



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

**GILMARA HOLANDA DA CUNHA**

**EFEITO FARMACOLÓGICO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E  
METANÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA  
REATIVIDADE VASCULAR *IN VITRO* E NOS PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES *IN VIVO***

**FORTALEZA**

**2012**

**GILMARA HOLANDA DA CUNHA**

**EFEITO FARMACOLÓGICO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E  
METANÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA  
REATIVIDADE VASCULAR *IN VITRO* E NOS PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES *IN VIVO***

*Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- C978e Cunha, Gilmara Holanda da.  
Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo* / Gilmara Holanda da Cunha. – 2012.  
223 f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes.
1. Alpinia. 2. Fitoterapia. 3. Vasodilatação. 4. Hipertensão. 5. Bloqueadores dos Canais de Cálcio. I. Título.

**GILMARA HOLANDA DA CUNHA**

**EFEITO FARMACOLÓGICO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E  
METANÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ALPINIA ZERUMBET* NA  
REATIVIDADE VASCULAR *IN VITRO* E NOS PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES *IN VIVO***

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em: 18 de janeiro de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

Profa. Dra. Gilmara Silva de Melo Santana  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR



---

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus queridos pais e ao meu amado esposo.*



---

**AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, pois durante o doutorado senti sua proteção como nunca fui capaz de sentir antes em minha vida. Ele me deu forças, paciência e sabedoria para estudar e realizar meus experimentos. Além de me fazer perceber com mais clareza o significado de ter saúde, de relevar acontecimentos desagradáveis no trabalho e recomeçar... Hoje agradeço pela concretização desta etapa de minha vida acadêmica.

A Nossa Senhora, minha mãe do céu e conselheira, por sua presença constante em minha vida por meio da oração.

Aos meus queridos pais, Gilmar Ferreira da Cunha e Tânia Maria Holanda da Cunha, pelo amor, cuidado e compreensão. Já faz certo tempo desde que meu pai me levava pela mão pra escola, e que minha mãe ensinava as minhas tarefas em casa. Hoje compartilho com vocês a conclusão do meu doutorado, visto que foram fundamentais nesse processo, pois sempre me incentivaram a estudar. Vocês são pais preciosos, nos quais vou me espelhar quando for criar os meus filhos.

Aos meus irmãos, Gilmar Ferreira da Cunha Júnior e Giselly Holanda da Cunha, pelo carinho.

Ao meu amado esposo, Alfredo Silveira Araújo Neto. Considero este doutorado um investimento nosso, pois dedicamos muitos dos nossos momentos a ele, assim como a minha dedicação exclusiva à pós-graduação só foi possível devido a sua ajuda. Obrigada pelas vezes em me acompanhou nos experimentos aos sábados, domingos e feriados, que segurou os ratos pra eu fazer gavagem, que carregou minhas caixas de ratos... Acredito que sua compreensão, paciência e incentivo suavizaram o meu cansaço, além de ter demonstrado seu amor incondicional por mim.

À Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes. Deixo aqui registrado o meu carinho e a minha admiração pela senhora, como pesquisadora, professora e exemplo de trabalho. Durante o mestrado e doutorado em que a senhora foi minha orientadora, muito aprendi com suas orientações científicas e também com nossas conversas sobre a vida. Acredito que durante esta fase na Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) fui capaz de absorver o que de melhor foi me passado, seja sobre o ambiente de trabalho, dos ensaios clínicos e da pesquisa. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis da minha vida e pela oportunidade e confiança em me deixar

ministrar suas aulas na graduação, pois muito aprendi e aperfeiçoei minha capacidade de ensinar. Hoje estou mais qualificada profissionalmente, seja como professora ou pesquisadora. Agradeço também por usar a estrutura da UNIFAC para realizar meus experimentos, visto que nunca me faltaram equipamentos e fármacos, o que é uma conquista da senhora por meio de seu esforço e trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, que me deu a oportunidade de estudar a *Alpinia zerumbet*, esta planta com tantos atributos farmacológicos. Gostaria de dizer que o senhor é um pesquisador e professor pelo qual tenho profundo respeito e admiração. Ainda lembro-me das suas aulas de farmacologia na graduação da enfermagem, onde fui sua aluna. Sempre entusiasmado com as novidades no mundo da pesquisa, além de ser um exemplo de empreendedorismo na área da Farmacologia em nosso país.

Ao Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine, meu coorientador. O considero um cientista com grande devoção pela pesquisa. Você é uma pessoa pela qual tenho muito carinho e estima. Meu eterno agradecimento pelas orientações, apoio diário, paciência, amizade e colaborações valiosas durante o desenvolvimento desta tese. Nunca esquecerei nossas discussões, às vezes estressantes, mas que eram repletas de conhecimentos e orientações que contribuíram de forma estatisticamente significativa para o meu crescimento como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira. Apesar da pouca convivência, pude perceber sua dedicação ao ensino e a pesquisa. Obrigada pelas frações do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, as quais foram estudadas nesse trabalho. Agradeço também por ter recebido a mim em seu local de trabalho, na Química, depois das 17 horas e até aos sábados, e estar sempre disponível quando lhe telefonava pra tirar dúvidas.

Ao químico, Dr. Cláudio Costa dos Santos, que participou da minha banca de qualificação do doutorado, ajudou com as frações do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* e diluição das drogas utilizadas no estudo. Obrigada pelas discussões de química e por sempre ser tão atencioso.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Frota Bezerra, um exemplo de professor e médico, que conheci na UNIFAC, e que muito contribuiu para o meu desenvolvimento como pesquisadora.

À enfermeira Ana Leite, gerente do núcleo da garantia da qualidade da UNIFAC, pelas orientações acerca da pesquisa clínica e pelas idéias trocadas no dia-a-dia.

Aos colegas de pós-graduação da UNIFAC, em especial, Jonaina Oliveira, Andréa Pontes, Marina Becker e Diogo de Almeida pela amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica Layana Vieira, Lídia Audrey, Hugo Robert, Danilo Galvão e Wallady Barroso por me ajudarem nos experimentos, mesmo cansados, nos feriados, finais de semana e férias.

Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente, Rafael Coelho Jorge, pela amizade.

Ao Professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães e Dr. Rodrigo Siqueira, pelas orientações preciosas acerca dos experimentos de reatividade vascular.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, pelas orientações acerca da Farmacologia.

Aos funcionários da UNIFAC, Malu Amaral, Fábria Bezerra, Tereza Rocha, Flávia Martins, Raimundo, Tânia, Rogéria, dona Bia, Dalva e Sr. Francisco por toda ajuda durante meu doutorado na UNIFAC.

Aos funcionários do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), especialmente, Silvana França, Erivanda Rios e Adelânia Roque.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em especial, Aura Rhanes, Márcia, Alana, Joana, Sr. Fernando e os funcionários do biotério, Sr. Bento e Sr. Aroldo.

Aos professores doutores Gilmara Silva de Melo Santana e Nilberto Robson Falcão do Nascimento, por aceitarem participar na minha banca do doutorado, bem como pelas contribuições e sugestões para a versão final desta tese.

Meu singelo agradecimento e o meu respeito aos inúmeros ratos, que mesmo involuntariamente, deram suas vidas para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Instituto Claude Bernard (InCB) pela colaboração financeira e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa no Brasil.



---

**ΕΠΪΓΡΑΦΕ**

*“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso.”*

*Ralph Waldo Emerson (1803-1882)*



---

**RESUMO**

## RESUMO

**Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*.** Gilmaria Holanda da Cunha. Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes. Tese de Doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2012.

A *Alpinia zerumbet* é uma planta da família *Zingiberaceae*, denominada popularmente “colônia” no Nordeste do Brasil. É utilizada com fins medicinais no tratamento de hipertensão e tem sido estudada em relação as suas propriedades farmacológicas. Esta pesquisa teve por objetivo analisar o efeito farmacológico das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal, da Universidade Federal do Ceará, sob os protocolos n° 55/10 e n° 18/2011, de acordo com as normas de boas práticas que envolvem o uso de animais experimentais. Para todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos. Realizaram-se experimentos de reatividade vascular no banho de órgãos, com preparações de aorta isolada de rato, com endotélio íntegro e desnudo, mantidos em carbogênio e solução de Krebs-Henseleit com concentração em mmol/L: NaCl: 118,0; KCl: 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1,2; NaHCO<sub>3</sub>: 15,0; CaCl<sub>2</sub>: 2,5 e Glicose: 5,5. Foi observada a variação da tensão isométrica e utilizados diferentes fármacos inibidores específicos para análise do mecanismo de ação do efeito vasodilatador. Analisou-se a pressão arterial indireta por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico, através da administração do L-NAME, obtendo-se a pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, além da variação do peso corporal. Constatou-se que o OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz induzem relaxamento de anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L), de forma dependente da dose, sendo a menor CE<sub>50</sub> a da FMOEAz (150,45 µg/mL). A administração por gavagem de 100 mg/kg de OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz reduziu a pressão arterial em ratos hipertensos pelo modelo de inibição crônica do óxido nítrico, um efeito que foi superior ao controle negativo com água destilada e inferior aos controles positivos com Captopril e Nifedipina. A FMOEAz (0,1 - 3000 µg/mL) induz relaxamento dependente da dose em anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L) ou KCl (80 mmol/L), com endotélio intacto ou desnudo. Os estudos de mobilização de cálcio mostraram que a FMOEAz inibe o influxo de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular, bem como interfere na contração induzida pela liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares pela Fenilefrina (1 µmol/L) ou Cafeína (30 mmol/L). A 4-aminopiridina (1 mmol/L) e a Iberiotoxina (30 nmol/L) aumentam a CE<sub>50</sub> da FMOEAz, mas não interferem no seu efeito vasodilatador final. A pré-incubação com L-NAME (100 µmol/L), ODQ (10 µmol/L); Indometacina (10 µmol/L), Atropina (1 µmol/L), Catalase (500 U/ml), SOD (300 U/ml); Wortmannina (0,5 µmol/L), Tetraetilamônio (10 mmol/L), Apamina (1 µmol/L); Caribdotoxina (15 nmol/L) e Glibenclamida (10 µmol/L) não interferiram no relaxamento induzido pela FMOEAz. Concluiu-se que o OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz possuem efeito hipotensor *in vivo* e vasodilatador *in vitro*, e que o mecanismo de ação da FMOEAz, provavelmente, envolve o antagonismo aos canais de cálcio dependentes de voltagem, aos canais de cálcio operados por receptor, interferindo também na liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

**Palavras-chave:** *Alpinia*; Fitoterapia; Vasodilatação; Hipertensão; Bloqueadores dos Canais de Cálcio.



---

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Pharmacological effect of the hexanic, chloroformic and methanolic fractions of the essential oil of *Alpinia zerumbet* in the vascular reactivity *in vitro* and cardiovascular parameters *in vivo*.** Gilmará Holanda da Cunha. Supervisor: PhD. Professor Maria Elisabete Amaral de Moraes. Doctoral Thesis in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceará, 2012.

The *Alpinia zerumbet* is a plant of the family *Zingiberaceae*, popularly called "colônia" in Northeastern Brazil. It is used for medicinal purposes to treat hypertension and has been studied in relation to its pharmacological properties. This study aimed to analyze the pharmacological effect of hexanic (HFEOAz), chloroformic (CFEOAz), and methanolic (MFEOAz) fractions of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAz) in the vascular reactivity *in vitro* and cardiovascular parameters *in vivo*. The research project was approved by the Ethics Committee on Animal Research, of the Federal University of Ceará, under protocol numbers 55/10 and 18/2011, according to the standards of good laboratory practice involving the use of experimental animals. For all experiments male Wistar rats were used. Experiments of vascular reactivity were conducted in organ bath, with preparations of isolated rat aorta with intact endothelium and desnuded, kept in carbogen and Krebs-Henseleit solution with a concentration in mmol/L: NaCl: 118,0; KCl: 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,2; NaHCO<sub>3</sub>: 15,0; CaCl<sub>2</sub>: 2,5 e Glucose: 5,5. Was observed variation in isometric tension and used different specific inhibitors to analyze the mechanism of action of the vasodilator effect. We analyzed blood pressure indirectly by tail plethysmography in rats submitted to chronic hypertension by inhibition of nitric oxide by the administration of L-NAME, obtaining the systolic, diastolic and mean blood pressure, heart rate, beyond variation in body weight. It was found that the EOAz, HFEOAz, CFEOAz MFEOAz induced relaxation of aortic rings pre-contracted with Phenylephrine (1 µmol/L), of dose-dependent manner, with the smallest of the EC<sub>50</sub> MFEOAz (150.45 mg/mL). The administration by gavage of 100 mg/kg EOAz, HFEOAz, CFEOAz MFEOAz reduced blood pressure in hypertensive rats by the model of chronic inhibition of nitric oxide, an effect that was greater than the negative control with distilled water and less than the positive controls with Captopril and Nifedipine. The MFEOAz (0.1 - 3000 µg/mL) concentration dependently relaxed Phenylephrine (1 µmol/L) and KCl (80 mmol/L) contracted rings with intact or denuded endothelium. Studies of calcium mobilization showed that FMOEAz inhibits the influx of Ca<sup>2+</sup> from the extracellular environment and interferes with the contraction-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stocks by Phenylephrine (1 µmol/L) or Caffeine (30 mmol/L). The 4-aminopyridine (1 mmol/L) and Iberiotoxina (30 nmol/L) increased the EC<sub>50</sub> of MFEOAz but do not interfere in its final vasodilator effect. The pre-incubation with L-NAME (100 µmol/L), ODQ (10 µmol/L), Indomethacin (10 µmol/L), Atropine (1 µmol/L), Catalase (500 U/mL), SOD (300 U/mL), Wortmannin (0.5 µmol/L), Tetraethylammonium (10 mmol/L), Apamin (1 µmol/L); Caribdotoxin (15 nmol/L) and Glibenclamide (10 µmol/L) did not interfere with the relaxation induced by MFEOAz. It was concluded that the EOAz, HFEOAz, CFEOAz and MFEOAz have hypotensive effect *in vivo* and vasodilator effect *in vitro*, and that the mechanism of action of MFEOAz probably involves the antagonism of calcium channels voltage-dependent, the calcium channel operated by receptor, also interfering in the release of calcium from intracellular stores.

