realizadas mais 3 lavagens com solução de Krebs sem Ca^{2+} , para então ser adicionado o OEAz nas doses 30 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, ou 300 $\mu\text{g/mL}$, ou Tween, em concentração equivalente a maior dose de OEAz, após incubação por 30 minutos foi adicionada fenilefrina (10 μM) ou cafeína 30 mM (Figura 20).

Figura 20 – Representação esquemática do protocolo para verificar o efeito do OEAZ na liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} através de receptores de IP3 e de rianodina.



Fonte: LFPC

4.6 Análise estatística

Nos ensaios de relaxamento da musculatura lisa vascular, o efeito relaxante (R) das substâncias foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pelo agonista, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme a seguinte expressão:

$$R = \frac{T_A - T_S}{T_A} \times 100,$$

onde T_A e T_S são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação do agonista e de uma dada substância.

Nos ensaios de contração, por sua vez, a resposta contrátil ao agonista foi expressa em percentual, relativo à média das contrações induzidas por potássio nos testes iniciais de viabilidade tecidual.

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

$$y = a + \frac{b - a}{1 + 10^{(\log \text{CE}_{50} - x) * s}}$$

onde y corresponde à medida da resposta (efeito relaxante), x ao logaritmo decimal da concentração, a à resposta mínima e b à resposta máxima. A constante s é

denominada fator de angulação (*slope fator*) e determina a angulação da curva. A CE_{50} é definida como a concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou a resposta semimáxima, ou seja, é o valor da concentração que corresponde ao ponto médio entre a resposta mínima e a máxima. O E_{max} pode ser definido como a máxima resposta proporcionada por uma determinada substância.

Para se demonstrar a dose-dependência de uma curva dose-resposta, utilizou-se análise de variância (*one way ANOVA*) para medidas repetidas nos diversos tempos de uma mesma curva.

A maioria dos resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) com a representação do número de observações experimentais (n). A CE_{50} foi expressa como média e o intervalo de confiança de 95% (IC95%). Comparações entre dois grupos foram realizadas através do teste t de para dados não emparelhados, enquanto para comparações entre três grupos ou mais utilizou-se a análise de variância (ANOVA) associada ao pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), ou seja, consideraram-se estatisticamente significantes valores de P menores que 0,05.

O software GraphPad Prism® versão 7.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2016) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos e elaboração dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química do OEAz

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) e foram observadas 19 substâncias na sua composição, sendo as 3 principais o p-cimeno (15,74%), o terpinen-4-ol (20,41%) e o 1,8-cineol (24,27%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização química do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM)

Pico#	Tempo de retenção	Nome	Área %
1	11,968	Tujeno	3,15
2	12,379	Pineno	1,68
3	14,555	Sabineno	8,40
4	14,787	β -pineno	3,15
5	15,401	β -myrceno	0,76
6	17,007	α -terpineno	2,31
7	17,516	p-cimeno	15,74
8	17,758	L-Limoneno	2,49
9	17,973	1,8-Cineol	24,27
10	19,547	γ -terpineno	10,56
11	20,035	Cis-hidrato de sabineno	0,44
12	21,330	Terpinoleno	1,14
13	21,884	Linalol	1,27
14	23,344	τ -sabineno	0,57
15	24,437	p-ment-2-en-1-ol	0,37
16	26,880	Terpinen-4-ol	20,41
17	27,562	α -terpineol	1,01
18	40,911	β -cariofileno	1,23
19	47,918	Óxido de cariofileno	1,05

Fonte: PADETEC-UFC

5.2 Diâmetro interno normalizado

A tabela 5 mostra os dados do diâmetro interno normalizado dos segmentos de artéria mesentérica. Foi utilizado um total de 144 segmentos de artéria mesentérica, cuja média do diâmetro interno normalizado foi 285,7 μ m, sendo o menor diâmetro

utilizado foi 179,3 μm , enquanto o maior foi 369,7 μm . Dos 144 segmentos, 63,89% tinham menos de 300 μm , enquanto 36,11% tinham mais de 300 μm de diâmetro interno normalizado.

Tabela 5 - Dados do diâmetro interno normalizado dos segmentos de artéria mesentérica.

Diâmetro interno normalizado	
Média \pm EPM ^a (μm)	285,7 \pm 3,42
Mínimo (μm)	179,3
Máximo (μm)	369,7
DIN<300 ^b (%)	63,89 %
DIN>300 ^c (%)	36,11 %

Fonte: Dados da pesquisa

^a Erro padrão da média;

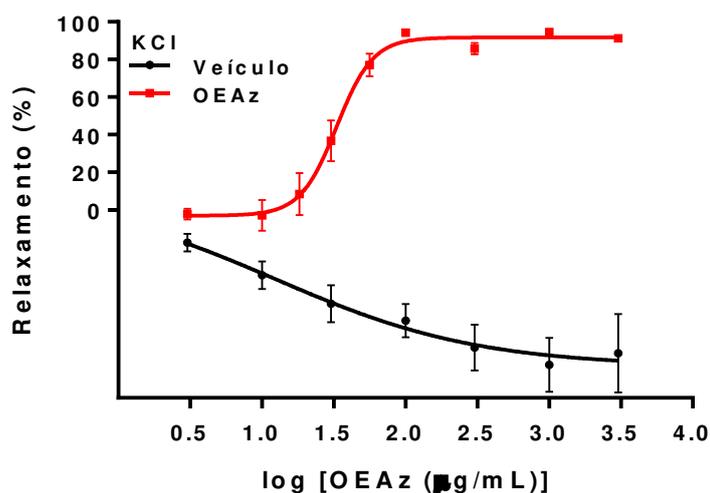
^b Percentual de segmentos de artéria mesentérica com o diâmetro interno normalizado menor que 300 μm ;

^c Percentual de segmentos de artéria mesentérica com o diâmetro interno normalizado maior que 300 μm .

5.3 Efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica (SSRAM) pré-contraídas com KCl ou U-46619.

O OEAz (3 – 3000 $\mu\text{g/mL}$) causou uma vasodilatação em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com KCl (80 mM) (n=6) de maneira dose-dependente ($P < 0,001$, *one way*-ANOVA). Foi realizada regressão não-linear para determinar os valores de CE₅₀ (Concentração do OEAz capaz de produzir 50% do efeito), o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e o efeito máximo (E_{max}). A CE₅₀ do OEAz em SSRAM pré-contraídas com potássio foi 33,17 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 28,11 – 39,38), enquanto o E_{max} foi 91,72% \pm 3,282. Também foi realizada uma curva concentração-resposta com o Tween, que consiste no veículo do OEAz, em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl (80mM) (n=6) e não foi observado efeito vasodilatador do mesmo (Gráfico 1).

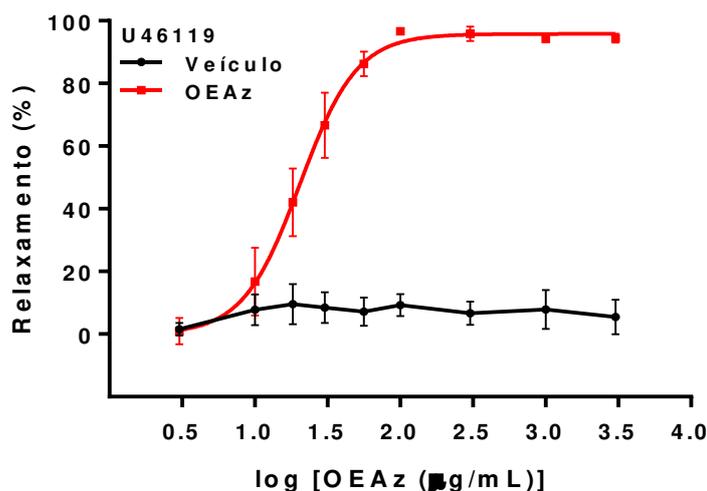
Gráfico 1 – Efeito do OEAz (n=6) e do veículo (Tween) (n=6) em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com KCl (80 mM). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE_{50} : OEAz: $-1,521 \pm 0,0355$.



Fonte: Dados da pesquisa

O OEAz (3 – 3000 µg/mL) também foi capaz de causar uma vasodilatação em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com U-46619 (3 µM) (n=6) de maneira dose dependente ($P < 0,001$, *one way*-ANOVA). A regressão não-linear mostrou uma CE_{50} de 21,52 (IC95%: 17,68 – 25,95) e um E_{max} de $96,34 \pm 2,839$. Foi realizada uma curva concentração-resposta com o Tween, que consiste no veículo do OEAz, em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com U-46619 (3 µM) (n=6) e não foi observado efeito vasodilatador do mesmo (Gráfico 2).

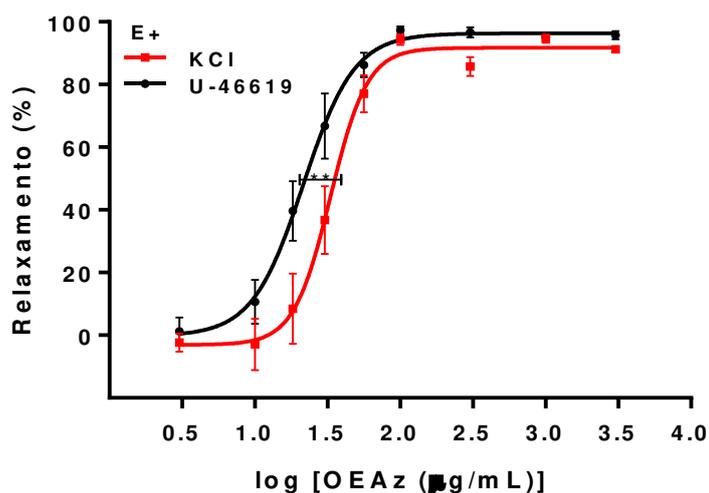
Gráfico 2 - Efeito do OEAz (n=6) e do veículo (Tween) (n=6) em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (n=6) pré-contraídas com U-46619 (3 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE_{50} : OEAz: $-1,333 \pm 0,0408$.