**Keywords:** *Alpinia*; Phytotherapy; Vasodilatation; Hypertension; Calcium Channel Blockers.



---

**LISTAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ACH	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etila
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Apamina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase	Família de enzimas que catalisam a hidrólise do ATP
4-AP	4-aminopiridina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
CTX	Caribdotoxina
CE <sub>50</sub>	Concentração ou dose necessária para produzir 50% da resposta máxima
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DC	Doenças cardiovasculares
DER	Dose equivalente em ratos
DL <sub>50</sub>	Quantidade de substância que causa morte em 50% da população em estudo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose máxima tolerada
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FCOEAz	Fração clorofórmica do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
E <sub>max</sub>	Resposta máxima passível de ser produzida pela substância
FC	Frequência cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
FHOEAz	Fração hexânica do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
FMOEAz	Fração metanólica do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
GC	Guanilato ciclase
GLIB	Glibenclamida

GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor controlado por proteína G
GCs	Guanilato Ciclase solúvel
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	High Density Lipoprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxil
IA	Índice aritmético
INDO	Indometacina
ITX	Iberiotoxina
IK	Índice de Kovats
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
K <sup>+</sup>	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
<i>km</i>	Fator para conversão
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride
log tR	Logaritmo do tempo de retenção
M	Molar
mM	Milimolar
MeOH	Metanol
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio hidratado
mmHg	Milímetro de mercúrio
mN	MiliNewton
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOAEL	No observable adverse effect level
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular

O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OEAz	Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PDE	Fosfodiesterase
PFV	Proteína fluorescente verde
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PHE	Fenilefrina
PK	Proteína quinase
PLC	Fosfolipase C
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SOD	Superóxido dismutase
SR	Retículo sarcoplasmático
TEA	Tetraetilamônio
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
tR	Tempo de retenção
U	Unidade

## LISTA DE FIGURAS

1.	A: Músculo liso multiunitário. B: Músculo liso unitário.....	36
2.	Estrutura física do músculo liso.....	38
3.	Acoplamento excitação-contração no músculo liso.....	39
4.	Mecanismos de controle da contração e do relaxamento do músculo liso.....	40
5.	Subunidades que constituem o canal de cálcio.....	48
6.	Domínios I, II, III e IV da subunidade $\alpha_1$ do canal de cálcio e segmentos transmembrana.....	48
7.	Foto ilustrativa de um espécime de <i>Alpinia zerumbet</i> .....	54
8.	Foto ilustrativa da <i>Alpinia zerumbet</i> na época da floração.....	55
9.	Foto ilustrativa da <i>Alpinia zerumbet</i> , evidenciando a estrutura interna da flor.....	55
10.	Estrutura química do Terpinen-4-ol.....	60
11.	Estrutura química do 1,8-Cineol.....	60
12.	Foto ilustrativa da exsicata de material coletado da <i>Alpinia zerumbet</i> .....	68
13.	Fluxograma de obtenção das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) do OEAz.....	70
14.	Estruturas químicas dos componentes majoritários do OEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.....	72
15.	Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) do OEAz.....	73
16.	Estruturas químicas dos componentes majoritários da FHOEAz: sabineno, <i>p</i> -cimeno e $\gamma$ -terpineno.....	74
17.	Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) da FHOEAz.....	75
18.	Estruturas químicas dos componentes majoritários da FCOEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.....	76
19.	Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) da FCOEAz.....	77
20.	Estruturas químicas dos componentes majoritários da FMOEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.....	78
21.	Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) da FMOEAz.....	79

22.	Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) e Laboratório de Farmacologia Pré-clínica.....	80
23.	Rato Wistar macho.....	81
24.	Procedimento para retirar aorta torácica do rato.....	84
25.	Preparação dos anéis de aorta para experimento de reatividade vascular.....	85
26.	Experimento de reatividade vascular.....	86
27.	Equipamentos utilizados no experimento de reatividade vascular.....	87
28.	Representação esquemática do teste de viabilidade dos anéis aórticos.....	88
29.	Representação esquemática do protocolo para análise inicial do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	89
30.	Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda.....	91
31.	Gráfico obtido através de medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda, evidenciando pressão arterial do rato de 118 x 85 mmHg.....	92
32.	Descrição dos grupos e fluxograma do experimento <i>in vivo</i> .....	95
33.	Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina e a participação do endotélio vascular.....	96
34.	Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com KCl e a participação do endotélio vascular.....	97
35.	Representação esquemática do protocolo para avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante da FMOEAz.....	97
36.	Representação esquemática do protocolo para avaliação da contribuição da GCs para o efeito relaxante da FMOEAz.....	98
37.	Representação esquemática do protocolo para avaliação do envolvimento de prostanoídes no efeito relaxante da FMOEAz.....	98
38.	Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação dos receptores muscarínicos para o efeito relaxante da FMOEAz.....	99
39.	Representação esquemática do protocolo para análise da participação de espécies reativas de oxigênio no efeito vasodilatador da FMOEAz.....	99
40.	Representação esquemática do protocolo da avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz.....	100
41.	Representação esquemática do protocolo para análise da contribuição do bloqueio não seletivo dos canais de K <sup>+</sup> no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.....	100

42.	Representação esquemática do protocolo para análise da contribuição do bloqueio seletivo dos canais de $K^+$ no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.....	101
43.	Representação esquemática do protocolo para investigação do efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de $Ca^{2+}$ através dos canais de cálcio dependentes de voltagem, sem depleção do $Ca^{2+}$ intracelular.....	102
44.	Representação esquemática do protocolo para investigação do efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de $Ca^{2+}$ através dos canais de cálcio operados por receptor ou canais de $Ca^{2+}$ regulados por voltagem, após depleção do $Ca^{2+}$ intracelular.....	103
45.	Representação esquemática do protocolo para investigação da interferência da FMOEAz na liberação de $Ca^{2+}$ dos estoques intracelulares.....	104
46.	Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (0,01 a 3000,0 $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> e frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	112
47.	Efeito bifásico induzido pela fração hexânica (FHOEAz) e, de forma menos pronunciada, pelo óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) e frações clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz).....	113
48.	Avaliação da potência do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) e frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	114
49.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	115
50.	Taxa de aumento da pressão arterial sistólica (TAPAS) observada nos grupos Água e L-NAME durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias).....	116
51.	Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	117
52.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	117
53.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	118
54.	Varição da massa corporal, em termos percentuais dos grupos Água e L-NAME durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias), em relação ao valor basal.....	118
55.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	119
56.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	120

57.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	121
58.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	122
59.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	123
60.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	124
61.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	125
62.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	126
63.	Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	127
64.	Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	128
65.	Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	128
66.	Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	129
67.	Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	129
68.	Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	129
69.	Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dias).....	130
70.	Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dia).....	130
71.	Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dia).....	131
72.	Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dia).....	131
73.	Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos EOAz, FHEOAz, FCEOAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (30° ao	

60° dias).....	131
74. Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias).....	132
75. Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias).....	132
76. Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias).....	133
77. Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° a 36° dias).....	133
78. Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos EOAz, FHEOAz, FCEOAz e FMOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias).....	134
79. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	135
80. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	136
81. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	137
82. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	138
83. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	139
84. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	140
85. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	141
86. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	142
87. Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	143
88. Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	144
89. Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	145

90.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	146
91.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. ....	147
92.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. ....	148
93.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	149
94.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	150
95.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	151
96.	Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	152
97.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	153
98.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	154
99.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	154
100.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	155
101.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	155
102.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz.....	156
103.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz.....	157
104.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz.....	157
105.	Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz.....	158
106.	Varição da massa corporal, em termos percentuais, observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias), tomando-se como valores basais aqueles mensurados no dia 0 do experimento.....	159
107.	Varição da massa corporal, em termos percentuais, observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a	

fase de tratamento da HAS (31 a 60 dias), tomando-se como valores basais aqueles mensurados no dia 30 do experimento.....	159
108. Efeito vasodilatador induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L) em preparações com endotélio íntegro (Endotélio(+)) e desprovidas de endotélio (Endotélio(-)).....	160
109. Efeito vasodilatador induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato pré-contráidos com KCl (80 mmol/L) em preparações com endotélio íntegro (Endotélio(+)) e desprovidas de endotélio (Endotélio(-)).....	161
110. Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L) ou KCl (80 mmol/L).....	162
111. Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato desprovidas de endotélio pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L) ou KCl (80 mmol/L).....	163
112. Efeito da N <sub>ω</sub> -Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride (L-NAME) (100 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	164
113. Efeito do 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (10 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	165
114. Efeito da Indometacina (10 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	166
115. Efeito da Atropina (1 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	167
116. Efeito da Catalase (500 U/mL) e SOD (300 U/mL) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com fenilefrina (1 µmol/L).....	168
117. Efeito da Wortmannina (0,5 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	169
118. Efeito do Tetraetilamônio (TEA) (10 mmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	170
119. Efeito da 4-Aminopiridina (1 mmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	171
120. Efeito da Apamina (1 µmol/L), Caribdotoxina (15 nmol/L) e Iberiotoxina (30 nmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráidos com Fenilefrina (1 µmol/L).....	172

121.	Efeito da Glibenclamida (10 $\mu\text{mol/L}$ ) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	173
122.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em anéis de aorta de rato com endotélio intacto. Curvas concentração-efeito para $\text{CaCl}_2$ foram determinadas em solução de Krebs sem cálcio contendo KCl (60 $\text{mmol/L}$ ).....	174
123.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio. Curvas concentração-efeito para $\text{CaCl}_2$ foram determinadas em solução de Krebs sem cálcio contendo KCl (60 $\text{mmol/L}$ ).....	175
124.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em solução sem cálcio contendo KCl (60 $\text{mmol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato com endotélio intacto na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 $\mu\text{g/mL}$ ).....	176
125.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em solução sem cálcio contendo KCl (60 $\text{mmol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 $\mu\text{g/mL}$ ).....	176
126.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em solução sem cálcio contendo Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato com endotélio intacto na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 $\mu\text{g/mL}$ ).....	177
127.	Efeito da FMOEAz na contração induzida por $\text{CaCl}_2$ em solução sem cálcio contendo Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 $\mu\text{g/mL}$ ).....	177
128.	Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio intacto em solução de Krebs sem cálcio.....	178
129.	Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Fenilefrina em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio em solução de Krebs sem cálcio.....	179
130.	Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Cafeína em anéis de aorta de rato com endotélio intacto em solução de Krebs sem cálcio.....	179
131.	Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Cafeína em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio em solução sem cálcio.....	180

## LISTA DE QUADROS

1. Classificação filogenética e função dos canais de cálcio.....	49
2. Classificação atual dos fármacos antagonistas dos canais de $\text{Ca}^{2+}$ .....	50
3. Classificação atual das diidropiridinas.....	50
4. Fármacos e diluições utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i> .....	106
5. Fármacos, dosagem e veículo utilizados nos experimentos <i>in vivo</i> .....	106
6. Síntese dos resultados obtidos nos experimentos para identificação do possível mecanismo de ação da FMOEAz.....	181

## LISTA DE TABELAS

1.	Propriedades físico-químicas do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	71
2.	Constituintes químicos do OEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.....	72
3.	Constituintes químicos da FHOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.....	74
4.	Constituintes químicos da FCOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.....	76
5.	Constituintes químicos da FMOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.....	78
6.	Valores da $CE_{50}$ e $E_{max}$ referentes ao efeito vasodilatador do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) e das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em relação ao grau de relaxamento.....	114



---

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>1.1</b>	<b>O músculo liso vascular.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2</b>	<b>Hipertensão arterial sistêmica e abordagens terapêuticas.....</b>	<b>43</b>
<b>1.3</b>	<b>O cálcio, a farmacologia e os antagonistas dos canais de cálcio....</b>	<b>45</b>
<b>1.4</b>	<b>Os fitoterápicos.....</b>	<b>51</b>
<b>1.5</b>	<b><i>Alpinia zerumbet</i>.....</b>	<b>53</b>
1.5.1	Propriedades farmacológicas da <i>Alpinia zerumbet</i> .....	56
1.5.2	Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz).....	59
<b>1.6</b>	<b>Relevância e justificativa.....</b>	<b>63</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>66</b>
<b>3</b>	<b>PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1</b>	<b>Análise fitoquímica.....</b>	<b>68</b>
3.1.1	Coleta do material vegetal.....	68
3.1.2	Preparação do material vegetal.....	69
	3.1.2.1 Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> .....	69
	3.1.2.2 Frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> .....	69
3.1.3	Identificação e análise dos constituintes químicos do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....	71
<b>3.2</b>	<b>Local de realização do estudo.....</b>	<b>80</b>
<b>3.3</b>	<b>Animais.....</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Experimentos.....</b>	<b>82</b>
3.5.1	Procedimentos para realização dos estudos <i>in vitro</i> .....	83
3.5.2	Estudo <i>in vitro</i> preliminar ou inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contráidos com Fenilefrina.....	89
3.5.3	Estudo <i>in vivo</i> : Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz, e FMOEAz.....	89

3.5.4	Aplicação de protocolos específicos <i>in vitro</i> para caracterização do possível mecanismo de ação da substância que mostrou melhor perfil farmacológico no estudo <i>in vitro</i> preliminar ou inicial e no estudo <i>in vivo</i> .....	96
3.5.4.1	Efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina e a participação do endotélio vascular.....	96
3.5.4.2	Efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com KCl e a participação do endotélio vascular.....	97
3.5.4.3	Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante da FMOEAz.....	97
3.5.4.4	Contribuição da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) para o efeito relaxante da FMOEAz.....	98
3.5.4.5	Avaliação do envolvimento de prostanóides no efeito relaxante da FMOEAz.....	98
3.5.4.6	Participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante da FMOEAz.....	99
3.5.4.7	Participação de espécies reativas de oxigênio no efeito vasodilatador da FMOEAz.....	99
3.5.4.8	Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz.....	100
3.5.4.9	Contribuição do bloqueio não seletivo dos canais de K <sup>+</sup> no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.....	100
3.5.4.10	Contribuição do bloqueio seletivo dos canais de K <sup>+</sup> no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.....	101
3.5.4.11	Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K <sup>+</sup> .....	102
3.5.4.12	Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de Fenilefrina ou alta concentração de K <sup>+</sup> após depleção do Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	103
3.5.4.13	Efeito do pré-tratamento com FMOEAz na contração induzida por Fenilefrina ou Cafeína na ausência de cálcio extracelular.....	104
<b>3.6</b>	<b>Fármacos e diluições utilizadas no estudo.....</b>	<b>105</b>
<b>3.7</b>	<b>Equipamentos e materiais utilizados no estudo.....</b>	<b>107</b>

<b>3.8</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>108</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>112</b>
<b>4.1</b>	<b>Estudo <i>in vitro</i> inicial: Análise do efeito relaxante OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.....</b>	<b>112</b>
<b>4.2</b>	<b>Estudo <i>in vivo</i>: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....</b>	<b>115</b>
4.2.1	Modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico.....	115
4.2.2	Análise da pressão arterial sistólica.....	119
4.2.3	Análise da pressão arterial diastólica.....	135
4.2.4	Análise da pressão arterial média.....	144
4.2.5	Análise da frequência cardíaca.....	153
4.2.6	Análise da variação do peso dos ratos.....	158
<b>4.3</b>	<b>Caracterização do possível mecanismo de ação da FMOEAz.....</b>	<b>160</b>
4.3.1	Efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro e não íntegro pré-contraídas com Fenilefrina.....	160
4.3.2	Efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro e não íntegro pré-contraídas com KCl.....	161
4.3.3	Comparação do efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE ou KCl....	162
4.3.4	Comparação do efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato desprovidas de endotélio pré-contraídas com PHE e KCl	163
4.3.5	Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante da FMOEAz.....	164
4.3.6	Avaliação da contribuição da Guanilato Ciclase Solúvel (GCs) para o efeito relaxante da FMOEAz.....	165
4.3.7	Avaliação da participação de prostanóides endógenos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz.....	166
4.3.8	Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz.....	167
4.3.9	Avaliação da inibição de espécies reativas do oxigênio para o efeito relaxante da FMOEAz.....	168

4.3.10	Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz.....	169
4.3.11	Avaliação da participação de canais de potássio não seletivos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz.....	170
4.3.12	Avaliação da participação de canais de potássio seletivos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz.....	171
4.3.13	Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K <sup>+</sup> .....	174
4.3.14	Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K <sup>+</sup> ou Fenilefrina após depleção do Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	175
4.3.15	Efeito do pré-tratamento com FMOEAz na contração induzida por Fenilefrina ou Cafeína na ausência de cálcio extracelular.....	178
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>183</b>
<b>5.1</b>	<b>Estudo <i>in vitro</i> preliminar ou inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contráidos com Fenilefrina.....</b>	<b>185</b>
<b>5.2</b>	<b>Estudo <i>in vivo</i>: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.....</b>	<b>187</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterização do possível mecanismo de ação da substância com menor CE<sub>50</sub> no estudo <i>in vitro</i> inicial e perfil farmacológico mais satisfatório no estudo <i>in vivo</i>: FMOEAz.....</b>	<b>190</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>200</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>203</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>205</b>
	APÊNDICE A – Exemplo de traçado obtido no experimento de reatividade vascular inicial para análise do efeito relaxante do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> e suas frações hexânica, clorofórmica e metanólica.....	220
	ANEXO A – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA): Projeto I.....	222
	ANEXO B – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA): Projeto II.....	223