Fonte: Dados da pesquisa

O gráfico 3 mostra as curvas dose-resposta do OEAz em SSRAM com endotélio intacto pré-contraídos com KCl e com o U-46619. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as CE_{50} ($P < 0,01$), quando comparadas pelo teste t de Student, porém não foi observada diferença entre os E_{max} dos dois grupos, portanto, o OEAz (3 – 3000 μ g/mL) teve um efeito vasodilatador significativamente mais potente em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 (3 μ M), quando comparado com a potência do OEAz em SSRAM pré-contraídos com KCl (80 mM).

Gráfico 3 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) pré-contraídas com KCl (80 mM) (n=6) e U-46619 (3 μ M) (n=6). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: KCl: -1,521 \pm 0,0355; U46619: -1,333 \pm 0,0408.

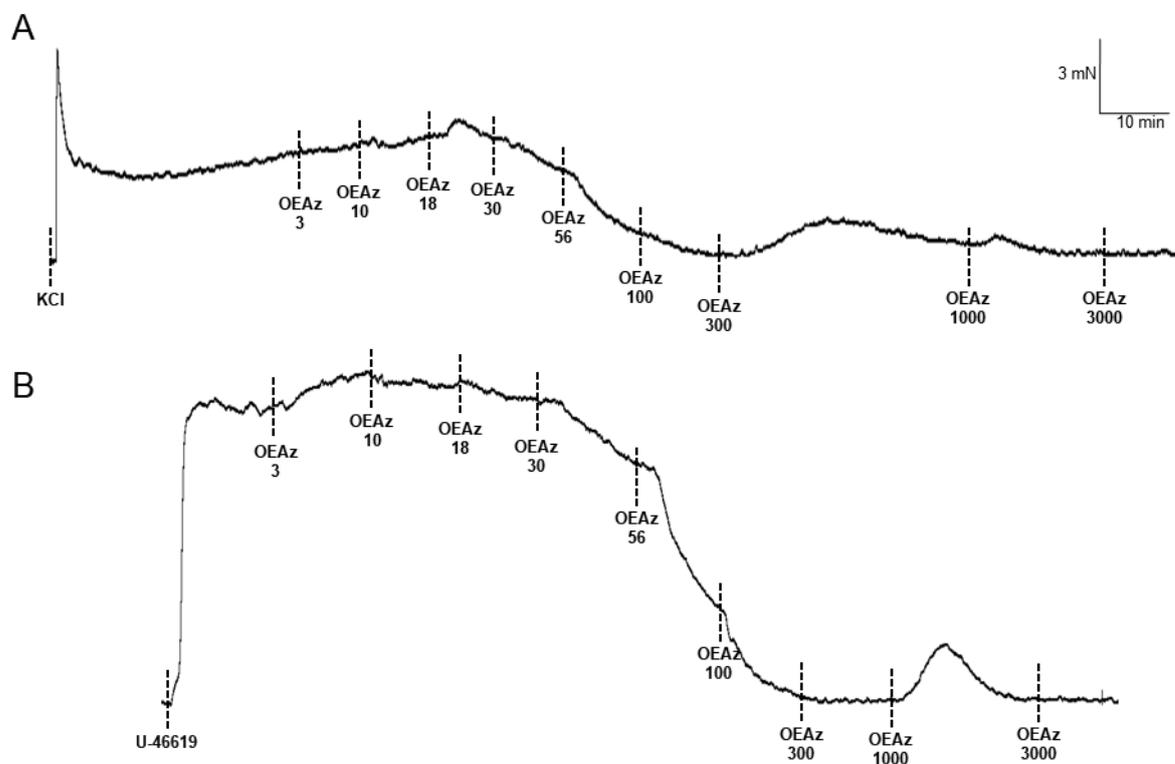


Fonte: Dados da pesquisa

**denota diferença estatisticamente significativa entre CE₅₀ dos dois grupos (P<0,01).

A figura 21 mostra o traçado típico do efeito relaxante induzido pelo OEAz (3 – 3000 μ g/mL) em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl (80 mM) (Figura 21-A) e U-46619 (3 μ M) (Figura 21-B).

Figura 21 – Traçado típico do efeito vasodilatador do OEAz em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl (80 mM) (A) e com U-46619 (3 μ M) (B).

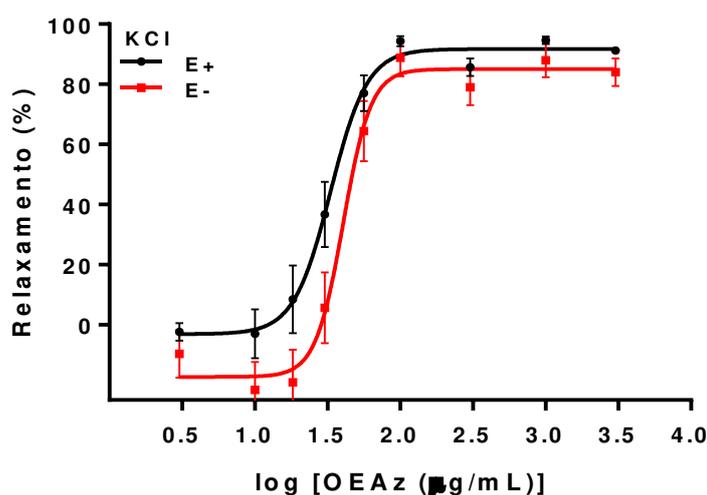


Fonte: Dados da pesquisa

5.2 Avaliação da influência do endotélio vascular no efeito vasodilatador do OEAz em SSRAM pré-contraídos com KCl ou U-46619.

O OEAz (3 – 3000 μ g/mL) causou um vasorrelaxamento em SSRAM com endotélio desnudo pré-contraídos com KCl (n=6). Após a regressão não-linear, obteve-se uma CE_{50} de 40,57 μ g/mL (IC95%: 33,79 – 49,03) e um E_{max} de $85,05 \pm 4,29$ no grupo sem endotélio. Apesar de podermos observar que a CE_{50} aumentou um pouco, enquanto o E_{max} esteve um pouco reduzido no grupo com endotélio desnudo em comparação com o grupo com endotélio íntegro, tais diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparados pelo teste *t* de Student ($P > 0,05$) (Gráfico 4).

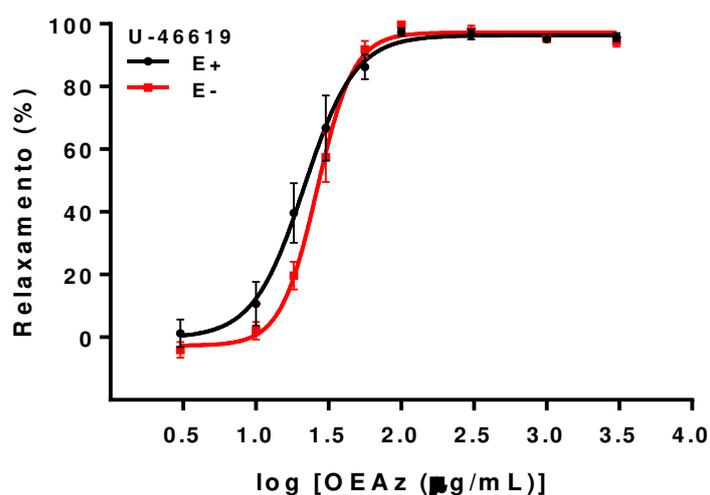
Gráfico 4 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) (n=6) e desnudo (E-) (n=6) pré-contraídas com KCl (80 mM). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE_{50} : E+: $-1,521 \pm 0,0355$; E-: $-1,608 \pm 0,0404$.



Fonte: Dados da pesquisa

O OEAz (3 – 3000 µg/mL) também foi capaz de causar vasorrelaxamento em SSRAM com endotélio desnudo pré-contraídos com U-46619 (n=6). Após a regressão não-linear, obteve-se uma CE_{50} de 26,39 µg/mL (IC95%: 24,17 – 28,73) e um E_{max} de $97,22 \pm 1,713$ no grupo sem endotélio. Não houve alteração da CE_{50} e E_{max} no grupo com endotélio desnudo em comparação com o grupo com endotélio íntegro, quando comparados pelo teste *t* de Student ($P > 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio íntegro (E+) (n=6) e desnudo (E-) (n=6) pré-contraídas com U-46619 (3 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: E+: -1,333 \pm 0,0408; E-: -1,421 \pm 0,0,182.

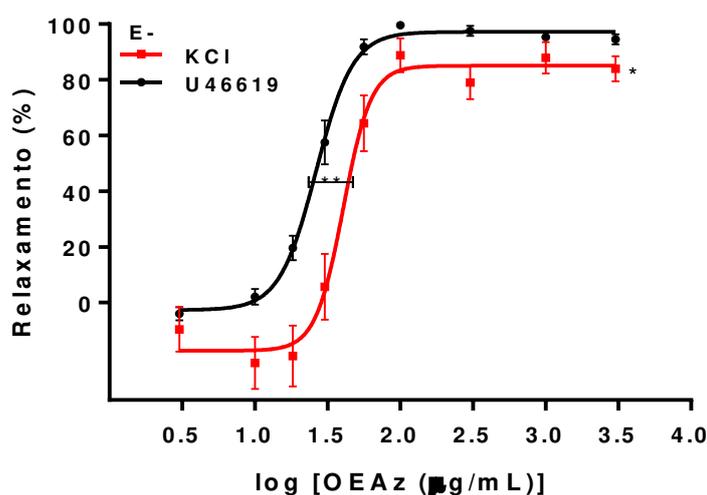


Fonte: Dados da pesquisa

Ao se comparar a resposta do OEAz em SSRAM com endotélio desnudo pré-contraídos com U46619 (n=6) e com KCl (n=6), observou-se um aumento da CE₅₀ (P<0,01) e uma redução do E_{max} (P<0,05) no grupo pré-contraído com KCl (Gráfico 6).

A tabela 6 resume todos os dados do efeito do OEAz em SSRAM com endotélio íntegro e desnudo pré-contraídos com U46619 e KCl.

Gráfico 6 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo da artéria mesentérica com endotélio desnudo (E-) pré-contraídas com KCl (80 mM) (n=6) e U46619 (3 μ M) (n=6). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: KCl: -1,608 \pm 0,0404; U46619: -1,421 \pm 0,0,182.



Fonte: Dados da pesquisa

* denota diferença estatisticamente significante entre o E_{max} dos grupos (P<0,05);

**denota diferença estatisticamente significante entre CE₅₀ dos dois grupos (P<0,01).

Tabela 6 - Efeito vasodilatador do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) (n=6) ou KCl (80 mM) (n=6) com (E+) (n=6) ou sem (E-) (n=6) endotélio íntegro. Dados de pCE₅₀ e E_{max} expressos como média \pm erro padrão da média.

Grupo	E+		E-	
	pCE ₅₀ ^c	E _{max} (%)	pCE ₅₀ ^c	E _{max} (%)
U46619	-1,333 \pm 0,0408	96,34 \pm 2,839	-1,421 \pm 0,0182	97,22 \pm 1,713
KCl	-1,521 \pm 0,0355 ^a	91,72 \pm 3,282	-1,608 \pm 0,0404 ^b	85,05 \pm 4,289

Fonte: Dados da pesquisa

^a e ^b denotam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo U46619 E+ e ao grupo U46619 E-, respectivamente (P<0,01).

^cpCE₅₀ = -logCE₅₀

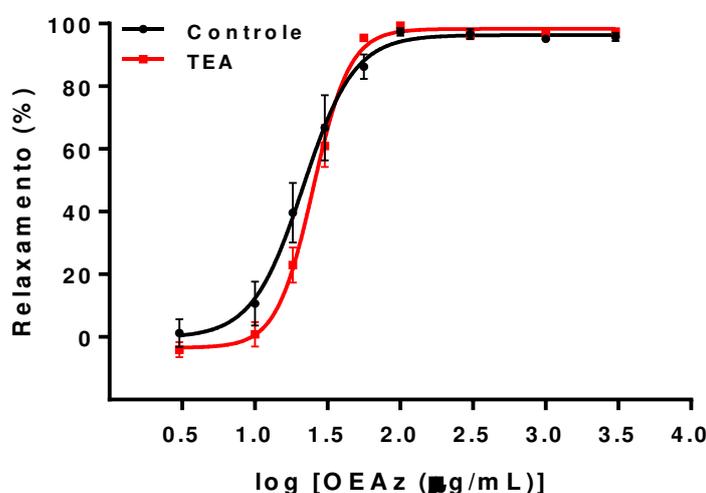
5.3 Avaliação do efeito dos canais de potássio no efeito vasodilatador do OEAz.

O OEAz (3 – 3000 μ g/mL) teve um efeito vasodilatador em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos com U-46619 na presença de Tetraetilamônio (TEA)

(n=6), Glibenclamida (n=6), e 4-aminopiridina (4-AP) (n=6) de forma dose-dependente.

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida nos SSRAM na presença de TEA por regressão não linear, foi observada uma CE_{50} de 25,17 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 23,19 – 27,26) e um E_{max} de $98,31 \pm 1,60$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) ao se comparar CE_{50} e E_{max} do grupo TEA com o grupo Controle (SSRAM pré-contraídos com U-46619 na ausência de inibidores), quando comparados pelo teste *t* de Student (Gráfico 7).

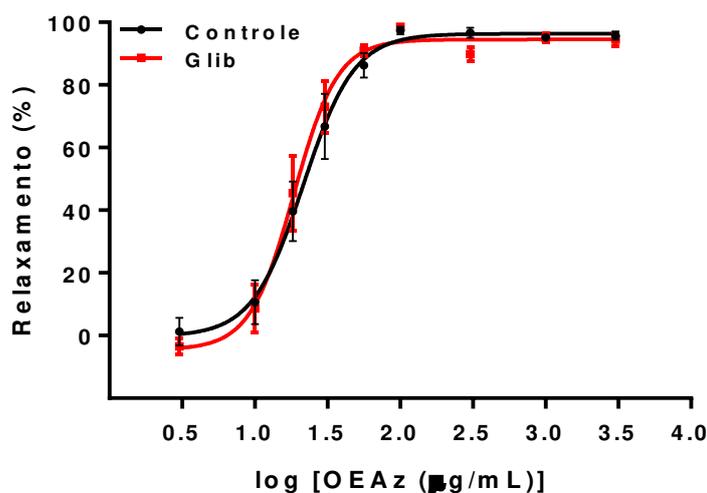
Gráfico 7 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μM) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Tetraetilamônio (TEA, 10 μM). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE_{50} : Controle: $-1,333 \pm 0,0408$; TEA: $-1,401 \pm 0,017$.



Fonte: Dados da pesquisa

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida nos SSRAM na presença de Glibenclamida por regressão não linear, foi observada uma CE_{50} de 18,51 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 15,55 – 21,84) e um E_{max} de $94,5 \pm 2,7$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) ao se comparar CE_{50} e E_{max} do grupo Glibenclamida com o grupo Controle (SSRAM pré-contraídos com U-46619 na ausência de inibidores), quando comparados pelo teste *t* de Student (Gráfico 8).

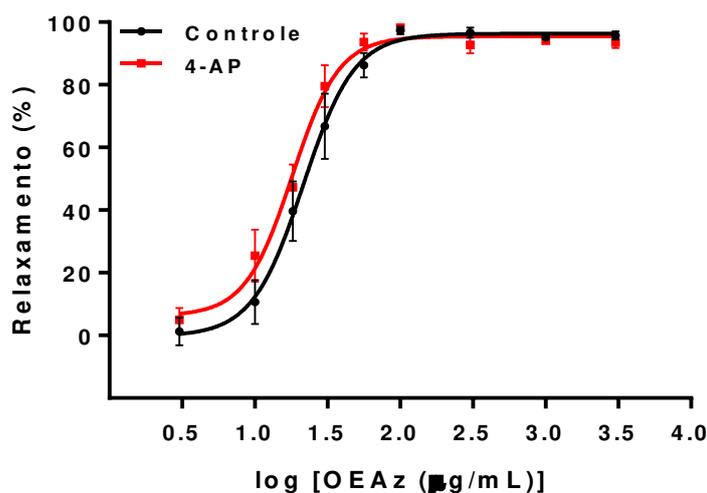
Gráfico 8 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Glibenclamida (Glib, 10 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE_{50} : Controle: $-1,333 \pm 0,0408$; Glib: $-1,267 \pm 0,0363$.



Fonte: Dados da pesquisa

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida nos SSRAM na presença de 4-AP por regressão não linear, foi observada uma CE_{50} de 18,05 μ g/mL (IC95%: 14,85 – 21,41) e um E_{max} de $95,44 \pm 2,297$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) ao se comparar CE_{50} e E_{max} do grupo 4-AP com o grupo Controle (SSRAM pré-contraídos com U-46619 na ausência de inibidores), quando comparados pelo teste t de student (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de 4-Aminopiridina (4-AP, 10 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: Controle: -1,333 \pm 0,0408; 4-AP: -1,256 \pm 0,0361.



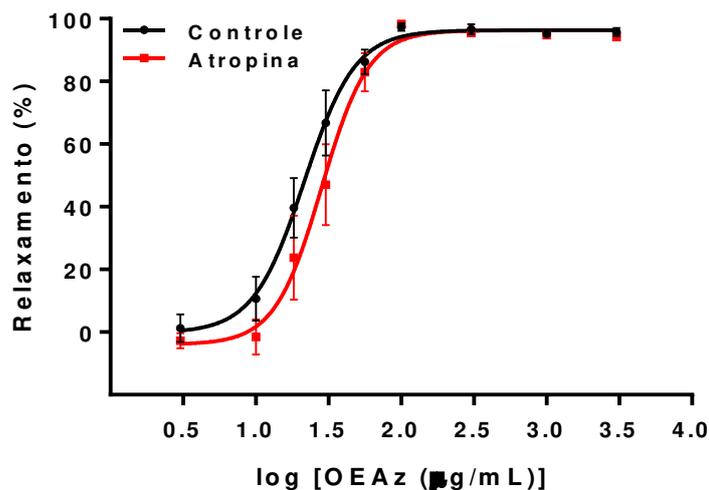
Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos, da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) no efeito vasodilatador do OEAz.

Foi observado que o OEAz (3 – 3000 μ g/mL) apresentou um efeito vasodilatador em SSRAM com endotélio íntegro pré-contraídos por U-46619 na presença de Atropina (n=6), N ω -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (n=6) e 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (n=6).