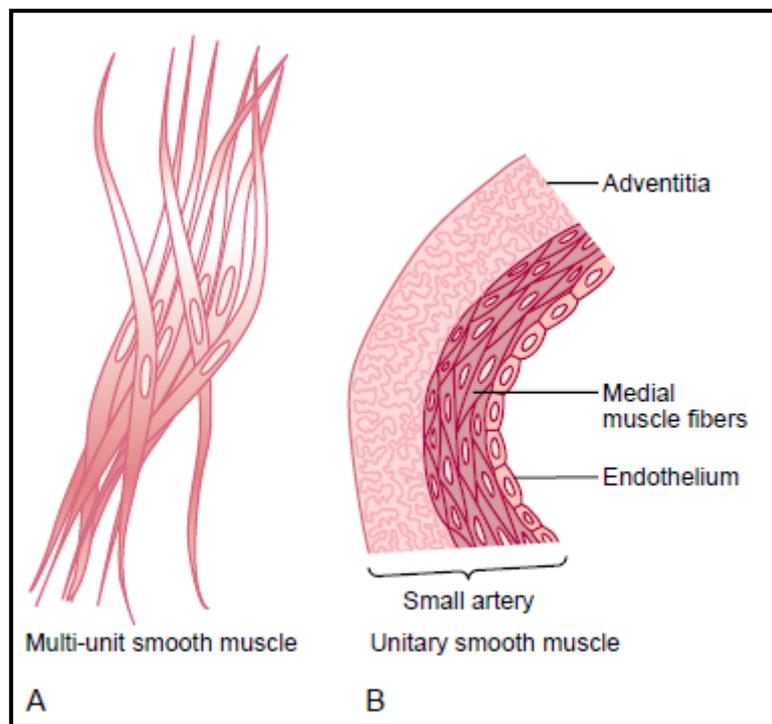
---

# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O músculo liso vascular

O músculo liso é dividido em dois tipos principais: o *músculo liso multiunitário* e o *músculo liso de uma só unidade* (Figura 1). A característica mais importante das fibras do músculo liso multiunitário é que cada fibra pode contrair-se independentemente das outras, e elas são controladas, em grande parte, por sinais neurais, contrastando com o controle predominante nos músculos lisos viscerais, por estímulos não neurais. Alguns exemplos de músculo liso multiunitário são as fibras musculares lisas do músculo ciliar do olho, a íris do olho e os músculos piloerectores (GUYTON; HALL, 2006; AKATA, 2007).

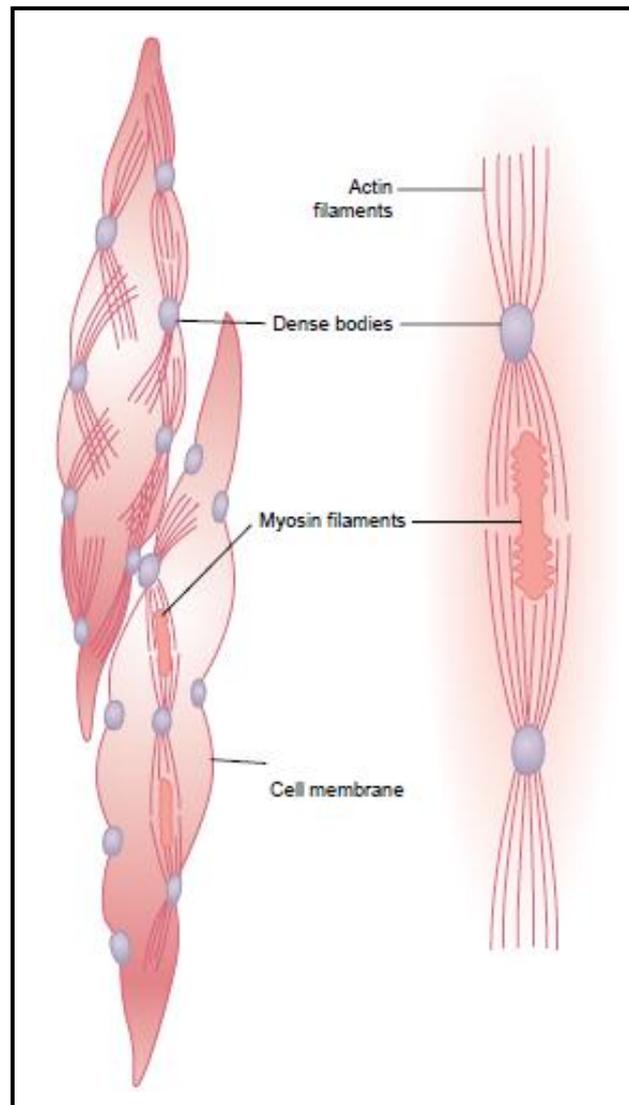


**FIGURA 1** – A: Músculo liso multiunitário. B: Músculo liso unitário (GUYTON; HALL, 2006).

O *músculo liso de uma só unidade* é uma expressão que não significa fibras musculares únicas, mas define uma grande massa de centenas a milhões de fibras musculares que se contraem juntas, como uma só unidade. Essas fibras ocorrem em geral em feixes ou camadas e suas membranas celulares são aderentes entre si, em diversos pontos, de modo que a força gerada por uma fibra muscular pode ser transmitida à seguinte. Além disso, as membranas celulares são unidas por *junções abertas*, o que permite o fluxo de íons de uma célula a outra, de modo que o potencial de ação se propaga de uma fibra para a seguinte, fazendo com que todas as fibras musculares se contraíam a um só tempo. Esse tipo de músculo liso também é chamado de *músculo liso sincicial*, devido às interconexões entre suas fibras. É encontrado na parede da maioria das vísceras do corpo, inclusive no intestino, vias biliares, ureteres, útero e vasos sanguíneos, sendo referido muitas vezes, como *músculo liso visceral* (GUYTON; HALL, 2006; RANG *et al.*, 2007).

O músculo liso contém tanto *filamentos de actina* como de *miosina*, ambos com características químicas semelhantes às dos filamentos de actina e de miosina do músculo esquelético. Todavia, ele não contém troponina, de modo que o mecanismo para o controle da contração é diferente. O processo contrátil é ativado pelos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), enquanto o trifosfato de adenosina (ATP) é degradado a difosfato de adenosina (ADP) para o fornecimento de energia para a contração (HIPÓLITO *et al.*, 2009).

Por meio de microscopia eletrônica, observou-se grande número de filamentos de actina presos aos chamados *corpos densos*. Alguns desses corpos densos estão fixados à membrana celular. Outros ocorrem dispersos no interior da célula e são mantidos em seus lugares por malha de proteínas estruturais que os interconecta. Alguns dos corpos densos fixados à membrana de células adjacentes estão interligados por pontes de proteínas intracelulares. É principalmente por meio dessas interligações que a força da contração é transmitida de uma célula para a seguinte. Espalhados entre os numerosos filamentos de actina existem alguns filamentos de miosina. Esses filamentos de miosina têm diâmetro mais de duas vezes maior que o dos filamentos de actina. Parte dessa diferença é causada pelo fato de que a proporção entre os comprimentos dos filamentos de actina e de miosina, no músculo liso, é bem maior que a encontrada no músculo esquelético (Figura 2) (GUYTON; HALL, 2006; AKATA, 2007).

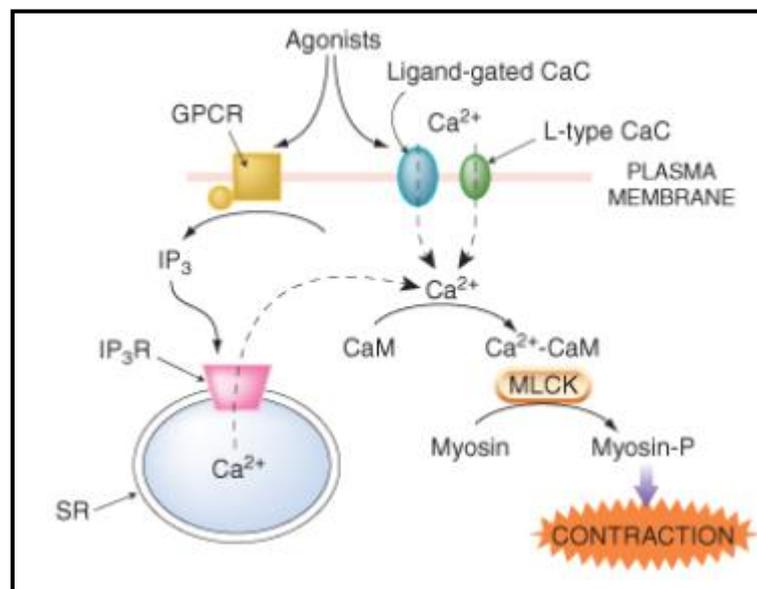


**FIGURA 2** – Estrutura física do músculo liso. Os filamentos de actina irradiam-se dos “corpos densos”. O detalhe à direita da fibra inferior apresenta as interrelações entre os filamentos de miosina e os de actina (GUYTON; HALL, 2006).

O potencial de ação do músculo liso é um evento algo lento e impreciso em comparação com o comportamento do músculo esquelético e cardíaco. Na maioria dos casos, é gerado por canais de cálcio do tipo L, mais do que por canais de sódio regulados por voltagem, constituindo uma importante via de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, muitas células musculares lisas possuem canais de cátions regulados por ligantes, que permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  quando respondem a transmissores. Entre eles, os mais caracterizados são os receptores do tipo  $\text{P}_{2x}$ , que respondem ao ATP liberado dos nervos autonômicos. As células musculares lisas também armazenam  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, a partir do qual pode ser liberado quando o receptor de trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) é ativado por  $\text{IP}_3$ , o qual é

gerado por ativação de muitos tipos de receptores acoplados à proteína G. Em contraste com o músculo esquelético e cardíaco, pode ocorrer liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e contração do músculo liso, quando esses receptores são ativados sem a participação de eventos elétricos e entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática (MILESI *et al.*, 1999; AKATA, 2007; HIPÓLITO *et al.*, 2011).

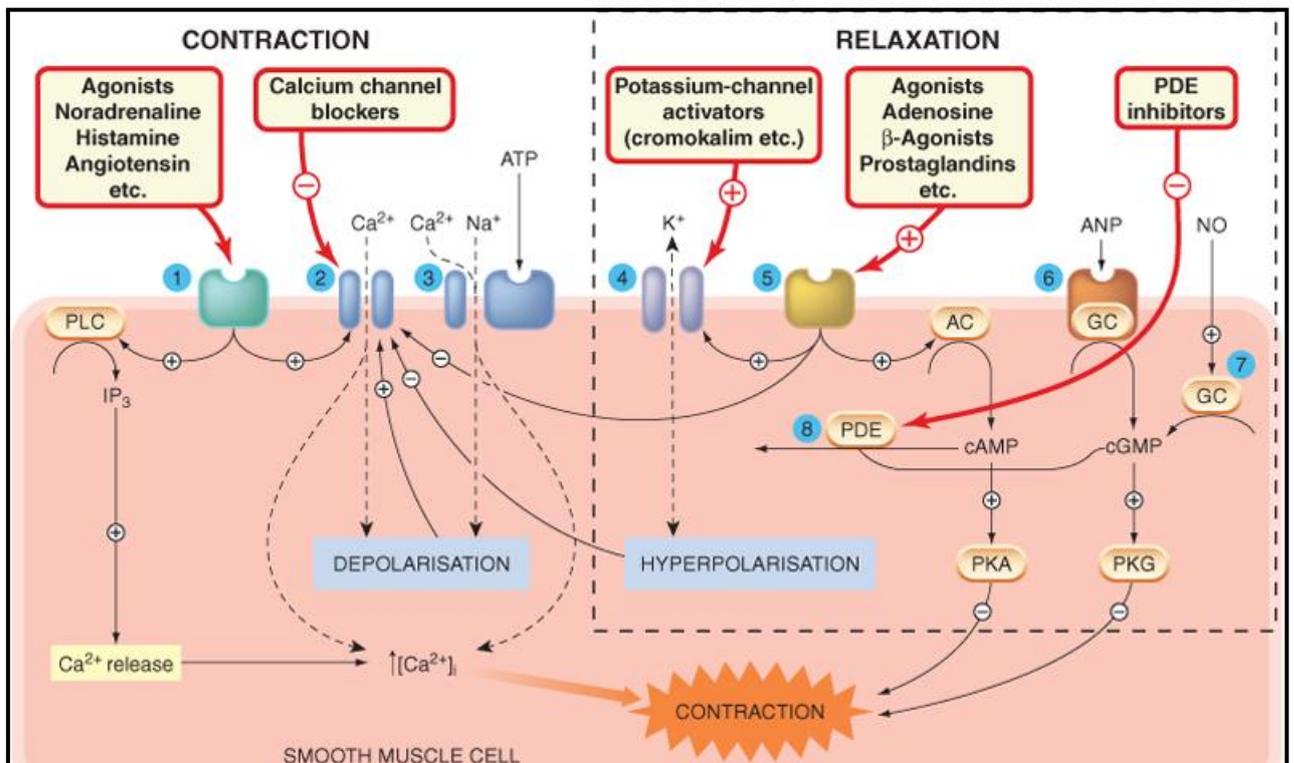
A maquinaria contrátil do músculo liso é ativada quando a cadeia leve de miosina sofre fosforilação, permitindo a sua liberação dos filamentos de actina. Esta fosforilação é catalisada pela *quinase da cadeia leve de miosina* que é ativada ao ligar-se à  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Uma segunda enzima, a *miosina fosfatase*, reverte a fosforilação e provoca relaxamento. Por conseguinte, a atividade da *quinase da cadeia leve de miosina* e da *miosina fosfatase* exerce efeito balanceado, promovendo a contração e o relaxamento, respectivamente. Ambas as enzimas são reguladas por nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), e muitos fármacos que provocam contração ou relaxamento do músculo liso, mediados através de receptores acoplados à proteína G ou através de receptores ligados à guanilato ciclase, atuam dessa maneira (Figura 3) (MILESI *et al.*, 1999; GUYTON; HALL, 2006; RANG *et al.*, 2007).



**FIGURA 3** – Acoplamento excitação-contracção no músculo liso. GPCR: receptor controlado por proteína G;  $\text{IP}_3$ : trifosfato de inositol;  $\text{IP}_3\text{R}$ : Receptor de  $\text{IP}_3$ ; SR: retículo sarcoplasmático; CaM: calmodulina; MLCK: quinase da cadeia leve de miosina (RANG *et al.*, 2007).

A complexidade dos mecanismos de controle e interações explica por que os farmacologistas e outros estudiosos ficaram fascinados com o músculo liso, bem como ainda desenvolvem estudos envolvendo esta temática. Ademais, muitos agentes terapêuticos atuam contraindo ou relaxando o músculo liso, particularmente, os que afetam os sistemas cardiovascular, respiratório e gastrointestinal.