Ao se realizar a regressão não-linear, observou-se, no grupo Atropina, uma CE₅₀ de 28,36 μ g/mL (IC95%: 22,93 – 34,85) e um E_{max} de 98,28 \pm 1,092. Não foi observada diferença estatisticamente significativa (P>0,05) entre a CE₅₀ e E_{max} entre os grupos Atropina e Controle, quando comparados por teste *t* de student (Gráfico 10).

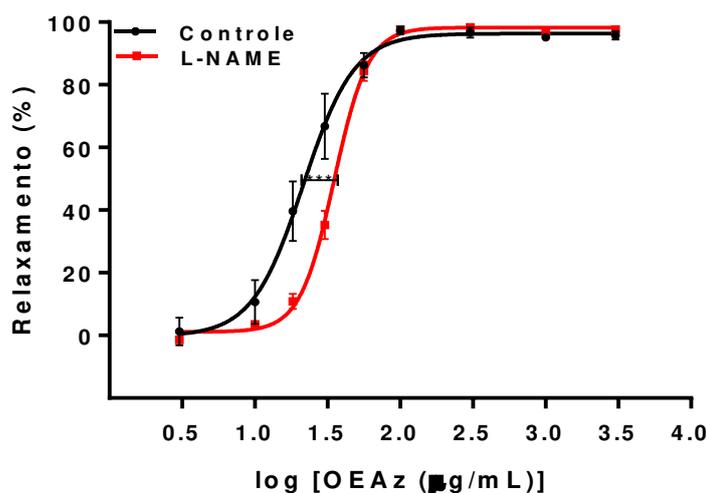
Gráfico 10 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Atropina (1 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: Controle: -1,333 \pm 0,0408; Atropina: -1,453 \pm 0,0434



Fonte: Dados da pesquisa

Ao se realizar a regressão não-linear, observou-se, no grupo L-NAME, uma CE₅₀ de 35,15 μ g/mL (IC95%: 33,41 – 37,03) e um E_{max} de 96,31 \pm 3,58. A CE₅₀ do grupo L-NAME foi significativamente maior que o grupo Controle (P<0,001) quando comparados pelo teste *t* de Student, entretanto, com relação ao E_{max}, não foi observada diferença estatisticamente significativa (P>0,05) (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U-46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de L-NAME (100 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: Controle: -1,333 \pm 0,0408; L-NAME: -1,546 \pm 0,0112.

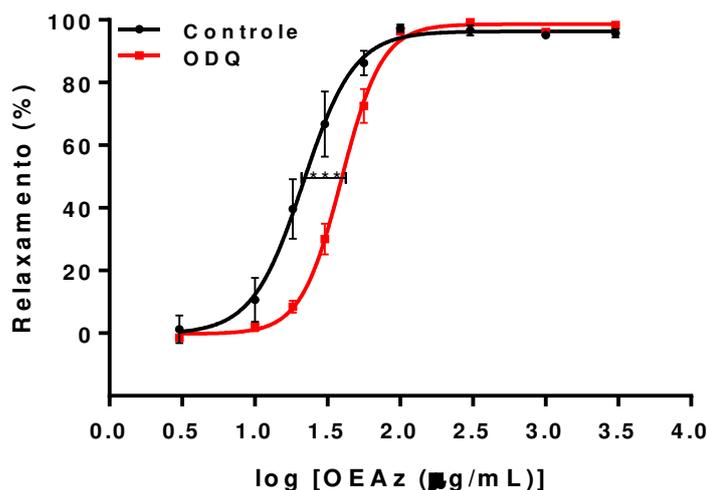


Fonte: Dados da pesquisa

***denota diferença estatisticamente significativa entre CE₅₀ dos dois grupos (P<0,001).

Ao se realizar a regressão não-linear, observou-se, no grupo ODQ, uma CE₅₀ de 39,47 μ g/mL (IC95%: 36,7 – 42,44) e um E_{max} de 98,64 \pm 1,416. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa ao se comparar a CE₅₀ do grupo ODQ com o grupo Controle (P<0,001) (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de ODQ (10 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: Controle: -1,333 \pm 0,0408; ODQ: -1,596 \pm 0,0156.



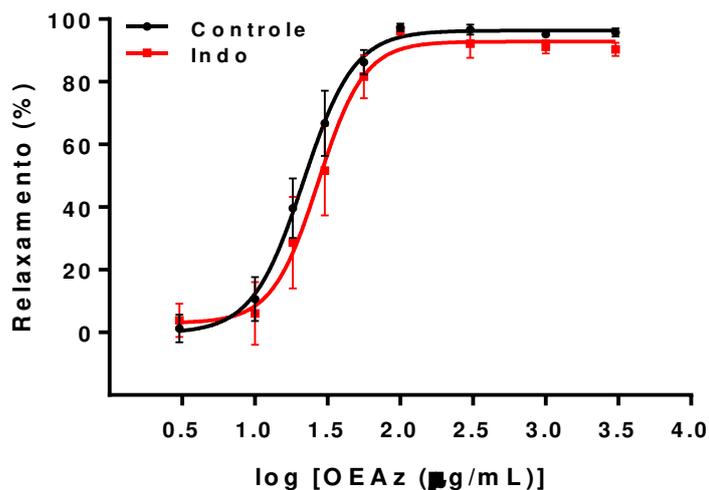
Fonte: Dados da pesquisa

***denota diferença estatisticamente significativa entre CE₅₀ dos dois grupos (P<0,001).

5.5 Avaliação da participação dos prostanóides no efeito vasodilatador do OEAz.

O OEAz foi capaz de causar uma vasodilatação em SSRAM com endotélio íntegro na presença de indometacina (n=6). A regressão não linear resultou em uma CE₅₀ de 27,24 μ g/mL (IC95%: 20,42 – 35,88) e um E_{max} de 92,83 \pm 4,257. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados com a CE₅₀ e E_{max} do grupo Controle (P>0,05) pelo teste *t* de student (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Efeito do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro pré-contraídas com U46619 (3 μ M) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Indometacina (Indo, 10 μ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM). pCE₅₀: Controle: -1,333 \pm 0,0408; Indo: -1,435 \pm 0,0576.



Fonte: Dados da pesquisa

A tabela 7 resume os dados de pCE₅₀ (-logCE₅₀) e E_{max} com erro padrão da média (EPM) obtidos nas regressões não lineares dos grupos pré-contraídos com U-46619 (Controle, E- e todos os inibidores).

Tabela 7 – Efeito vasodilatador do OEAz em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídas com U-46619 com endotélio desnudo (E-), ou íntegro na presença de L-NAME, ODQ, Atropina, Indometacina, Tetraetilamônio, Glibenclamida, ou 4-aminopiridina (n=6).

Grupo	pCE ₅₀		E _{max} (%)	
	Média	EPM ^b	Média	EPM ^b
Controle ^a	-1,333	0,04083	96,34	2,839
E-	-1,421	0,01825	97,22	1,713
L-NAME	-1,546 ^{***}	0,01116	98,28	1,092
ODQ	-1,596 ^{***}	0,01557	98,64	1,416
Atropina	-1,453	0,04341	96,34	3,581
Indometacina	-1,435	0,0576	92,83	4,257
Tetraetilamônio	-1,401	0,01704	98,31	1,603
Glibenclamida	-1,267	0,03633	94,5	2,7
4-aminopiridina	-1,256	0,03613	95,44	2,297

Fonte: Dados da pesquisa

*** denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (P<0,001).

^a Controle corresponde ao efeito do OEAz em preparações com endotélio intacto na ausência de inibidores.

^b EPM: Erro padrão da média

5.6 Avaliação da influência do OEAz na contração induzida por Ca²⁺ na presença de alta concentração de K⁺ após depleção do Ca²⁺ intracelular.

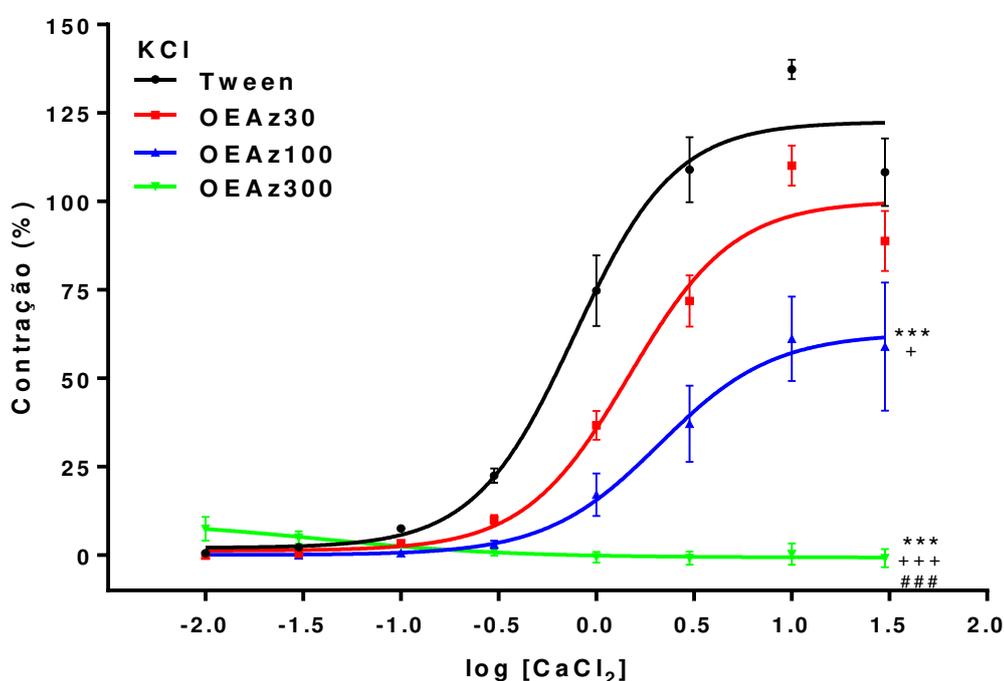
Nesse protocolo foi realizada uma curva concentração resposta de CaCl₂ em SSRAM com endotélio íntegro, em meio sem Ca²⁺, após depleção do Ca²⁺ intracelular, e após incubação com KCl 80mM e Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 (n=6), 100 (n=6) ou 300 (n=6) µg/mL. Realizou-se regressão linear para se calcular a CE₅₀ e o E_{max} e *one way*-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey para detectar diferenças entre a CE₅₀ e o E_{max} dos grupos.