O músculo liso vascular é controlado por mediadores secretados pelos nervos simpáticos e endotélio vascular, bem como por hormônios circulantes. A contração da célula muscular lisa é iniciada por uma elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que ativa a quinase da cadeia leve de miosina, causando fosforilação da miosina, ou pela sensibilização dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  através da inibição da miosina fosfatase (Figura 4) (RANG *et al.*, 2007; MACMILLAN; MCCARRON, 2009).



**FIGURA 4** – Mecanismos de controle da contração e do relaxamento do músculo liso. 1. Receptor acoplado à proteína G para agonistas excitatórios. 2. Canais de cálcio regulados por voltagem. 3. Canais de cátions regulados por ligantes. 4. Canais de potássio. 5. Receptores acoplados à proteína G para agonistas inibitórios. 6. Receptor de peptídeo natriurético atrial. 7. Guanilato ciclase (GC) solúvel ativada pelo óxido nítrico (NO). 8. Fosfodiesterase (PDE). AC: adenilato ciclase; PKA: proteína-quinase A; PKG: proteína-quinase G; PLC: fosfolipase C (RANG *et al.*, 2007).

Os agentes que causam contração podem: liberar o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, secundariamente à formação de  $\text{IP}_3$  mediada por receptores; despolarizar a membrana, permitindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio regulados por voltagem; ou permitir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio operados por receptores. Já os agentes que causam relaxamento podem: inibir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio regulados por voltagem, direta (nifedipina) ou indiretamente por meio de hiperpolarização (ativadores do  $\text{K}^+$ , como a cromacalina); aumentar a concentração intracelular de AMPc e GMPc, pois o AMPc causa inativação da quinase da cadeia leve de miosina e pode facilitar o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; o GMPc opõe-se a aumentos da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por agonistas (Figura 4) (RANG *et al.*, 2007; HIPÓLITO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, um fato de extrema importância para a compreensão do controle vascular foi a descoberta de que o endotélio vascular é uma fonte de mediadores químicos potentes, como os prostanoides, o óxido nítrico, peptídeos, fatores de hiperpolarização derivados do endotélio, entre outros. O endotélio vascular é um revestimento da superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, localizado entre a corrente circulatória e o músculo liso vascular.

A descoberta da prostaglandina  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ), também conhecida como prostaciclina, se deu por Bunting, Gryglewski, Moncada e Vane em 1976. A  $\text{PGI}_2$  relaxa o músculo liso e inibe a agregação plaquetária ao ativar a adenilato-ciclase. As células endoteliais dos microvasos sintetizam  $\text{PGE}_2$ , que é um vasodilatador direto e que também inibe a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas, enquanto carece do efeito da  $\text{PGI}_2$  sobre as plaquetas (RANG *et al.*, 2007).

O fator relaxante derivado do endotélio foi descoberto por Furchgott e Zawadzki em 1980, e identificado subsequentemente como óxido nítrico pelos grupos de Moncada e de Ignarro (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; RANG *et al.*, 2007). O óxido nítrico ativa a guanilato-ciclase, sendo importante nos vasos de resistência em virtude da liberação contínua, produzindo um tônus vasodilatador e contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial. Além disso, inibe a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, a adesão leucocitária, a agregação plaquetária, entre outras ações (MIZUNO; JACOB;

MASON, 2010). Processos fisiológicos e patológicos podem ser mediados pelo óxido nítrico, dependendo de sua origem e concentração (BONAVENTURA *et al.*, 2007). A produção excessiva de óxido nítrico pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão através da formação aumentada de espécies reativas de oxigênio, enquanto níveis normais ou fisiológicos aumentam a vasodilatação e interferem em processos aterotrombóticos (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

Ao que se refere às espécies reativas de oxigênio, são moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com uma alta capacidade oxidativa, sendo as espécies mais conhecidas: o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Sob circunstâncias controladas, a formação de espécies reativas de oxigênio se inicia pela redução incompleta do oxigênio molecular por enzimas que incluem a xantina oxidase (converte xantinas em ácido úrico), óxido nítrico sintase, NADPH oxidase, citocromo P450 e vias mitocondriais (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010). A produção endógena de espécies reativas de oxigênio é controlada por mecanismos anti-oxidantes que limitam sua ação por eliminá-las ou repararem modificações oxidativas potencialmente danosas à célula. Como principais anti-oxidantes enzimáticos temos: a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutathione peroxidase. Como enzimáticos destacam-se: o ácido ascórbico, glutathione, NADPH/NADP<sup>+</sup>, NADH/NAD<sup>+</sup> (ANSELM *et al.*, 2007; ANOZIE *et al.*, 2007; CAMPANA *et al.*, 2009).

O endotélio também secreta peptídeos vasoativos, como o peptídeo C natriurético, que está relacionado ao peptídeo natriurético atrial, e a endotelina que é um potente peptídeo vasoconstritor (RANG *et al.*, 2007).

Em relação ao fator de hiperpolarização derivado do endotélio, a dilatação dependente do endotélio que ocorre em resposta a vários mediadores, como a acetilcolina e bradicinina, pode persistir, a despeito da inibição completa da síntese de prostaglandinas e de NO. Este relaxamento é acompanhado de hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular, que é produzida pelo fator de hiperpolarização derivado do endotélio. Sua identidade química permanece incerta, porém, existem atualmente três candidatos principais que não se excluem totalmente: 1. epoxieicosanóides sintetizados a partir do ácido araquidônico por uma isoforma do citocromo P450; 2. propagação eletrotônica da hiperpolarização do

endotélio para o músculo liso vascular através de junções intercelulares; 3.  $K^+$  liberado do endotélio, que paradoxalmente hiperpolariza o músculo liso vascular ao ativar canais de potássio retificadores de orientação interna (RANG *et al.*, 2007).

O músculo liso vascular tem sido alvo de muitas pesquisas, principalmente, relacionadas à fisiologia e farmacologia cardiovascular, seja para a descoberta de novos medicamentos, como para o aperfeiçoamento dos fármacos que já existem para o tratamento de afecções relacionadas a esse sistema.

## 1.2 Hipertensão arterial sistêmica e abordagens terapêuticas

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (2010), a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), maiores que 140x90 milímetros de mercúrio (mmHg). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais.

São vários os fatores de risco para HAS. A prevalência aumenta com a idade, principalmente, após 65 anos, sendo mais elevada no sexo masculino (CESARINO *et al.*, 2008) e entre indivíduos de cor não branca, no entanto, não se conhece com exatidão, o impacto da miscigenação sobre a HAS no Brasil (SBC, 2010). Está relacionada com excesso de peso desde idades jovens (CAMPANA *et al.*, 2007). O consumo de sódio em excesso tem sido correlacionado com a elevação da PA (HE; MACGREGOR, 2008; STRAZZULO *et al.*, 2009), assim como a ingestão de álcool por períodos prolongados também pode aumentar a PA e a mortalidade cardiovascular (SCHERR *et al.*, 2009). A incidência de HAS e a mortalidade são reduzidas quando se pratica atividade física (PESCATELLO *et al.*, 2004).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, o que a faz ser considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública (TIRAPELLI *et*

*al.*, 2010). No Brasil, as doenças cardiovasculares (DC) têm sido a principal causa de morte. Como exemplo, em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por DC no Sistema Único de Saúde (SUS). Em relação aos custos, em novembro de 2009 houve 91.970 internações por DC, resultando em custo de R\$ 165.461.644,33 (SBC, 2010).

No Brasil a HAS é mais prevalente entre indivíduos com menor escolaridade (CESARINO *et al.*, 2008; CONEN *et al.*, 2009). Ademais, apesar de até o momento não existirem variantes genéticas para predizer o risco individual de se desenvolver HAS, a contribuição de fatores genéticos para a gênese da HAS está bem estabelecida na população (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além de apresentar relação com estilo de vida pouco saudável (SBC, 2010).

As abordagens terapêuticas incluem medidas não medicamentosas e medicamentosas. As mudanças no estilo de vida são recomendadas na prevenção primária da HAS, assim como hábitos saudáveis de vida devem ser adotados desde a infância, respeitando-se as características regionais, culturais, sociais e econômicas dos indivíduos. As principais recomendações incluem: alimentação saudável, com baixo teor de gordura e hipossódica, controle do peso, realização de atividade física, consumo controlado de álcool e combate ao tabagismo (RAINFORTH *et al.*, 2007; SBC, 2010). O tratamento medicamentoso da HAS envolve o uso de fármacos anti-hipertensivos, os quais devem reduzir a PA e os eventos cardiovasculares fatais e não fatais, bem como a taxa de mortalidade.

As classes de anti-hipertensivos disponíveis para uso clínico no Brasil são: diuréticos (tiazídicos, de alça, poupadores de potássio), inibidores adrenérgicos (agonistas  $\alpha_2$ -centrais, bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, bloqueadores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), vasodilatadores diretos (hidralazina, minoxidil), antagonistas dos canais de cálcio (fenilalquilaminas, benzotiazepinas, diidropiridinas), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), inibidor direto da renina (alisquireno) e bloqueadores do receptor de angiotensina II do subtipo 1 (SBC, 2010).

O tratamento deve ser individualizado e a monoterapia deve ser a estratégia anti-hipertensiva inicial, dependendo dos níveis da PA. Se a meta terapêutica não for atendida, as associações de anti-hipertensivos são indicadas,

devendo-se não combinar medicamentos com mecanismos de ação similares (SBC, 2010). Os prescritores devem ter acesso às diretrizes nacionais e internacionais acerca do tratamento da HAS, assim como conhecer os resultados de ensaios clínicos bem conduzidos que referem as melhores associações e tratamentos, os quais foram capazes de reduzir a PA, bem como suas complicações.

No contexto dos anti-hipertensivos, ressaltamos neste trabalho os fármacos antagonistas dos canais de cálcio, acerca dos quais são feitas algumas considerações a seguir.

### **1.3 O cálcio, a farmacologia e os antagonistas dos canais de cálcio**

Os efeitos de fármacos sobre o mecanismo de contração do músculo liso constituem a base de numerosas aplicações terapêuticas, visto que o músculo liso é um importante componente da maioria dos sistemas fisiológicos, incluindo vias respiratórias, trato gastrintestinal e vasos sanguíneos. Ao que se refere ao cálcio, este se trata de um importante eletrólito, principalmente, quando se observa sua participação na homeostase do organismo, de forma que sua concentração no corpo humano varia de 8,5-10,5 mg/dL. É um elemento químico que foi isolado pela primeira vez em 1808, na sua forma impura, pelo químico britânico Humphry Davy. Este fato se deu a partir de uma reação de eletrólise envolvendo amálgama de mercúrio (HgO) e cal (CaO) (MOORE, 1911).

Quando observamos os estudos acerca do cálcio na história da ciência alguns achados relevantes podem ser expostos para um melhor entendimento do que dispomos hoje. Iniciando-se em 1883, o médico fisiologista britânico Sydney Ringer, através de uma observação casual de seus experimentos sobre a função contrátil de corações isolados de sapo, onde substituiu água destilada por água da torneira, constatou o papel do cálcio como regulador importante da função celular, passando então a utilizar em seus experimentos, uma solução acrescida de determinados sais que foi denominada por ele de solução de Ringer (RINGER, 1883; MOORE, 1911).

Em 1901 Stiles descreveu a atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a contração do músculo liso. Enquanto Ebashi e Weber em 1959 postularam que para a ativação da ATPase miofibrilar é necessário  $\text{Ca}^{2+}$ . Ebashi e Kodama em 1965 descobriram a troponina. Em 1968, Endo constatou que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz liberação de mais  $\text{Ca}^{2+}$ . Kariuchi e Yamazaki em 1969 descobriram a calmodulina (STILES, 1901; GODFRAIND; KABA, 1969).

Theophile Godfraind em 1969 percebeu que fármacos como a cinarazina, reduzem a resposta contrátil da artéria mesentérica de coelho, utilizando pela primeira vez o termo “antagonistas dos canais de cálcio” (GODFRAIND; KABA, 1969). No mesmo ano, Fleckenstein também estudava o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo cardíaco, ao mesmo tempo em que testava compostos com ação inotrópica negativa e vasodilatadora coronariana, um protótipo do que viria a ser o verapamil, sintetizado pela indústria Pfizer, inserindo no mesmo ano o conceito de “antagonistas dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ” (FLECKENSTEIN *et al.*, 1969). Em meados de 1976, Sobiezek e Small afirmaram que a fosforilação da cadeia leve de miosina induzia a contração do músculo liso. Berrigge e Irvine em 1984 observaram que o  $\text{IP}_3$  ocasionava a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares (STILES, 1901; GODFRAIND; KABA, 1969).

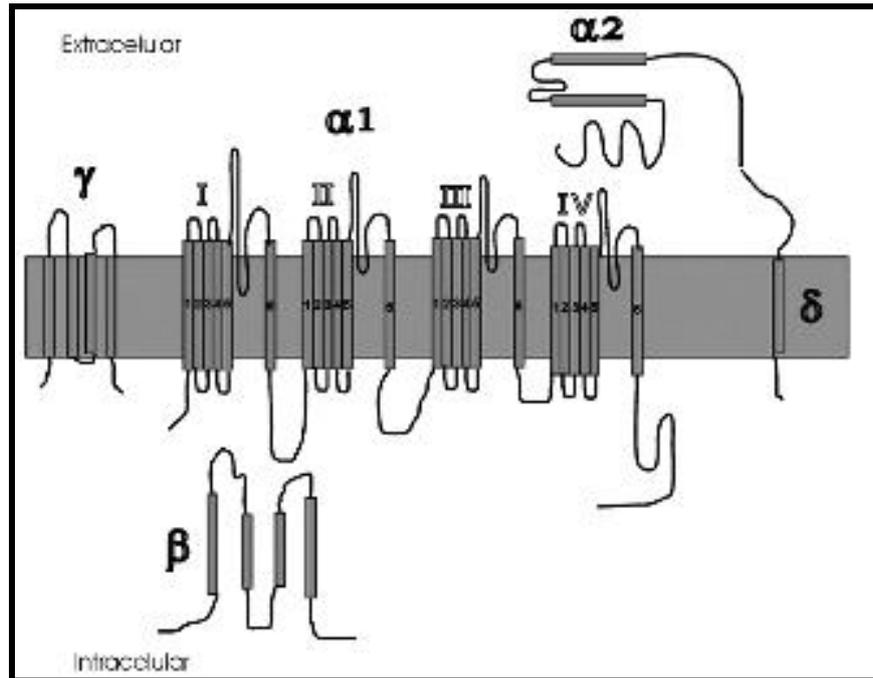
Neste contexto de descobertas, algo que revolucionou os estudos de regulação do cálcio foi o desenvolvimento da microscopia de fluorescência. Ainda mais pela identificação de uma fotoproteína sensível ao cálcio, a qual começou a ser estudada em 1962, por um químico chamado Shimomura, o qual isolou a proteína verde fluorescente da água-viva *Aequoria victoria*, e identificou a estrutura protéica do cromóforo responsável pelo fenômeno da bioluminescência. Este fenômeno ocorria por intermediação da proteína aequorina que, ao se ligar a íons  $\text{Ca}^{2+}$ , emitia luz azul. Esta luz por sua vez, é absorvida pela proteína fluorescente verde (PFV), que fluoresce na região verde. A partir do trabalho de Shimomura, Chalfie incorporou, por manipulação genética, a PFV no DNA da bactéria *Escherischia coli* tornando-a fluorescente. Com o desenvolvimento da técnica de formação de proteínas fundidas com PFV e sua utilização como marcador biológico, Tsien ampliou o campo de utilização destas proteínas fundidas por substituição de vários aminoácidos da cadeia da PFV. Com isto, obteve diversas proteínas que absorvem e

emitem luz em várias outras regiões do espectro (SHIMOMURA; JOHNSON; SAIGA, 1962).