No grupo Tween observou-se um CE_{50} de 0,7742 (IC95%: 0,572 – 1,031) e um E_{max} de $122,5 \pm 4,89$; no grupo OEAz30 observou-se um CE_{50} de 1,47 (IC95%: 1,087 – 1,975) e um E_{max} de $100,2 \pm 4,854$; no grupo OEAz100 observou-se um CE_{50} de 2,102 (IC95%: 0,874 – 74,2) e um E_{max} de $62,69 \pm 9,435$; no grupo OEAz300 observou-se um CE_{50} de 0,039 (IC95%: Não computado pelo *software*) e um E_{max} de $9,773 \pm 11,97$.

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os CE_{50} dos quatro grupos, quando comparados por ANOVA ($P > 0,05$), porém observou-se uma diferença estatisticamente significantes nos E_{max} dos 4 grupos quando comparados por ANOVA ($P < 0,001$), e o teste de Tukey evidenciou diferença estatisticamente significativa nos grupos OEAz100 ($P < 0,001$) e OEAz300 ($P < 0,001$), quando comparados com o grupo Tween, bem como observou-se diferenças entre os E_{max} dos grupos OEAz30 e OEAz100 ($P < 0,05$), OEAz30 e OEAz300 ($P < 0,001$), e entre OEAz100 e OEAz300 ($P < 0,001$) (Gráfico 14).

Portanto, pode-se afirmar que quanto maior a dose de OEAz, menor o E_{max} do $CaCl_2$ em meio sem cálcio e na presença de alta concentração de KCl.

Gráfico 14 - Efeito do CaCl_2 em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro que passaram por um processo para depleção dos estoques intracelulares de cálcio, mantidas em meio sem cálcio contendo KCl 80 mM, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (OEAz30, n=6), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (OEAz100, n=6), ou 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (OEAz300, n=6). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) da contração induzida pelo CaCl_2 em percentual relativo à média das contrações iniciais com KCl 80 mM. E_{max} : Tween: $122,5 \pm 4,89$; OEAz30: $100,2 \pm 4,85$; OEAz100: $62,69 \pm 9,43$; OEAz300: $9,77 \pm 11,97$.



Fonte: Dados da pesquisa

*** denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo Tween ($P < 0,001$);

+ denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo OEAz30 ($P < 0,05$);

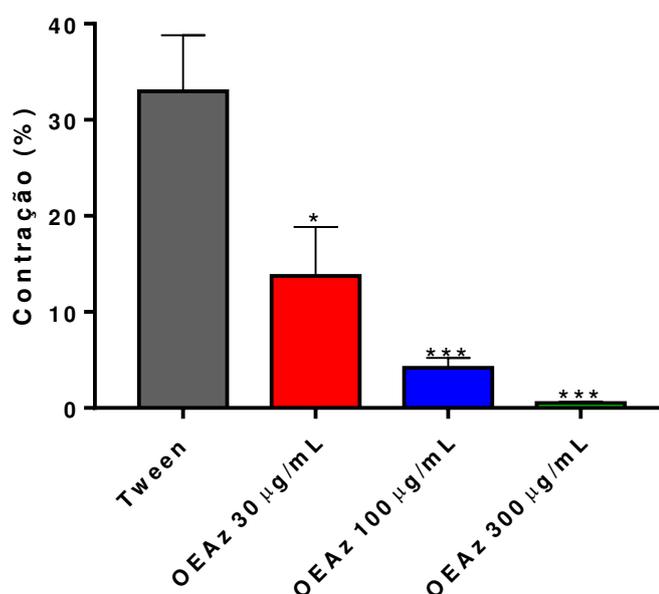
+++ denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo OEAz30 ($P < 0,001$);

denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo OEAz100 ($P < 0,001$).

5.7 Avaliação da influência do OEAz na contração induzida por fenilefrina ou cafeína na ausência de Ca^{2+} extracelular.

O OEAz foi capaz de reduzir a contração induzida por fenilefrina na ausência de Ca^{2+} extracelular de uma maneira dose-dependente. A contração induzida por fenilefrina no grupo Tween (n=6) foi $32,97 \pm 5,846$, no grupo OEAz30 (n=6) foi $13,76 \pm 5,074$, no grupo OEAz100 (n=6) foi $4,178 \pm 1,034$, e no grupo OEAz300 (n=6) foi $0,5156 \pm 0,1475$. Foi observada diferença estatisticamente significativa nos grupos OEAz30 ($P < 0,05$), OEAz100 ($P < 0,001$) e no grupo OEAz300 ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo Tween por *one way*-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Efeito da Fenilefrina (PHE, 10 μM) em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro, mantidas em meio sem cálcio, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6), ou 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) da contração induzida pela PHE em percentual relativo à média das contrações iniciais com KCl 80 mM.



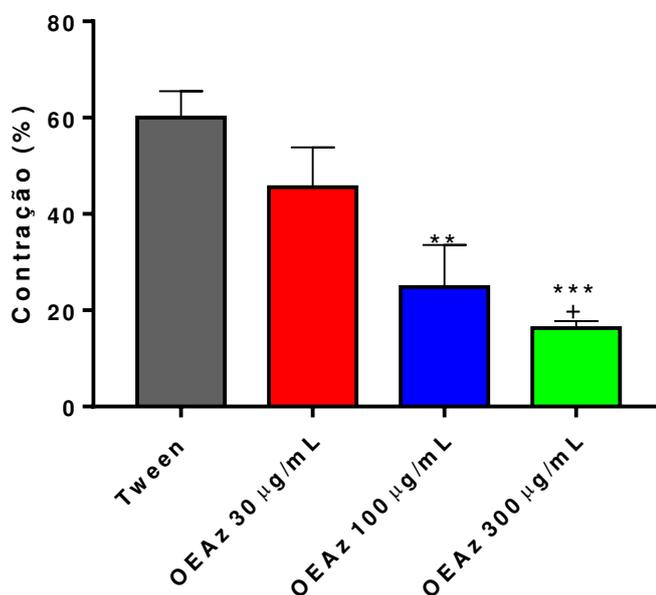
Fonte: Dados da pesquisa

* denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo Tween ($P < 0,05$);

*** denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo Tween ($P < 0,001$).

O OEAz foi capaz de reduzir a contração induzida por Cafeína na ausência de Ca^{2+} extracelular de uma maneira dose-dependente. A contração induzida por cafeína no grupo Tween (n=6) foi $60,05 \pm 5,427$, no grupo OEAz30 (n=6) foi $45,55 \pm 8,312$, no grupo OEAz100 (n=6) foi $24,86 \pm 8,704$, e no grupo OEAz300 (n=6) foi $16,29 \pm 1,481$. Foi observada diferença estatisticamente significativa nos grupos OEAz100 ($P < 0,01$) e OEAz300 ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo Tween por *one way*-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey, bem como no grupo OEAz300 quando comparado ao grupo OEAz30 ($P < 0,05$) (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Efeito da Cafeína (30 mM) em preparações de segundo ramo de artéria mesentérica com endotélio íntegro, mantidas em meio sem cálcio, pré-incubadas com Tween (n=6), ou OEAz nas doses 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6), ou 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=6). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) da contração induzida pela Cafeína em percentual relativo à média das contrações iniciais com KCl 80 mM.



Fonte: Dados da pesquisa

** denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo Controle ($P < 0,01$);

*** denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo Controle ($P < 0,001$);

+ denota diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo OEAz 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) na reatividade vascular de artérias de resistência isoladas de ratos e seu possível mecanismo de ação. A *Alpinia zerumbet* vem sendo largamente estudada em relação aos seus efeitos farmacológicos, sobretudo em relação aos efeitos cardiovasculares, e vem mostrando resultados promissores, mostrando que essa planta tem potencial para serem realizados ensaios clínicos, bem como vir a se tornar um medicamento fitoterápico.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias de baixo peso molecular, voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas principalmente por destilação por arraste de vapor, hidrodestilação ou extração por solvente, e são utilizados na indústria alimentícia, em perfumaria, cosméticos, bem como em produtos farmacêuticos (SIMÕES; SPITZER, 1999; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Neste trabalho, não foi utilizado nenhuma substância isolada, pois o interesse maior é utilizar os conhecimentos aqui obtidos para posteriores estudos clínicos com um fitoterápico de *Alpinia zerumbet*, e não com substâncias isoladas, entretanto realizou-se uma análise química do OEAz por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) para identificação dos seus principais constituintes.

A partir da CG-EM, obteve-se a composição química do OEAz, onde foi observado que os 3 constituintes majoritários foram o 1,8-cineol (24,27%), terpinen-4-ol (20,41%) e o p-cimeno (15,74%), entretanto deve-se ressaltar que a constituição química dos óleos essenciais é muito variável de acordo com diversos fatores, como época da colheita, região de cultivo, técnica de extração, dentre outras (SIMÕES; SPITZER, 1999; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Diversos trabalhos mostram o 1,8-cineol e o terpinen-4-ol como os constituintes com maior percentual do OEAz, entretanto, mostram o p-cimeno entre os constituintes com percentual menos importante (CHEN *et al.*, 2014; CUNHA, 2012; LAHLOU *et al.*, 2002a, 2003; SANTOS *et al.*, 2011).

Os 3 principais constituintes do OEAz, encontrados na amostra estudada no presente trabalho, já foram objeto de estudo em outras pesquisas, em sua forma isolada, para avaliação de alguns efeitos cardiovasculares. Já foi observado que o terpinen-4-ol possui um efeito vasodilatador em aorta de rato isolada, que parece estar

relacionado com a inibição de processos contráteis dependente do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC) (MAIA-JOCA *et al.*, 2014), bem como apresenta um efeito anti-hipertensivo em ratos com o modelo de hipertensão doca-sal (LAHLOU *et al.*, 2003).

O 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, tem efeito hipotensor em ratos anestesiados e alertas, induzido por um relaxamento da musculatura vascular lisa (LAHLOU *et al.*, 2002a). Pinto *et al.* (2009) estudaram o efeito do OEAz e do 1,8-cineol em aorta de rato isolada e foi verificado que o OEAz e o 1,8-cineol possuem um efeito vasodilatador dependente de endotélio, porém o efeito do OEAz parece não ser atribuído apenas ao 1,8-cineol, tendo participação também de outros constituintes nesse efeito. Apesar de ter sido observado um efeito vasodilatador do 1,8-cineol, dependente do endotélio no trabalho de Pinto *et al.* (2009), foi realizada uma pesquisa para verificar o efeito do eucaliptol em músculo papilar do ventrículo esquerdo isolado de rato, e foi observado que o eucaliptol possui um efeito depressor do músculo cardíaco (efeito inotrópico negativo), de maneira dose dependente, que parece estar ligado ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} (SOARES *et al.*, 2005).

O p-cimeno é um monoterpeno cuja atividade vasodilatadora em aorta de rato isolada parece ser independente de endotélio, bem como parece estar envolvida com a abertura de canais de K^+ retificador de influxo (K_{IR}), bem como canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) (SILVA *et al.*, 2015).

Os estudos de reatividade vascular encontrados com a *Alpinia zerumbet* ou com seus principais constituintes foram realizados em artérias de condutância. As artérias de resistência e de condutância possuem diferenças anatômicas e funcionais que podem interferir na potência e no mecanismo de ação de fármacos, e até de substâncias endógenas, como a noradrenalina e a serotonina (ADEGUNLOYE; SOFOLA, 1997; ALTWEGG *et al.*, 2000; BRITO, 2015; FLACCO *et al.*, 2013).

As artérias de resistência podem ser definidas como vasos pré-capilares que contribuem passivamente para a resistência em repouso, bem como contribuem ativamente para o controle do fluxo sanguíneo durante alterações na demanda (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001). Sabe-se que tais artérias tem uma relação direta com aumento da resistência vascular periférica na hipertensão (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; SCHIFFRIN, 1992). Existem autores que consideram artérias de resistência àquelas que tem diâmetro entre 100 e

300 μm (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001), e outros que consideram as com menos de 400 μm (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000).

Os ramos de artéria mesentérica foram escolhidos para serem utilizados nesse estudo por serem considerados artérias de resistência (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001), fato, esse, corroborado ao se estabelecer o diâmetro normalizado das artérias utilizadas no estudo, cuja média foi de 285,7 μm . Nenhuma artéria ultrapassou o limite superior de 400 μm , e a maioria dos vasos utilizados (63,89%) estiveram abaixo de 300 μm .

O U-46619 e o KCl promovem vasocontração por mecanismos diferentes. O U-46619 promove contração mediada por receptor, ativando o receptor de tromboxano A_2 no músculo liso vascular, que é um receptor 7 transmembrana que age via ativação de fosfolipase C, com conseqüente formação dos segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), bem como um aumento do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} dependente de voltagem e liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares (HALUSHKA; ALLAN; DAVIS-BRUNO, 1995; MCKENZIE; MACDONALD; SHAW, 2009). O KCl promove uma contração devido a despolarização da membrana, o aumento de K^+ promove uma abertura dos canais de Ca^{2+} dependente de voltagem, com conseqüente aumento do influxo de cálcio e a contração do músculo liso vascular, bem como parece promover um aumento da sensibilização ao Ca^{2+} (RATZ *et al.*, 2005; URBAN; BERG; RATZ, 2003).

O presente estudo mostrou que o OEAz promoveu uma vasodilatação dose-dependente em ramos de artéria mesentérica pré-contraídas com KCl e com U-46619, porém a potência do OEAz foi maior no grupo pré-contraído com U-46619, tanto com endotélio íntegro quanto com endotélio desnudo. Tal fato pode ter ocorrido devido às diferenças entre os mecanismos contráteis induzidos pelos agonistas, portanto, talvez o OEAz tenha uma afinidade maior por algum mecanismo envolvido na contração do U-46619, porém, até o presente protocolo, não se podem fazer suposições com relação ao mecanismo de ação do OEAz devido à complexidade da contração induzida pelos agonistas, que envolvem diversos mecanismos diferentes. Além disso, o E_{max} foi o mesmo em ambos os grupos, indicando que o efeito total do OEAz é independente da via de contração.

Foi observado um efeito bifásico transitório do OEAz nas doses entre 300 e 3000 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, observou-se uma vasoconstrição transitória induzida pelo OEAz

nessas doses, tanto nos ramos de artéria mesentérica do grupo KCl, como no grupo U-46619, que voltavam ao basal após um tempo. Cunha (2012) mostrou um efeito bifásico induzido pela fração hexânica do OEAz (FHOEAz) em aorta de rato isolada, porém, no referido trabalho, esse efeito ocorreu nas doses mais baixas da FHOEAz, diferente dos nossos achados, cujo efeito bifásico transitório ocorreu nas doses mais altas. O principal constituinte da fração hexânica do OEAz estudada por Cunha (2012) era o p-Cimeno, um dos constituintes majoritários da nossa amostra de OEAz, porém um constituinte menos expressivo no OEAz testado por Cunha (2012), cujo efeito bifásico foi muito discreto. Levando em consideração que a FHOEAz de Cunha (2012) e o OEAz do presente trabalho possuem alta concentração de p-Cimeno e apresentam efeito bifásico característico, pode-se levantar a hipótese do efeito bifásico observado ser induzido pelo p-Cimeno.

Os resultados deste estudo indicam que o efeito vasodilatador do OEAz é independente de endotélio, visto que não houve diferenças estatisticamente significativas no efeito vasodilatador do OEAz em ramos de artéria mesentérica com endotélio íntegro e desnudo. Tal achado corrobora com o estudo de Cunha *et al.* (2013), que observou um efeito vasodilatador independente de endotélio induzido pela fração metanólica do OEAz em anéis de aorta de rato, entretanto, outros trabalhos já mostraram um efeito vasodilatador dependente de endotélio da *Alpinia zerumbet* em leito vascular mesentérico (MOURA *et al.*, 2005) e em anéis de aorta (PINTO *et al.*, 2009; TAO; HU; SHEN, 2013).

O N ω -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) é um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*), que age competindo com a L-arginina na síntese do óxido nítrico (NO) (REES *et al.*, 1990; SANT'ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). O L-NAME foi utilizado para verificar o efeito do bloqueio da NOS no mecanismo de ação do OEAz, e foi observado uma diminuição da potência do OEAz no grupo pré-tratado com L-NAME, entretanto não foi observada diminuição no E_{max}. Levando em consideração que a NOS é uma enzima encontrada no endotélio vascular, pode-se dizer que esse é um mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio, o que contradiz nossos resultados anteriores que mostram que o OEAz tem efeito independente de endotélio.

O NO é um radical livre que causa, entre outros efeitos, uma vasodilatação, mediante estímulo da enzima guanilato ciclase solúvel, presente no músculo liso

vascular, que induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ativação da enzima proteinocinase G, causando uma diminuição do influxo de Ca^{2+} , bem como promovendo a reentrada do Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (SANT'ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

O pré-tratamento das artérias com ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), também reduziu a potência do OEAz. Tendo em vista que a GCs está envolvida no mecanismo de ação NO, esse resultado corrobora com aquele encontrado no pré-tratamento com L-NAME. Portanto, pode-se sugerir que um dos mecanismos de ação do OEAz envolve a via NOS-GCs, porém esse não é o seu mecanismo principal, tendo em vista que o ODQ e o L-NAME não foram capazes de reduzir o E_{\max} do OEAz.

Trabalhos anteriores com OEAz em aorta de rato mostraram um efeito vasodilatador totalmente dependente de endotélio, ocorrendo diminuição do E_{\max} em anéis de aorta pré-tratados com L-NAME e com azul de metileno, um inibidor da GCs (PINTO *et al.*, 2009; TAO; HU; SHEN, 2013). Entretanto, Cunha *et al.* (2013) mostraram que o efeito vasodilatador da fração metanólica do OEAz, em aorta de rato, não foi alterado pela presença de ODQ ou L-NAME.