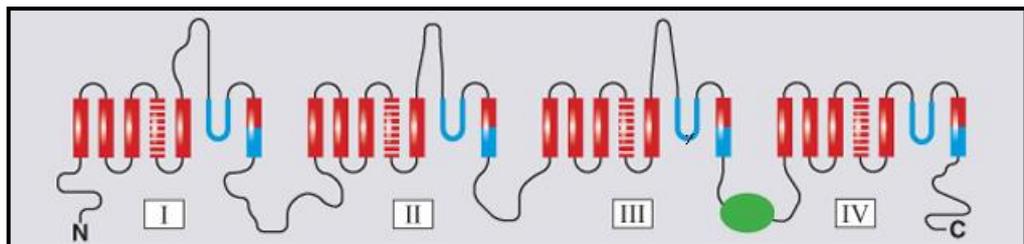
Assim, os cientistas passaram a “colorir” proteínas de modo diferenciado e acompanhar as interações entre elas. Estes três cientistas referidos anteriormente receberam por conta destes estudos o prêmio Nobel em química, em 2008. Todos estes contribuíram para o que dispomos hoje nessa área, que são os marcadores de cálcio Fluo-3 AM amplamente utilizados em microscopia de fluorescência.

Na década de 80, Sakmann e Neher revolucionaram o estudo de canais e mensuração de eventos elétricos da membrana de células por meio do método patch-clamp (KARMAZÍNOVÁ; LACINOVÁ, 2010), uma técnica aperfeiçoada do método voltage-clamp ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), desenvolvida por Hodgkin e Huxley em 1952 (HODGKIN; HUXLEY, 1952; GODFRAIND; KABA, 1969; SAKMANN; NEHER, 1984). De 1985 a 1990, Richard Tsien e colaboradores, utilizando a técnica de patch-clamp, identificaram diferentes correntes de cálcio, que foram denominadas de L, T e N (TSIEN; TSIEN, 1990). A partir de 2000, com as técnicas de biologia molecular, Catterall foi capaz de descrever o canal de cálcio (CATTERALL *et al.* 2000).

O canal tem uma subunidade maior, denominada  $\alpha_1$ , que constitui a principal unidade formadora de poro do canal. Esta possui quatro domínios homólogos (I, II, III e IV), em que cada um é constituído de seis segmentos transmembrana (S1-S6) (MICHEL; HOFFMAN, 2011). A subunidade  $\beta$  é uma proteína localizada no interior da célula, que regula a amplitude da corrente de entrada de cálcio e influencia a corrente de inativação. A subunidade  $\alpha_2\delta$  e  $\beta$  modulam a subunidade  $\alpha_1$ . A subunidade  $\gamma$  é uma proteína plasmática que atua na manutenção do estado de inativação à espera de um potencial mais hiperpolarizado para que ocorra a ativação do canal. Ver Figuras 5 e 6 a seguir:



**FIGURA 5** – Subunidades que constituem o canal de cálcio (CATERRALL, 2002).



**FIGURA 6** – Domínios I, II, III e IV da subunidade  $\alpha 1$  do canal de cálcio e segmentos transmembrana (RANG *et al.*, 2007).

Em 2000, foi proposta uma nova nomenclatura para os canais de cálcio que leva em consideração a classificação filogenética desses canais. A seguir, o Quadro 1 mostra a nomenclatura filogenética do canal, a localização e a função (ERTEL, *et al.*, 2000; CATERRAL, 2002).

Canal	Localização	Função
Ca <sub>v</sub> 1.1	Túbulos Transversos do músculo esquelético	Ativação da excitação-contração
Ca <sub>v</sub> 1.2	Miócitos cardíacos Células endócrinas Células do corpo do neurônio Dendritos proximais	Ativação da excitação-contração Liberação hormonal Regulação da transcrição Integração sináptica
Ca <sub>v</sub> 1.3	Células endócrinas Células do corpo do neurônio Dendritos	Liberação hormonal Regulação da transcrição Integração sináptica
Ca <sub>v</sub> 1.4	Retina	Liberação de neurotransmissor das células bipolares e bastonetes
Ca <sub>v</sub> 2.1	Nervo terminal Dendritos	Liberação de neurotransmissor Estímulos transitórios de Cálcio
Ca <sub>v</sub> 2.2	Nervo terminal Dendritos	Liberação de neurotransmissor Estímulos transitórios de Cálcio
Ca <sub>v</sub> 2.3	Nervo terminal Dendritos	Liberação de neurotransmissor Estímulos transitórios de Cálcio
Ca <sub>v</sub> 3.1	Miócitos cardíacos Corpo e dendritos neuronal	Marcapasso Estímulos repetitivos
Ca <sub>v</sub> 3.2	Miócitos cardíacos Corpo e dendritos neuronal	Marcapasso Estímulos repetitivos
Ca <sub>v</sub> 3.3	Corpo e dendritos neuronal	Marcapasso Estímulos repetitivos

**QUADRO 1** – Classificação filogenética e função dos canais de cálcio (ERTEL, *et al.*, 2000; CATERRAL, 2002).

Quanto aos fármacos antagonistas dos canais de cálcio aprovados para utilização clínica, todos se ligam a subunidade  $\alpha_1$  do canal de cálcio tipo L. Sendo que as fenilalquilaminas ligam-se ao segmento transmembrana 6 do domínio IV. As benzotiazepinas ligam-se a ponte citoplasmática entre o domínio III e o domínio IV. E as diidropiridinas ligam-se ao segmento transmembrana do domínio III e IV (GODFRAIND, 2005). Vale ressaltar que as diidropiridinas têm uma classificação própria, a qual ocorre de acordo com a duração de ação do fármaco (RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001), o que segue apresentado na próxima página (Quadros 2 e 3).

Grupo	Fármacos	Características
Fenilalquilaminas	Verapamil	Relativamente cardiosseletivo
Diidropiridinas	Anlodipino, Felodipino, Isradipino, Nicardipino, Nifedipino, Nimodipino, Nisoldipino	Relativamente seletiva para músculo liso
Benzotiazepinas	Diltiazem	Posição intermediária quanto à seletividade (coração/músculo liso)
Diarilaminopropilamina	Bepridil	Angina

**QUADRO 2** – Classificação atual dos fármacos antagonistas dos canais de  $Ca^{2+}$  (GODFRAIND, 2005).

Grupo	Fármacos	Características
Primeira geração	Nifedipino, Nicardipino	Primeiros fármacos Curta duração de ação
Segunda geração		
II A	Nifedipino, Nicardipino	Formulação de liberação prolongada
II B	Nisoldipino, Nitrendipino, Manidipino	Novas diidropiridinas
Terceira geração	Anlodipino, Lacidipino, Felodipino	Longa duração de ação

**QUADRO 3** – Classificação atual das diidropiridinas (RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001).

Os efeitos dos antagonistas do cálcio sobre o coração incluem: inotropismo e cronotropismo negativo, diminuição da taxa de marca-passo do nodo sinusal, redução da velocidade de condução atrioventricular, tendo como compensação, um aumento do tônus simpático por barorreflexo. Hemodinamicamente relaxam músculo liso arterial, reduzem pressão arterial, com poucos efeitos sobre os leitos venosos. Aumentam a vasodilatação e o fluxo sanguíneo coronariano e causam também relaxamento no trato biliar, vias urinárias e útero (RANG *et al.*, 2007; MIZUNO; JACOB; MASON, 2010; MICHEL; HOFFMAN, 2011).

Quanto à farmacocinética, a maioria destes medicamentos é administrada por via oral, apresentando biodisponibilidade reduzida em função do metabolismo de

primeira passagem hepática, para isso foram feitas formulações de liberação controlada e prolongada. Cerca de 98% se ligam às proteínas plasmáticas e possuem meia-vida de eliminação em torno de 1,3-64 horas. São misturas racêmicas, exceto diltiazem e nifedipino (RANG *et al.*, 2007; MICHEL; HOFFMAN, 2011).

Quanto aos efeitos colaterais, temos que as diidropiridinas ocasionam tontura, hipotensão, cefaléia e edema maleolar. Podem-se observar também, edema periférico e pulmonar, agravamento da insuficiência cardíaca, bloqueio cardíaco, constipação e câibras musculares, principalmente, com o nimodipino. A principal indicação clínica é para hipertensão, principalmente, as diidropiridinas. O verapamil pode ser indicado em arritmias, como fibrilação atrial rápida e taquicardia supraventricular. Outras indicações incluem o uso do nimodipino, que parece ter certa seletividade na vasculatura cerebral, no tratamento de vasoespasmos após acidente vascular encefálico. As contraindicações incluem, a disfunção ventricular, distúrbios de condução do nodo sinoatrial ou atrioventricular, pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg (RANG *et al.*, 2007; MIZUNO; JACOB; MASON, 2010; MICHEL; HOFFMAN, 2011).

#### **1.4 Os fitoterápicos**

A utilização das plantas como fontes de medicamentos para o tratamento de enfermidades que acometem a espécie humana remonta a idade antiga. A terapêutica moderna composta por grande número de medicamentos, talvez não tivesse atingido o grau de desenvolvimento atual sem o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores. São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo a morfina, a pilorcapina, os digitálicos, os curares e a atropina. Além disso, também são de origem natural, vários medicamentos usados no tratamento do câncer (vimblastina, vincristina, taxol), as estatinas usadas no tratamento das dislipidemias, vários

imunossupressores e antibióticos (YUNES; CALIXTO, 2001; TIRAPELLI *et al.*, 2010).

Entretanto, observou-se nas últimas décadas um aumento da comercialização e consumo dos medicamentos fitoterápicos, ocorrendo paralelamente um interesse crescente da indústria farmacêutica por estudos científicos acerca da descoberta de novas substâncias com ação terapêutica a partir dos recursos naturais, bem como a comprovação da eficácia e segurança dos medicamentos fabricados a partir de plantas (TIRAPELLI *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2011).

Os medicamentos fitoterápicos são utilizados pela população de maneira preventiva ou no tratamento de doenças crônicas, como em afecções respiratórias, cardiovasculares, digestivas, intestinais, entre outras. Entretanto, para que um medicamento fitoterápico possa ser registrado em órgão competente, no caso do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), e indicado ou prescrito a um indivíduo, se faz necessário que sua eficácia e segurança sejam comprovadas por meio de estudos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2008).

Devido ao fato de geralmente não possuírem ação terapêutica imediata, os fitoterápicos não são recomendados em situações de emergência, além disso, se comparados aos medicamentos sintéticos, apresentam diferenças importantes. Os fitoterápicos raramente têm seus princípios ativos conhecidos. Ao contrário do que é observado com os medicamentos sintéticos, em que ocorre um controle de qualidade rigoroso. A padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos constituem uma tarefa complexa, embora possível atualmente, em função dos avanços crescentes alcançados nos métodos analíticos de alta resolução, uma vez que estas técnicas permitem o isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em baixas concentrações nas plantas. Quanto à questão financeira, enquanto o desenvolvimento de um novo medicamento sintético envolve vultosas somas de recursos, além de muitos anos de pesquisa, o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico requer menos recursos, além de menor tempo de pesquisa (YUNES; CALIXTO, 2001).

Os fitoterápicos são misturas de constituintes, ao menos em parte delas, sem caracterização química. Postula-se que o fato de serem constituídos de uma mistura de componentes, fornecem vantagem terapêutica, pois estes componentes podem combinar-se entre si de maneira aditiva ou sinérgica, resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido na forma pura. Assim, o desenvolvimento de tecnologia no cultivo, extração, processamento, controle de qualidade e entrega de matéria-prima que acumule, estabilize e aumente a biodisponibilidade dos princípios ativos naturais são de extrema importância no contexto dos fitoterápicos. Na avaliação dos fitoterápicos não é necessário a purificação ou isolamento dos constituintes químicos. A identificação do(s) ingrediente(s) farmacologicamente ativo(s) pode ser alcançada a partir da análise de um ou mais ingrediente(s) supostamente responsável(is) pela atividade da planta, por meio da quantificação de um composto que se apresenta com teor considerável em relação à composição total ou, ainda, pelo perfil cromatográfico dos ingredientes totais (BRASIL, 2008).

Sobre a investigação da ocorrência natural de agentes com ação no sistema cardiovascular, principalmente, que reduzem a pressão arterial, pesquisas afirmam que esta é uma área em expansão e com potencial para descobrimento de moléculas que podem ser utilizadas na formulação de novos fármacos anti-hipertensivos. Neste contexto, a bioprospecção de substâncias ou princípios ativos derivados de espécies vegetais e os estudos pré-clínicos representam a etapa inicial desse processo (MAHMOOD *et al.*, 2010; TIRAPELLI *et al.*, 2010).

No Brasil, devido à grande biodiversidade, várias plantas são utilizadas para fins medicinais. Na região Nordeste, a *Alpinia zerumbet*, também conhecida como “colônia”, “jardineira” e “vindicá”, é amplamente utilizada na medicina popular, nas formas de chás e infusões, para o tratamento de ansiedade e, principalmente, hipertensão (MATOS, 2002). Este fato fez a *Alpinia zerumbet* ter sido largamente estudada quanto as suas propriedades farmacológicas. Segundo Almeida (1993), as propriedades medicinais da espécie estão relacionadas às folhas, flores e rizomas.

### 1.5 *Alpinia zerumbet*

A *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith é uma planta pertencente à família Zingiberaceae, a maior da ordem Zingiberales, constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia (KRESS *et al.*, 2002), expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central (TOMLINSON, 1969). As espécies desta família crescem em *habitats* sombreados ou semi-sombrados, ricos em húmus (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004) e muitas espécies têm valor econômico fornecendo alimentos, perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel (TOMLINSON, 1969).

Trata-se de uma planta herbácea, rizomatosa, com 2 a 3 metros de altura, hastes numerosas, recurvadas, folhas coriáceas e espessas (LORENZI; SOUZA, 1995). 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 lígula desenvolvida (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004) (Figura 7).



**FIGURA 7** – Foto ilustrativa de um espécime de *Alpinia zerumbet*.

Pode ser facilmente multiplicada por plantio dos rizomas. Os rizomas, depois de cortada a parte aérea, são plantados em canteiros de areia. Brotam após alguns dias e as mudas podem ser transplantadas para canteiros preparados com terra e esterco curtidos e desbasta-se a cada seis meses (MATOS, 2002). A *Alpinia zerumbet* é nativa da Ásia Oriental, tendo sido introduzida no Brasil por D. Pedro II que trouxe o primeiro exemplar ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro (MATOS, 2002).

Esta espécie é muito cultivada pela beleza de suas flores. Neste gênero há uma estratégia reprodutiva denominada flexistilia, um mecanismo que favorece a polinização cruzada, evitando-se assim, a autopolinização (BARRET, 2002). A Figura 8 mostra a *Alpinia zerumbet* na época da floração, enquanto a Figura 9 evidencia a estrutura interna da flor.