Tais divergências encontradas nos referidos trabalhos podem ocorrer devido a dois fatores principais: (1) os óleos essenciais têm uma composição muito variável e, mesmo o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol sendo os componentes principais em todos os casos, o percentual de tais constituintes varia muito e não podemos descartar a atividade dos outros constituintes, mesmo em pequena quantidade; (2) o tecido testado no presente trabalho difere dos trabalhos supracitados, e a literatura pesquisada carece de pesquisas em relação ao efeito da *Alpinia zerumbet* ou de algum dos principais constituintes em artérias de resistência.

O efeito do OEAz parece não estar ligado aos receptores muscarínicos, ou prostanoídes, pois o bloqueio dessas vias com atropina e indometacina, respectivamente, não produziram alterações na CE_{50} ou no E_{\max} , ratificando o resultado encontrado em outros trabalhos em aorta de rato (CUNHA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2009; TAO; HU; SHEN, 2013)

Os canais de potássio têm uma participação chave na regulação do potencial de membrana e, conseqüentemente, na regulação do tônus do músculo liso vascular. Uma ativação desses canais causa uma hiperpolarização da membrana, resultando

em um relaxamento do músculo liso vascular decorrente da diminuição do influxo de Ca^{2+} (KO *et al.*, 2010; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014). No músculo vascular existem 4 tipos principais de canais de K^+ , são eles: (1) canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} ; (2) canais de K^+ sensíveis ao ATP; (3) canais de K^+ retificadores de influxo; (4) canais de K^+ dependentes de voltagem (STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014).

Para avaliar o efeito do OEAz nos canais de potássio, foram utilizados 3 bloqueadores de canais de potássio, são eles o tetraetilamônio, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ ; a glibenclamida, inibidor dos canais de K^+ dependentes de ATP; e a 4-aminopiridina, que age bloqueando os canais de K^+ dependentes de voltagem. Nenhum dos três bloqueadores causaram variação na potência ou E_{max} no efeito do OEAz, reiterando o que foi encontrado em trabalhos anteriores (CUNHA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2009).

O Ca^{2+} é um íon responsável por diversas funções no músculo liso, incluindo a contração muscular, portanto os canais de Ca^{2+} são de fundamental importância para a contração muscular, visto que controlam o movimento do Ca^{2+} na célula. O aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma da célula muscular lisa pode ocorrer mediante influxo de Ca^{2+} , podendo, este, ser decorrente de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC, do inglês *voltage operated calcium channel*) ou de receptores (ROCC, do inglês *receptor operated calcium channel*), ou mediante liberação do Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático, podendo essa liberação ocorrer por receptores de rianodina ou por receptores de IP3 (AMBERG; NAVEDO, 2013; RAINBOW; MACMILLAN; MCCARRON, 2009).

Visando verificar o efeito do OEAz nos canais de Ca^{2+} foram realizados três protocolos, cada um objetivando verificar o efeito em um canal específico. O primeiro verificou o efeito do OEAz na contração induzida por Ca^{2+} na presença de alta concentração de K^+ em meio sem Ca^{2+} e após depleção do Ca^{2+} intracelular. Nesse protocolo foi verificado o efeito do OEAz nos VOCC, visto que o K^+ em alta concentração promove a abertura de tais canais. Observou-se que o OEAz impediu a contração induzida por Ca^{2+} de uma maneira concentração-dependente. Tal resultado está em consonância com um estudo anterior (CUNHA *et al.*, 2013) e sugere que o OEAz bloqueia os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.

Foi verificado ainda o efeito do OEAz na liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} pelos receptores de IP3 e de rianodina, ativados, no presente estudo, por

fenilefrina e por cafeína, respectivamente. O OEAz foi capaz de reduzir a contração induzida pela fenilefrina e pela cafeína em meio sem Ca^{2+} de forma concentração-dependente, portanto sugere-se que o OEAz também bloqueia os canais de Ca^{2+} intracelulares, responsáveis pela liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Cunha *et al.* (2013) também sugeriram que o OEAz inibe a liberação dos estoques de Ca^{2+} via receptores de rianodina e de IP3.

Assim, os resultados do presente trabalho sugerem que o OEAz tem um efeito vasodilatador em segmentos do segundo ramo de artéria mesentérica mediado, em parte, pela via NOS-GCs, porém o principal efeito está relacionado com um bloqueio dos canais de Ca^{2+} .

Foram achados na literatura dois trabalhos sugerindo a hipótese que o OEAz bloqueia canais de Ca^{2+} . Cunha *et al.* (2013) sugerem que a fração metanólica do OEAz causa uma vasodilatação mediante bloqueio de canais tipo VOCC e ROCC, bem como dos canais de Ca^{2+} intracelulares, resultados esses similares aos encontrados no presente trabalho. Santos *et al.* (2011) mostraram um efeito inotrópico e cronotrópico negativo devido a um bloqueio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L em cardiomiócitos.

Diversos fármacos vêm sendo classificadas como dessensibilizadoras do Ca^{2+} , incluindo alguns fármacos considerados anteriormente como bloqueadores dos canais de Ca^{2+} . Tais fármacos são aqueles que agem na maquinaria contrátil diminuindo a força de contração sem diminuir a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma (BOWMAN; HAIKALA; PAUL, 1998; JOHNSON; FUGMAN, 1983). Alguns mecanismos importantes pelos quais os dessensibilizadores do Ca^{2+} podem agir são a inibição da via RhoA-Rho quinase, aumentando a atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina; e inibidores da ligação do Ca^{2+} com a Calmodulina, impedindo a fosforilação das cadeias leves de miosina (AGRE; VIRSHUP; BENNETT, 1984; BOWMAN; HAIKALA; PAUL, 1999; DISLI *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2005)

Levando em consideração que o OEAz bloqueia diversas vias diferentes de Ca^{2+} e que não tivemos uma forma de medir diretamente a concentração de Ca^{2+} intracelular, pode-se levantar, ainda, a hipótese de que o OEAz age causando uma dessensibilização do Ca^{2+} , ou seja, o OEAz pode promover uma redução do efeito do Ca^{2+} na contratilidade. Portanto, são necessários mais estudos para verificar o

mecanismo de ação do OEAz, principalmente estudos verificando o movimento de cálcio na célula e sua atividade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do OEAz em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica e o seu mecanismo de ação, sendo verificado que o OEAz possui um efeito vasodilatador em segmentos de segundo ramo de artéria mesentérica pré-contraídos com U-46619 e KCl.

Foram estudadas a influência do endotélio, dos receptores muscarínicos, dos canais de potássio e dos prostanóides no mecanismo de ação vasodilatador do OEAz, não sendo encontradas evidências da participação de tais vias no mesmo. O mecanismo de ação do OEAz observado foi, em parte, devido a uma ativação da via NOS-GCs, mas seu efeito principal foi devido a um bloqueio dos canais de Ca^{2+} .

Tal estudo foi de fundamental importância pois, na literatura pesquisada, não foram achados outros trabalhos que verifiquem o efeito do OEAz, ou qualquer outro extrato derivado da *Alpinia zerumbet*, em artérias de resistência, e é sabido que as artérias de resistência são os principais locais de controle da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial.

Levando em consideração que não conseguimos verificar a concentração de Ca^{2+} dentro da célula, levantou-se a hipótese da possibilidade do OEAz causar uma dessensibilização do Ca^{2+} , ou seja, provocar uma diminuição do efeito vasoconstritor induzido pelo aumento do Ca^{2+} citoplasmático. Portanto, é necessário algum estudo verificando diretamente o efeito do OEAz nos canais de Ca^{2+} , por exemplo estudo com microscopia confocal utilizando marcadores fluorescentes de Ca^{2+} , ou estudos de eletrofisiologia, verificando o efeito do OEAz nas correntes de Ca^{2+} , para confirmar o mecanismo de ação do OEAz em artérias de resistência.

8 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* possui um efeito vasodilatador em artérias de resistência isoladas de ratos envolvendo um antagonismo ao Ca^{2+} e, em menor escala, uma ativação da via NOS-GCs.

REFERÊNCIAS

- ADEGUNLOYE, B. J.; SOFOLA, O. A. Differential responses of rat aorta and mesenteric artery to norepinephrine and serotonin in vitro. **Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 25-31, 1997.
- AGRE, P.; VIRSHUP, D.; BENNETT, V. Bepridil and cetiedil. Vasodilators which inhibit Ca²⁺-dependent calmodulin interactions with erythrocyte membranes. **The Journal of clinical investigation**, v. 74, n. 3, p. 812-820, 1984.
- ALBUQUERQUE, E. S. B. DE; NEVES, L. D. J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 109–121, 2004.
- ALTWEGG, L. A. *et al.* Nebivolol induces NO-mediated relaxations of rat small mesenteric but not of large elastic arteries. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 316-320, 2000.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: História, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450–513, 2013.
- AMANO, M. *et al.* Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20246-20249, 1996.
- AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. **Microcirculation**, v. 20, n. 4, p. 281–289, 2013.
- ANVISA. **Consolidado de normas da COFID (Versão V)**. 2015.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328–338, 2001.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* **Heart Disease and Stroke Statistics - 2017 Update: A report from the American Heart Association**. v. 135, n. 10, p. e146-e603, 2017.
- BEZERRA, M. A. C. *et al.* Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 549–551, 2000.
- BOWMAN, P.; HAIKALA, H.; PAUL, R. J. Levosimendan, a calcium sensitizer in cardiac muscle, induces relaxation in coronary smooth muscle through calcium desensitization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 1, p. 316-325, 1999.
- BRANDES, R. P. Endothelial dysfunction and hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 5, p. 924-928, 2014.

BRITO, T. S. **Atividade vasorrelaxante do 2-Nitro-1-Fenil-1-Propanol em preparações vasculares isoladas de ratos**. 2015. 107f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4051–4061, 2012.

CHEN, Y. *et al.* Essential oils from Fructus *A. zerumbet* protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by Ox-LDL in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

CHOMPOO, J. *et al.* Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 106, 2012a.

CHOMPOO, J. *et al.* Antiatherogenic properties of acetone extract of *Alpinia zerumbet* seeds. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6237–6248, 2012b.

CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2001.

CHUANG, C. M. *et al.* Hypolipidemic effects of different angiocarp parts of *Alpinia zerumbet*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 1257–1264, 2011.

CORREA, A. J. C.; LIMA, C. E.; COSTA, M. C. C. D. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 113-119, 2010.

CUNHA, G. H. **Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vasuclar *in vitro* e nos patâmetros e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo***. 2012. 224f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CUNHA, G. H. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 5–6, p. 337–345, 2013.

CUNHA, G. H. *et al.* Comparative study of the antihypertensive effects of hexane, chloroform and methanol fractions of essential oil of *Alpinia zerumbet* in rats Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 113–124, 2016.

DANISH MYO TECHNOLOGY. **Multi wire myograph system - Model 620M User manual**. 2013

DE ARAÚJO, F. Y. R. *et al.* Inhibition of ketamine-induced hyperlocomotion in mice by the essential oil of *Alpinia zerumbet*: Possible involvement of an antioxidant effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1103–1110, 2011.

DE ARAÚJO PINHO, F. V. S. *et al.* Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6–7, p. 482–486, 2005.

DISLI, O. M. *et al.* Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil prevent agonist-induced vasospasm in human radial artery. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 87, n. 8, p. 595-601, 2009.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: A synopsis. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 863–879, 2010.

EVANS, W. C. Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. **Trease and Evan's Pharmacognosy**, GE Trease and WC Evans, eds (London: WB Saunders), p. 327-332, 1996.

FLACCO, N. *et al.* Different β -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 413-425, 2013.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

GILES, T. D. *et al.* Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 198–205, 2012.

HALL, J. E. **Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 1176p.

HALUSHKA, P. V.; ALLAN, C. J.; DAVIS-BRUNO, K. L. Thromboxane A2 receptors. **Journal of lipid mediators and cell signalling**, v. 12, p. 361–378, 1995.

HARNETT, K. M.; BIANCANI, P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. **The American journal of medicine**, v. 115, n. 3, p. 24-30, 2003.

HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. **Experimental biology and medicine**, v. 230, n. 11, p. 829-835, 2005.

HOLANDA, T. M. **Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na função cardiovascular e autonômica de ratos com infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol.** 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, n. 3, p. 312–8, 2000.

JOHNSON, J. D.; FUGMAN, D. A. Calcium and calmodulin antagonists binding to calmodulin and relaxation of coronary segments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 226, n. 2, p. 330-334, 1983.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica.** 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 1228p.

KO, E. A. *et al.* Pathophysiology of voltage-gated K⁺channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, n. 1, p. 95–101, 2010.

LAHLOU, S. *et al.* Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1125–1131, 2002a.

LAHLOU, S. *et al.* Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in rats: Role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1097–1102, 2002b.

LAHLOU, S. *et al.* Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 323–330, 2003.

LEAL-CARDOSO, J. H. *et al.* Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 549–553, 2004.

LIN, L. Y. *et al.* *Alpinia zerumbet* potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4435–4443, 2008.

LOBO FILHO, H.G. **Efeitos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* no infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Departamento de cirurgia, Universidade Federal do Ceará. 2011

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** 3.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2001. 1067p.

- LUND-JOHANSEN, P. Haemodynamics in essential hypertension. **Clinical science**, v. 59, p. 343s-354s, 1980.
- MAIA-JOCA, R. P. M. *et al.* Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. **Life Sciences**, v. 115, n. 1, p. 52–58, 2014.
- MANTOVANI, M. F. *et al.* Complementary and alternative medicine in systemic arterial hypertension. **British Journal of Cardiac Nursing** v. 12, n. 4, p. 180-186, 2017.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267p.
- MCKENZIE, C.; MACDONALD, A.; SHAW, A. M. Mechanisms of U46619-induced contraction of rat pulmonary arteries in the presence and absence of the endothelium. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 4, p. 581–596, 2009.
- MENDONÇA, V. L. *et al.* Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p.93-97, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia das espécies *Alpinia speciosa* e *Alpinia zerumbet* (Galanga)**. 2014.
- MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome biology**, v. 1, n. 4, p. REVIEWS0004, 2000.
- MOURA, R. S. *et al.* Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 288–294, 2005.
- MULVANY, M. J. Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph. Department of Pharmacology, Aarhus University, Denmark, 1988.
- MULVANY, M. J. Small artery remodelling in hypertension. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 1, p. 49-55, 2012.
- MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Physiological Reviews of Small Arteries. **Physiological reviews**, v. 70, n. 4, p. 921–961, 1990.
- MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**, v. 14, n. 1, p. 19-26, 1977.
- NASRI, H.; SHIRZAD, H. Toxicity and safety of medicinal plants. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 21–22, 2013.
- NETO, J. A. R. S. *et al.* Possible adverse reactions to herbal products: A study with individuals who resort to popular medicine in the city of diadema, SP, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 3, p. 405–411, 2014.

- OLIVEIRA, C.C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 426p.
- PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.
- PINTO, N. V. *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151–1155, 2009.
- RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SEWELL, R. D. E. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology Journal J HerbMed Pharmacol. J HerbMed Pharmacol**, v. 3, n. 31, p. 1–3, 2014.
- RAINBOW, R. D.; MACMILLAN, D.; MCCARRON, J. G. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-store arrangement in vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 46, n. 5–6, p. 313–322, 2009.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.
- RATZ, P. H. *et al.* Regulation of smooth muscle calcium sensitivity : KCl as a calcium- sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769–C783, 2005.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- REES, D. D. *et al.* Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 746–752, 1990.
- RIZZONI, D; AGABITI-ROSEI, E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. **Internal and emergency medicine**, v. 7, n. 3, p. 205-212, 2012.
- SANT'ANA DUSSE, L. M.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.
- SANTANA, A. P. M. **Avaliação Da Segurança E Genotoxicidade Do Chá de *Alpinia zerumbet* (pers.) Butt &smith em voluntários sadios**. 2009. 156f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do ceará..

SANTOS, B. A. *et al.* Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 539–543, 2011.

SCHIFFRIN, E. L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. **Hypertension**, v. 19, n. 2 Suppl, p. II1-9, 1992.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2216–2231, 2013.

SHEN, X. *et al.* Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1150, 2012.

SILVA, M. T. M. *et al.* The Vasorelaxant Effect of p-Cymene in Rat Aorta Involves Potassium Channels. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 6–11, 2015.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 961f.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. cap. 18, p. 387-416, 1999

SOARES, M. C. M. S. *et al.* Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 3, p. 453–61, 2005.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 1, p. 28–38, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial. v. 107, 2016.

STOTT, J. B.; JEPPE, T. A.; GREENWOOD, I. A. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 413–424, 2014.

TAO, L.; HU, H. S.; SHEN, X. C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from *Fructus Alpiniae Zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 387–393, 2013.

THROCKMORTON, D. C.; PACKER, C. S.; BROPHY, C. M. Protein kinase C activation during Ca²⁺-independent vascular smooth muscle contraction. **Journal of Surgical Research**, v. 78, n. 1, p. 48-53, 1998.

TU, P. T. B.; TAWATA, S. Anti-obesity effects of hispidin and alpinia zerumbet bioactives in 3t3-l1 adipocytes. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16656–16671, 2014.

TU, P. T. B.; TAWATA, S. Anti-oxidant, anti-aging, and anti-melanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16723–16740, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Departamento de Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas. **Final Technical Report – Acute and long-term toxicological analysis of the essential oil from colônia (with repeated doses) in mice**. Florianópolis. 2008. 96p. (Dados não publicados)

URBAN, N. H.; BERG, K. M.; RATZ, P. H. K⁺ depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca²⁺ sensitization of arterial muscle. **American journal of physiology - Cell physiology**, v. 285, n. 6, p. C1377-85, 2003.

VICTÓRIO, C. P. *et al.* Vasodilator activity of extracts of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum and *A. zerumbet* (Pers.) Burt et Smith cultured in vitro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 507–514, 2009.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, 2003.

WALSH, M. P. Vascular Smooth Muscle Myosin Light Chain Diphosphorylation : Mechanism , Function , and Pathological Implications. **IUBMB life**, v. 63, n. November, p. 987–1000, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases**. World Health Organization, 2017. Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 20 abr. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Healthy-lifestyle counselling. 2018.

XIAO, T. *et al.* The endothelial protective properties of essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* via the Akt/NOS-NO signaling pathway in vitro. **Planta medica**, v. 80, n. 17, p. 1628–1634, 2014.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

ZHU, Z. *et al.* Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. **Hypertension**, v. 45, n. 2, p. 233-239, 2005.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE
ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFC).**



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**EFEITO VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALPINIA ZERUMBET EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA ISOLADAS DE RATOS**", protocolo nº103/2017, sob responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 21 de setembro de 2017.

Vigência do projeto	15/09/2017 a 30/09/2018
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênico Wistar
Nº de Animais	72
Peso/Idade	-
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 16 de outubro de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1066982