**FIGURA 8** – Foto ilustrativa da *Alpinia zerumbet* na época da floração.



**FIGURA 9** – Foto ilustrativa da *Alpinia zerumbet*, evidenciando a estrutura interna da flor.

### 1.5.1 Propriedades farmacológicas da *Alpinia zerumbet*

De acordo com Matos (2002), as folhas da *Alpinia zerumbet* contêm óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos, com maior concentração de cineol e terpineol. Entre os componentes fixos do óleo essencial, os mais importantes são alguns flavonóides de ação anti-hipertensiva e kavapironas, princípios de ação ansiolítica. Devido a isso, estudos farmacológicos do extrato aquoso das folhas e do óleo essencial mostraram atividade anti-hipertensiva e levemente tranquilizante ou sedativa. As folhas podem ser utilizadas na forma de chá, recém-preparado, na proporção de uma folha para um 1 litro de água fervente, devendo esse litro de chá ser refrigerado e consumido por um dia. A pressão arterial deve ser monitorizada para controlar o número de folhas utilizadas na preparação do chá, podendo-se utilizar até três folhas (MATOS, 2002).

Mendonça *et al.* (1991) analisaram os efeitos do chá e do extrato hidroalcoólico da *Alpinia zerumbet* em ratos e observaram a ocorrência de excitação do sistema nervoso central, seguida de depressão e hipocinesia. Houve prolongamento do tempo de sono e efeito hipotensor que não era bloqueado por atropina, propranolol e hexametônio. Não foi observado aumento da diurese. O extrato promoveu diminuição da frequência cardíaca e da resposta inotrópica. Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica, observando-se aumento da TGO, TGP, HDL e da contagem de linfócitos, mas de forma geral, não houve toxicidade significativa.

Num estudo realizado com dez voluntários saudáveis foi avaliado o efeito de três plantas conhecidas popularmente como diuréticas: *Elephantopus scaber*, *Alpinia zerumbet* e *Tradescantia diuretica*. Foram administrados agudamente os chás desses produtos naturais e comparados com o placebo (água com baunilha). A dose empregada foi cinco vezes maior que a preconizada popularmente, 7,5 g/100 mL, 0,8 g/100 mL e 25 g/100 mL de água, respectivamente. Foram analisados o sódio, potássio, ácido úrico, cálcio, fósforo, ureia, creatinina e volume urinário. O único parâmetro em que ocorreu diferença estatística significativa foi o volume urinário ( $p < 0,05$ ) após a administração do chá da *Alpinia zerumbet*, que também causou decréscimo na pressão diastólica ( $p < 0,05$ ) e pressão sistólica ( $p < 0,01$ ).

Não foram observadas alterações hidroeletrólíticas e de parâmetros de função renal com os três produtos naturais, o que exclui efeito tubular ou glomerular destas substâncias (LARANJA, BERGAMASCHI, SCHOR, 1992).

Bezerra *et al.* (2000) observaram que contrações induzidas por KCl e acetilcolina no íleo de ratos foram inibidas pelo óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz), o qual proporcionava ação antiespasmódica. Lahlou *et al.* (2003) por meio da utilização de um modelo de hipertensão denominado DOCA-Sal em ratos, investigaram a resposta hipotensiva ao tratamento intravenoso com OEAz e seu principal constituinte majoritário, o terpinen-4-ol. Os resultados mostraram que o OEAz (1-20 mg/kg) e o terpinen-4-ol (1-10 mg/kg) induzem a uma diminuição da pressão aórtica média de forma dose-dependente, provavelmente, devido a um relaxamento do músculo liso. Diante desses achados, os autores atribuem os efeitos encontrados ao maior constituinte do OEAz, o terpinen-4-ol. Na análise da constituição química do OEAz utilizado nesse estudo, duas substâncias foram observadas em quantidades maiores: O terpinen-4-ol (28,09%) e o 1,8-cineol (15,02%).

Lahlou *et al.* (2002a), observaram os efeitos cardiovasculares da administração intravenosa do OEAz e do terpineol-4-ol em ratos. Os resultados demonstraram que o tratamento com o OEAz induziu a uma imediata e dose-dependente diminuição da pressão arterial média, um efeito que pode ser parcialmente atribuído à ação do terpinen-4-ol, sendo que a hipotensão ocorreu independentemente da presença operacional do sistema nervoso simpático, sugerindo que o OEAz pode ser um agente vasodilatador direto.

Em outro estudo, Lahlou *et al.* (2002b), observaram os efeitos cardiovasculares do 1,8-cineol em ratos, constatando-se que o tratamento intravenoso com 1,8-cineol em ratos anestesiados com pentobarbital e conscientes, ocasionava hipotensão muito mais relacionada com relaxamento vascular ativo do que a uma retirada do tônus simpático.

Leal-Cardoso *et al.* (2003), verificaram a ação do OEAz no potencial de ação composto (PAC) do nervo ciático de ratos Wistar. Foi constatado que o OEAz induz a um bloqueio do PAC de forma dose-dependente, sendo a velocidade de

condução reduzida significativamente por 300, 600 e 2000 µg/mL de OEAz, quando comparado aos valores controle.

Araújo *et al.* (2005) através da administração do OEAz a camundongos Swiss por via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, detectaram um efeito antinociceptivo. No teste da placa quente, o OEAz nas doses de 100 e 300 mg/kg aumentou o período de latência. De forma geral, os dados mostraram que a administração oral do OEAz promove um efeito antinociceptivo de forma dose-dependente, sugerindo-se que o mecanismo de ação pode envolver a participação de receptores opioides.

O estudo conduzido por Lin *et al.* (2008) teve por objetivo observar a atividade antioxidante e hipolipidêmica da *Alpinia zerumbet* em hamsters, especialmente na elevação das proteínas de alta densidade (HDL), concluindo-se que o pó das sementes e o óleo essencial são efetivos hipolipidêmicos com capacidade de elevar o HDL. Já Pinto *et al.* (2009), observaram em seus experimentos com aorta isolada de rato que o OEAz induz um potente efeito relaxante que acontece de forma dependente da integridade funcional do endotélio vascular, sugerindo-se o envolvimento do óxido nítrico nesse processo.

Em estudo realizado por Araújo *et al.* (2009), administrou-se a camundongos o OEAz nas doses de 50 e 100 mg/kg por via intraperitoneal. Realizaram-se modelos comportamentais para verificar a atividade locomotora (campo aberto), catalepsia, ansiedade (teste do campo aberto), atividade de catatonia, ansiedade (labirinto em cruz elevado), depressão (teste do nado forçado e suspensão da calda) e avaliação da estereotipia induzida por apomorfina. Constatou-se que o OEAz tem atividade depressiva e possível atividade antipsicótica, uma vez que pode reverter o estereótipo induzido por apomorfina, apresentando efeitos comparáveis com aqueles obtidos com o tratamento pelo haloperidol.

Ademais, os resultados do estudo realizado por Santos *et al.* (2011) em preparações de átrio isolado, indicam que o OEAz diminui a força de contração e a frequência cardíaca, o que possivelmente é devido a uma interferência na entrada de cálcio pelos canais de cálcio tipo L.

### 1.5.2 Óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz)

O uso de óleos essenciais remonta a antigos períodos da história humana (FAHN, 1979), fornecendo ainda hoje o material bruto para indústrias de produtos farmacêuticos, inseticidas, antissépticos, perfumes e condimentos. De forma geral, óleos são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, recebendo essa denominação por serem, na maioria das vezes, líquidos e de aparência oleosa a temperatura ambiente.

Eles têm, geralmente, sabor ácido e picante e quando recentemente extraídos, são incolores ou amarelados. Não são muito estáveis, principalmente, na presença de ar, luz, calor e umidade. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, onde normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Tomlinson (1956) registrou para as Zingiberaceae a presença de células oleíferas de forma isodiamétrica, paredes suberificadas, distribuídas no parênquima fundamental de todos os órgãos estudados e na epiderme da lâmina. Estas fontes oleíferas são, provavelmente, a fonte de muitas substâncias que tornam as espécies de Zingiberaceae comercialmente importantes como plantas aromáticas. Segundo Fahn (1979), as essências ou óleos essenciais, contidas em tais células contêm grande quantidade de terpenos, sendo o grupo mais importante das substâncias secretadas.

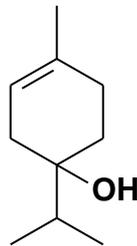
Matos (2002) afirma que o OEAz é rico em mono e sesquiterpenos, com maior concentração de cineol e terpineol. Lahlou *et al.* (2003) afirmam que o óleo essencial representa 0,3% do peso da planta, observando na composição química do óleo essencial utilizado em seu estudo, maiores quantidades de terpinen-4-ol (28,09%) e 1,8-cineol (15,02%).

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo que estes últimos preponderam. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os

monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem, ainda, ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno-10, linalol-11, geraniol-12), monocíclicos (alfa-terpineol 13 e terpinoleno 14) e bicíclicos (alfa-pineno 15, tujona 16, cânfora 17, fenchona 18) (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Na maioria dos estudos que utilizam o OEAz, o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol são as substâncias que se apresentam em maiores quantidades e as quais são atribuídas as propriedades farmacológicas da planta. O terpinen-4-ol é um terpeno volátil de baixa toxicidade, encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, enquanto o 1,8-cineol é um monoterpeneo cíclico, sendo um dos componentes do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (SIMÕES; SPITZER, 1999).

As figuras a seguir, demonstram a estrutura química do terpinen-4-ol (Figura 10) e do 1,8-cineol (Figura 11):



**FIGURA 10** - Estrutura química do Terpinen-4-ol.



**FIGURA 11** - Estrutura química do 1,8-Cineol.

### 1.5.3 Estudos toxicológicos pré-clínicos referentes à *Alpinia zerumbet*

Oliveira (2008) observou diferentes aspectos ao estudar o óleo essencial e o extrato aquoso das folhas da *Alpinia zerumbet*. Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados com células tumorais de várias linhagens, variando entre as mais resistentes às mais sensíveis, como em linfócitos normais de humanos. Todos os resultados foram negativos para uma possível ação citotóxica dos compostos testados. O extrato aquoso e o OEAz não apresentaram atividade hemolítica frente a eritrócitos de camundongos, confirmando que são substâncias com baixo poder tóxico e não desestabilizantes da membrana plasmática.

Para análise da toxicidade aguda, o extrato aquoso foi testado em cinco doses diferentes, 2.000, 2.750, 3.500, 4.250 e 5.000 mg/kg. Entretanto, nenhuma delas mostrou-se tóxica quando administrada unicamente, sendo a dose letal em 50% da amostra (DL<sub>50</sub>) do extrato aquoso liofilizado das folhas da *Alpinia zerumbet* acima de 5000 mg/kg, mostrando-se uma substância com baixa toxicidade aguda (Oliveira, 2008). Os camundongos machos e fêmeas tratados apresentaram piloereção, fotofobia e redução de atividade. No ensaio do cometa e do micronúcleo, o extrato aquoso nas doses de 2.000, 3.500 e 5.000 mg/kg e o OEAz na dose de 400 mg/kg, não apresentaram atividade genotóxica (OLIVEIRA, 2008).

Num estudo de toxicologia aguda, o OEAz nas doses de 30 a 1000 mg/kg, não ocasionou letalidade durante o estudo. Foi observada mortalidade em 60% e 90% dos camundongos machos e fêmeas, respectivamente, tratados com a dose de 5000 mg/kg. Alterações comportamentais indicativas de toxicidade aguda não foram observadas durante os 14 dias de estudo nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, exceto na dose de 5000 mg/kg. Os sinais de toxicidade apresentados por camundongos machos e fêmeas, quando comparado ao grupo controle, foram: resposta ao toque, segurar cauda, reflexo corneal, tônus corporal e aumento da frequência respiratória e cardíaca. O OEAz não causou alteração macroscópica importante no aspecto, cor e tamanho de órgãos e glândulas, como coração, testículo, ovário, tubas uterinas, glândulas salivares e timo quando comparado ao grupo controle. Alterações significantes não foram observadas no peso do pulmão, nódulos linfáticos, rim, fígado, glândulas adrenais, estômago, baço e encéfalo nos

camundongos machos e fêmeas, quando comparado com o grupo controle (Universidade Federal de Santa Catarina, 2008).

Já no estudo de toxicologia crônica, quando avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos, as doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg ocasionaram alguns sinais de toxicidade, principalmente, as doses de 400 e 800 mg/kg, que resultou em 75 e 85% de letalidade em camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Estimou-se que a  $DL_{50}$  do OEAz é de 503 e 448 mg/kg para camundongos machos e fêmeas, respectivamente (Universidade Federal de Santa Catarina, 2008).

Na análise dos órgãos, camundongos machos apresentaram aumento significativo no peso do coração (em doses de 400 mg/kg), pulmão (em doses de 800 mg/kg) e fígado (em doses de 800 mg/kg) e redução do peso do estômago (em doses de 100 mg/kg) e rim (em doses de 100 e 400 mg/kg), quando comparado com o grupo tratado com salina. Camundongos fêmeas tratados com OEAz (100-800 mg/kg) apresentaram diminuição significativa no peso do encéfalo (em doses de 100 mg/kg) e fígado (em doses de 100 mg/kg) e aumento do peso do coração (em doses de 800 mg/kg) e do fígado (em doses de 800 mg/kg) quando comparado ao grupo tratado com salina. Na análise histopatológica observaram-se alterações morfológicas importantes. Em camundongos machos houve alterações no baço (hiperplasia linfonoidal), no fígado (congestão), nódulos linfáticos mesentéricos (hiperplasia linfonoidal), pulmão (hemorragia alveolar) e rim (inflamação crônica). Em camundongos fêmeas, ocorreram alterações no pulmão (hiperplasia linfonoidal) e rim (inflamação crônica) (Universidade Federal de Santa Catarina, 2008).

O tratamento com OEAz (200-800 mg/kg) ocasionou aumento significativo (de forma não dose-dependente) dos níveis de albumina (em todas as doses utilizadas), creatinina (em doses de 400 e 800 mg/kg), sódio (em doses de 100 mg/Kg), potássio (em doses de 100 mg/Kg), aspartato aminotransferase (na dose de 100 mg/Kg), colesterol HDL (nas doses de 100, 400 e 800 mg/kg) e colesterol total (na dose de 400 mg/Kg) quando comparado ao grupo controle com salina. Camundongos machos tratados com OEAz apresentaram redução de leucócitos com a dose de 200 mg/kg, quando comparado ao grupo controle. Os camundongos fêmeas tiveram aumento dos leucócitos (doses de 200, 400 e 800 mg/Kg) e

plaquetas (dose de 800 mg/kg) quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se que a NOAEL (*no observable adverse effect level*) está entre as doses de 100 e 200 mg/kg (Universidade Federal de Santa Catarina, 2008).

## 1.6 Relevância e justificativa

O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilo de vida pouco saudável, como a inatividade física, dieta inadequada, alto consumo de sal, obesidade e tabagismo contribuíram para o aumento da incidência e prevalência das doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertensão, que pode ocasionar complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência renal crônica, dentre outros problemas que interferem diretamente na qualidade de vida dos indivíduos e que requerem custos médicos e econômicos elevados para o tratamento.

Em contrapartida, vivencia-se uma época de conscientização ecológica, na qual algumas pessoas buscam reduzir o impacto sobre a natureza e sobre o próprio organismo, dando-se preferência à adoção de estilos de vida mais saudáveis e a incorporação da medicina tradicional, alternativa e complementar. Este fato gera discussões acerca dos tratamentos conduzidos com produtos naturais, o que sugere uma maior atenção a esta temática. Observa-se o aumento do consumo dos fitoterápicos, na maioria das vezes, com a indicação de que age sobre vários sistemas do organismo, concomitante à crença da população de que as preparações derivadas de plantas são naturais e, portanto, não fazem mal à saúde.

Diante disso, enfatiza-se a importância de estudos pré-clínicos e clínicos acerca das espécies vegetais que já são amplamente utilizadas na medicina popular, assim como das substâncias extraídas dessas plantas. Considerando que um fitoterápico é uma mistura de constituintes, que podem ou não apresentar efeito sinérgico, torna-se importante o conhecimento do que está contido nas preparações utilizadas, seja na forma de infusões, pomadas, xarope, entre outras formulações. Logo, o estudo das propriedades químicas e relacionadas à farmacognosia é

essencial para a qualidade dos produtos naturais que já são, ou que podem vir a ser comercializados.

Ao que se refere à *Alpinia zerumbet*, o óleo essencial, o extrato e o chá das folhas já foram analisados em vários estudos pré-clínicos para análise da toxicidade e ações farmacológicas, sendo identificados efeitos como hipotensão, relaxamento vascular, efeito inotrópico e cronotrópico negativo, efeito antioxidante, hipolipidêmico, antinociceptivo e antiespasmódico, além de prolongamento do tempo de sono. Ressaltando-se que também já foram realizados estudos para análise da toxicidade do chá das folhas da *Alpinia zerumbet* em seres humanos.

Diante do exposto, conhecendo o impacto das doenças cardiovasculares sobre a população em geral e considerando a questão de que o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* vem se mostrando o derivado da planta com atributos farmacológicos mais promissores, e que ainda não foram realizados estudos com as frações do OEAz, faz-se de grande importância a realização de um estudo pré-clínico acerca dos efeitos das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*.

Considera-se esse trabalho de grande magnitude, visto que é o primeiro estudo a analisar as frações do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. Ademais, o uso de plantas medicinais pode vir a ser uma atividade de importância econômica, medicinal e social se utilizadas de forma adequada, com controle de qualidade rigoroso e eficácia comprovada por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos.



---

## OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito farmacológico das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz sobre preparações de aorta isolada de ratos, determinando a concentração ou dose necessária para se produzir 50% da resposta máxima ( $CE_{50}$ ) e a resposta máxima ( $E_{max}$ ) *in vitro*;
- Avaliar o efeito farmacológico da administração por gavagem do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz sobre a pressão arterial sistólica, diastólica e média, e frequência cardíaca de ratos hipertensos por meio do modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico;
- Identificar o possível mecanismo de ação vasorrelaxante da substância testada que mostrou o melhor perfil farmacológico no estudo *in vitro* preliminar e no estudo *in vivo*, utilizando preparações de aorta isolada de rato e inibidores seletivos dos segundos mensageiros envolvidos na via de sinalização, bem como utilizando antagonistas seletivos de vários receptores envolvidos no efeito vasorrelaxante.



---

# PROTOCOLLO EXPERIMENTAL

### 3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Análise fitoquímica

##### 3.1.1 Coleta do material vegetal

O óleo essencial foi produzido a partir das folhas da *Alpinia zerumbet*. As folhas foram coletadas no sítio Vila Nova, localizado no distrito de Ladeira Grande, no município de Maranguape, Ceará, em dezembro de 2009. A localização exata é 3°59'26,49" de latitude sul e 38°42'59,10" de longitude oeste. Uma amostra da planta foi identificada no Herbário Prisco Bezerra, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal do Ceará, estando depositada sob exsicata de número 50312 (Figura 12).



FIGURA 12 - Foto ilustrativa da exsicata de material coletado da *Alpinia zerumbet*.

### 3.1.2 Preparação do material vegetal

#### 3.1.2.1 Óleo essencial da *Alpinia zerumbet*

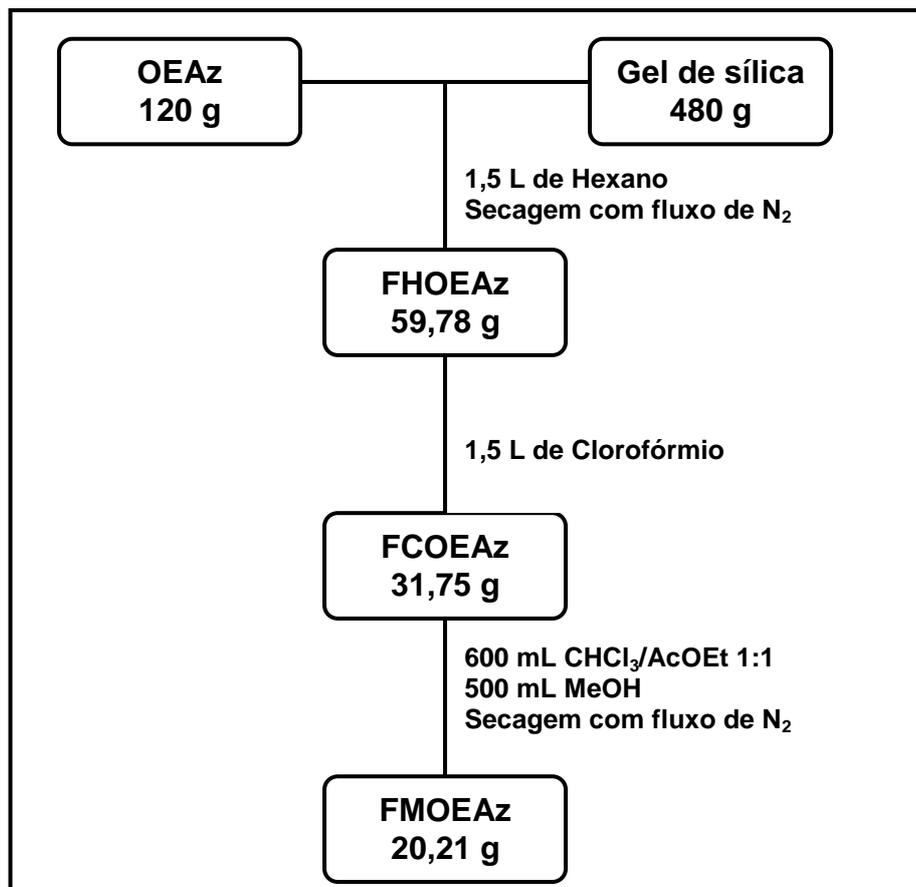
O óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) foi obtido por meio da técnica de destilação de arraste por vapor d'água, a qual geralmente é utilizada para se obter óleos essenciais a partir de folhas.

É o tipo de destilação utilizada para isolar substâncias que se decompõem nas proximidades de seus pontos de ebulição e que são insolúveis em água ou nos seus vapores de arraste. No processo de destilação por arraste a vapor, um ou mais líquidos imiscíveis em água são destilados conjuntamente. Muitas substâncias orgânicas se decompõem quando em temperaturas próximas de seu ponto de ebulição, portanto, a co-destilação com água previne a decomposição, uma vez que a mistura a ser destilada entra em ebulição a uma temperatura inferior ao ponto de ebulição da água. Esse tipo de destilação depende da imiscibilidade entre as substâncias orgânicas e a água. De acordo com a lei de Dalton sobre as pressões parciais dos gases, num sistema contendo vapores imiscíveis, cada componente exerce sua própria pressão de vapor, independentemente 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 a vapor de uma substância razoavelmente volátil será sempre inferior a 100°C. A destilação da maioria das substâncias nesse processo ocorre entre 80-100°C (SIMÕES; SPITZER, 1999).

#### 3.1.2.2 Frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*

Para obtenção das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) do óleo OEAz utilizou-se a técnica de desadsorção seletiva, também conhecida como coluna filtrante.

Foram misturados 120 g de OEAz com 480 g de gel de sílica para coluna, por adição de pequenas quantidades de hexano para facilitar a dispersão. A mistura foi acondicionada sobre uma pequena camada de sílica num funil cilíndrico de 8 cm de diâmetro. A eluição foi iniciada com hexano. Foram obtidas frações de 250 mL, concentradas em série até que nenhum resíduo oleoso permanecesse no balão. Um total de 1,5 L de hexano foi utilizado. Após a secagem com fluxo de N<sub>2</sub> foram obtidos 59,78 g de um óleo amarelo claro denominado fração hexânica do OEAz (FHOEAz). Da mesma forma, a eluição foi continuada com 1,5 L de clorofórmio, fornecendo 31,75 g de um óleo amarelo citrino denominado de fração clorofórmica do OEAz (FCOEAz). Depois da eluição com 600 mL de uma mistura clorofórmio/acetato de etila (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt) 1:1, seguido por 500 mL de metanol (MeOH), as frações foram reunidas, rotaevaporadas e purgadas com N<sub>2</sub> para fornecer 20,21 g de um óleo viscoso amarelo amarronzado designada de fração metanólica do OEAz (FMOEAz). Este processo está esquematizado na Figura 13.



**FIGURA 13** – Fluxograma de obtenção das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz).

Após o processo de obtenção das frações do OEAz, foram obtidas algumas propriedades físico-químicas, como a densidade e o índice de refração, mostrado na tabela a seguir:

**TABELA 1** – Propriedades físico-químicas do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.

<b>Propriedades físico-químicas</b>	<b>OEAz</b>	<b>FHOEAz</b>	<b>FCOEAz</b>	<b>FMOEAz</b>
Densidade (g/mL)	0,88	0,84	0,96	0,93
Índice de refração	1,471	1,468	1,464	1,472

### 3.1.3 Identificação e análise dos constituintes químicos do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz

Para identificação dos constituintes do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa e os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Estes procedimentos foram coordenados pelo Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química da UFC.

A cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa é uma técnica que separa componentes de misturas de compostos voláteis (SIMÕES; SPITZER, 1999; ADAMS, 2007). Dessa forma, para cada substância em estudo foram identificados os constituintes e valores percentuais, o tempo de retenção (tR), o logaritmo do tempo de retenção (log tR), o índice de Kovats (IK) e o índice aritmético (IA).

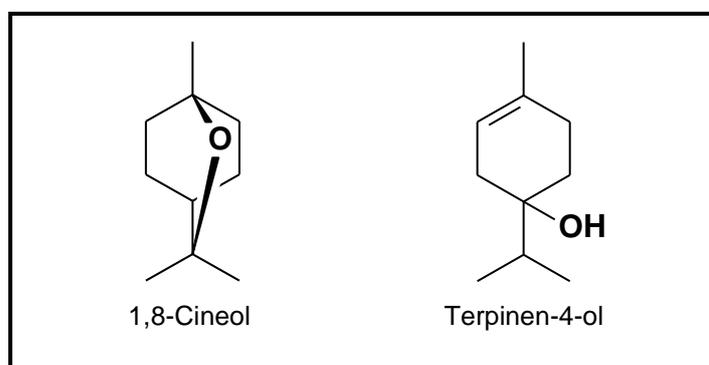
A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma forma de espectrometria de absorção, semelhante à espectrometria de infravermelho ou ultravioleta. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência, em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências de picos de absorção contra suas intensidades. Dessa forma, podem-se identificar compostos orgânicos de uma amostra. Os picos de absorção representam os hidrogênios em diferentes ambientes químicos, sendo a

área de cada pico proporcional ao número de hidrogênios a que corresponde. Os dados obtidos com este método são importantes para a elucidação estrutural das moléculas analisadas (SIMÕES; SPITZER, 1999). Foram obtidos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do OEAz e de suas frações hexânica, clorofórmica e metanólica.

Ao que se refere ao OEAz, a Tabela 2 mostra os componentes químicos identificados. Destes, houve dois componentes majoritários, a saber: 1,8-cineol (24,61%) e o terpinen-4-ol (25,70%), os quais estão representados na Figura 14. A RMN  $^1\text{H}$  está representada na Figura 15.

**TABELA 2** – Constituintes químicos do OEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.

Constituintes do OEAz	tR	log tR	IK	IA	%
$\alpha$ -tujeno	8,052	7,992	930	924	4,49
$\alpha$ -pineno	8,268	8,108	939	932	1,72
sabineno	9,607	9,525	975	969	10,99
$\beta$ -pineno	9,711	9,658	979	974	2,82
$\alpha$ -terpineno	11,128	11,058	1017	1014	2,89
<i>p</i> -cimeno	11,381	11,300	1032	1013	5,88
<b>1,8-cineol</b>	<b>11,667</b>	<b>11,500</b>	<b>1031</b>	<b>1026</b>	<b>24,61</b>
$\gamma$ -terpineno	12,713	12,608	1059	1054	14,28
terpinoleno	13,781	13,725	1088	1086	1,50
linalol	14,172	14,142	1096	1095	1,05
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>17,147</b>	<b>16,992</b>	<b>1177</b>	<b>1174</b>	<b>25,70</b>
$\alpha$ -terpineol	17,544	17,492	1188	1186	1,21
<i>trans</i> -cariofileno	25,755	25,692	1419	1417	1,71
óxido de cariofileno	30,898	30,833	1583	1582	1,14



**FIGURA 14** – Estruturas químicas dos componentes majoritários do OEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.

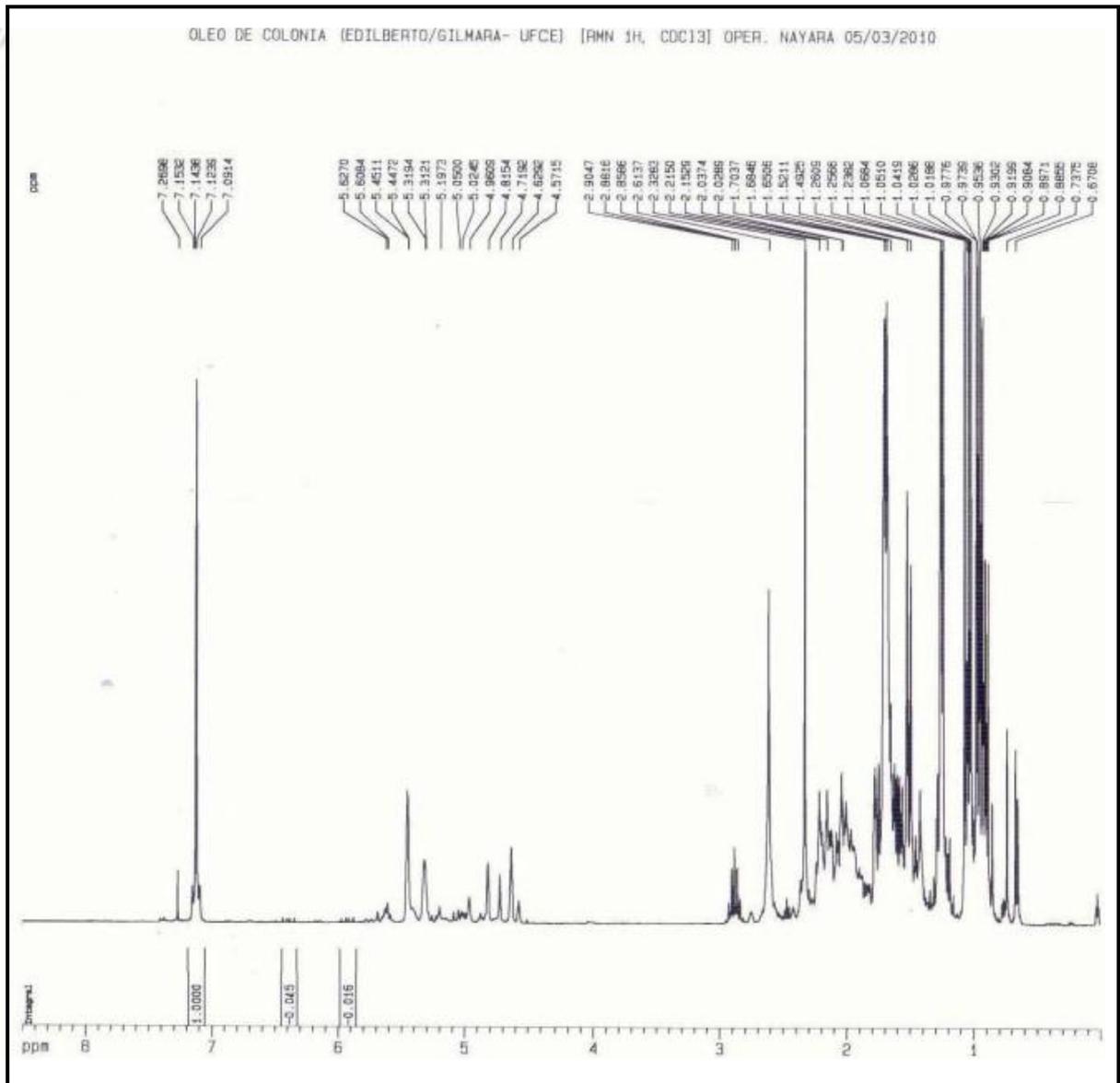
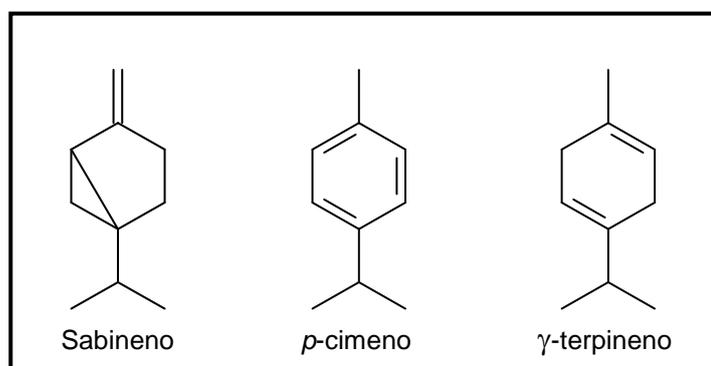


FIGURA 15 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do OEAz.

Os constituintes da FHOEAz estão expressos na Tabela 3, em que os majoritários foram o sabineno (16,69%), o *p*-cimeno (31,46%) e o  $\gamma$ -terpineno (19,02%), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 16. A RMN  $^1\text{H}$  referente a FHOEAz está representada na Figura 17.

**TABELA 3** – Constituintes químicos da FHOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.

Constituintes da FHOEAz	tR	log tR	IK	IA	%
$\alpha$ -tujeno	3,973	0,599	930	924	6,85
$\alpha$ -pineno	4,129	0,616	939	932	3,53
canfeno	4,445	0,648	954	946	0,45
<b>sabineno</b>	<b>4,831</b>	<b>0,684</b>	<b>975</b>	<b>969</b>	<b>16,69</b>
$\beta$ -pineno	4,967	0,696	979	974	6,54
mirceno	5,099	0,707	990	988	0,88
decano	5,311	0,725	1000	1000	0,08
felandreno	5,539	0,743	1014	994	0,18
$\alpha$ -terpineno	5,762	0,761	1017	1014	2,61
<b><i>p</i>-cimeno</b>	<b>5,938</b>	<b>0,774</b>	<b>1032</b>	<b>1013</b>	<b>31,46</b>
limoneno	6,048	0,782	1029	1024	4,66
1,8-cineol	6,138	0,788	1031	1026	2,66
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	<b>6,739</b>	<b>0,829</b>	<b>1059</b>	<b>1054</b>	<b>19,02</b>
$\alpha$ -terpinoleno	7,459	0,873	1088	1086	1,25
<i>trans</i> -cariofileno	17,556	1,244	1419	1417	2,47
$\alpha$ -cariofileno	18,644	1,271	1458	1456	0,29
$\gamma$ -cadineno	20,358	1,309	1513	1513	0,25



**FIGURA 16** – Estruturas químicas dos componentes majoritários da FHOEAz: Sabineno, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno.

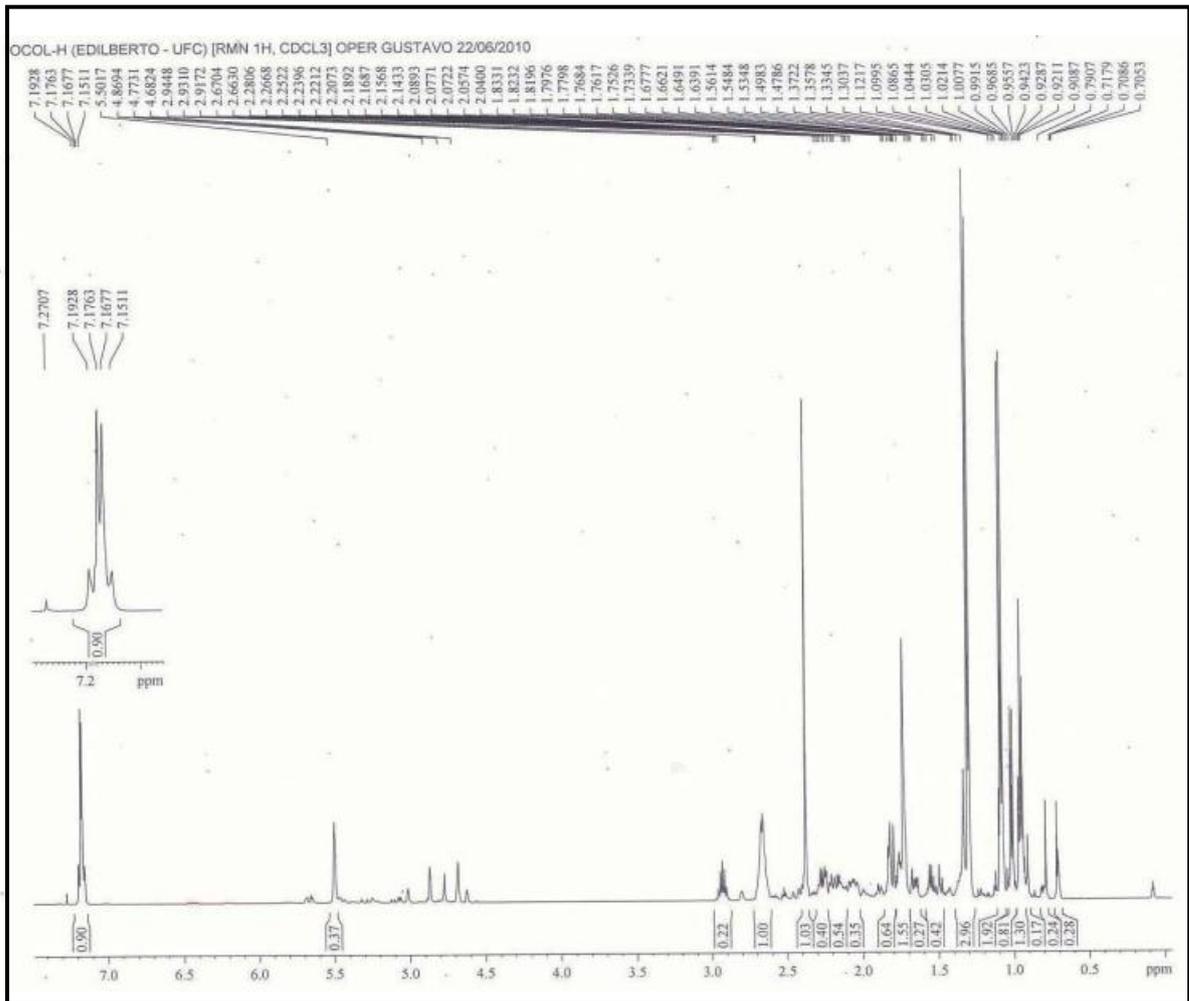
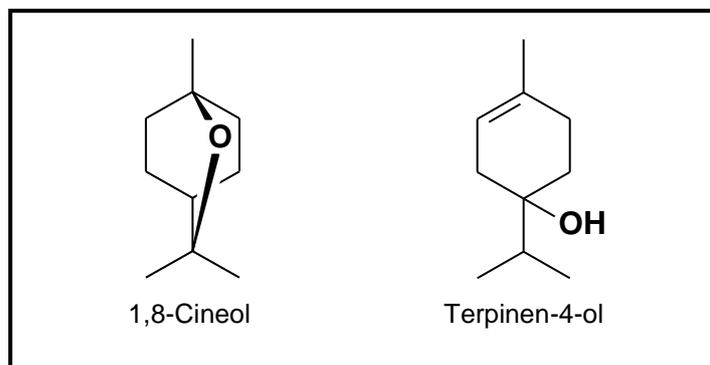


FIGURA 17 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) da FHOEAz.

A FCOEAz teve como componentes majoritários o 1,8-cineol (58,92%) e o terpinen-4-ol (35,53%). Todos os constituintes desta fração estão indicados na Tabela 4 e, em seguida, encontram-se as estruturas químicas dos compostos majoritários (Figura 18) e a RMN  $^1\text{H}$  (Figura 19).

**TABELA 4** – Constituintes químicos da FCOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.

Constituintes da FCOEAz	tR	log tR	IK	IA	%
<b>1,8-cineol</b>	<b>6,282</b>	<b>0,798</b>	<b>1031</b>	<b>1026</b>	<b>58,92</b>
4-tujanol	7,211	0,858	1080	1073	0,37
linalol	7,948	0,900	1096	1095	0,36
<i>trans</i> -p-menth-2-em-1-ol	8,708	0,940	1135	1131	0,31
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>10,344</b>	<b>1,015</b>	<b>1177</b>	<b>1174</b>	<b>35,53</b>
$\alpha$ -terpineol	10,798	1,033	1188	1186	0,71
acetato de bornila	13,491	1,130	1288	1287	0,49
óxido de cariofileno	22,488	1,352	1583	1582	2,87



**FIGURA 18** – Estruturas químicas dos componentes majoritários da FCOEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.

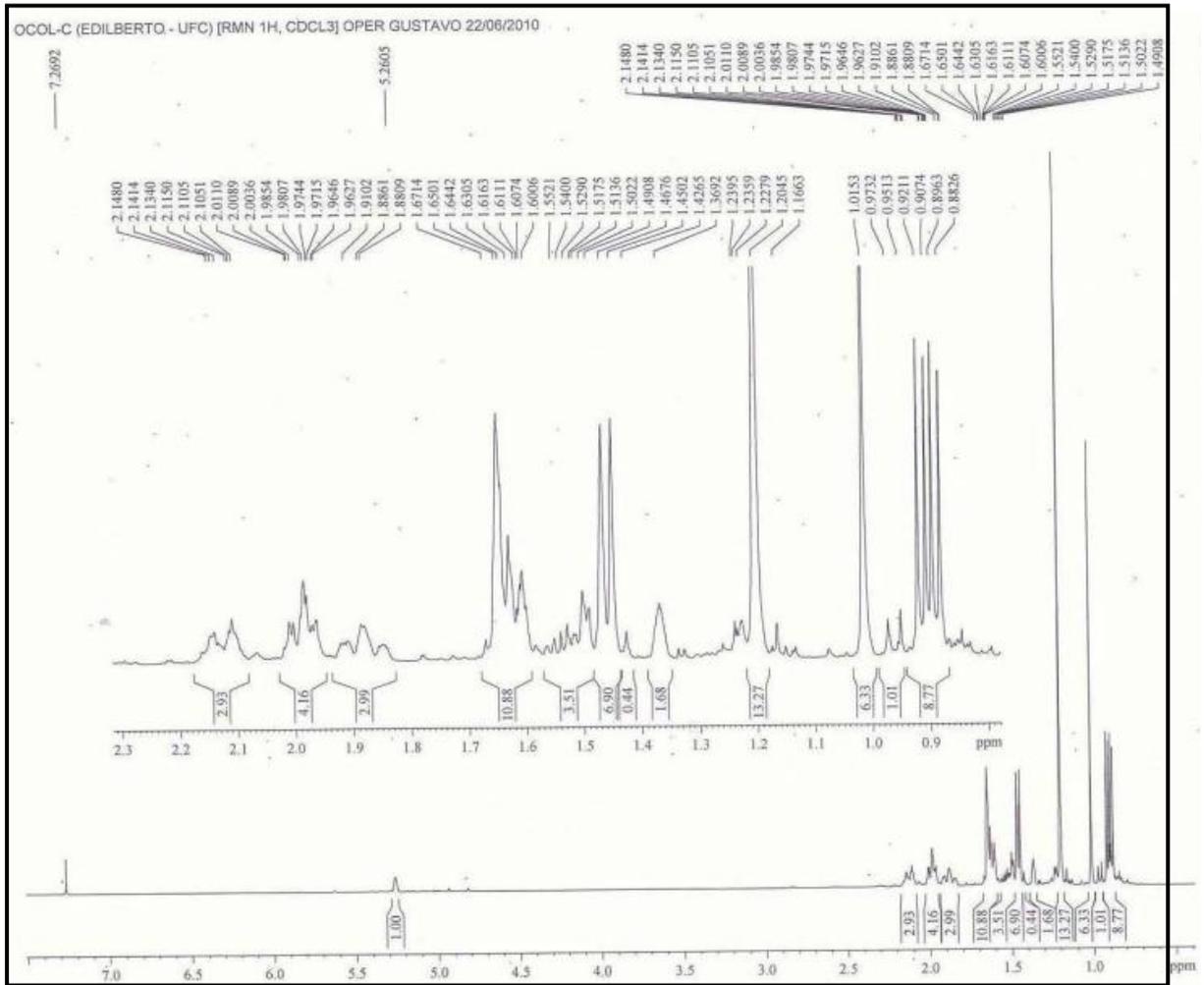
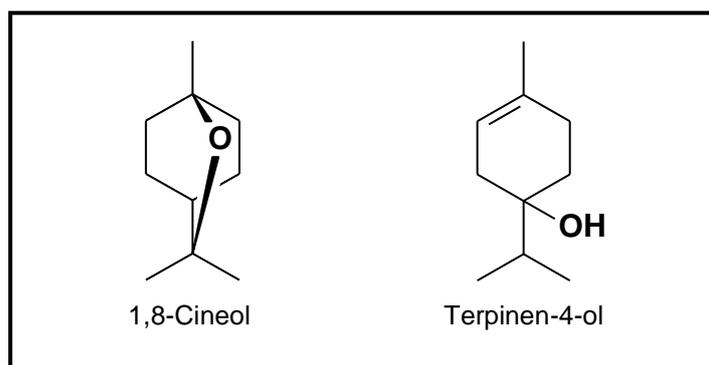


FIGURA 19 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) da FCOEAz.

Acerca da FMOEAz, esta teve como componentes majoritários o 1,8-cineol (27,81%) e o terpinen-4-ol (57,35%). Todos os constituintes desta fração estão indicados na Tabela 5, e em seguida encontram-se as estruturas químicas dos compostos majoritários (Figura 20) e a RMN  $^1\text{H}$  (Figura 21).

**TABELA 5** – Constituintes químicos da FMOEAz identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa.

Constituintes da FMOEAz	tR	log tR	IK	IA	%
<b>1,8-cineol</b>	<b>6,295</b>	<b>0,799</b>	<b>1031</b>	<b>1026</b>	<b>27,81</b>
4-tujanol	7,224	0,859	1080	1073	1,64
linalol	7,957	0,901	1096	1095	1,48
<i>Cis</i> -b-terpineol	8,055	0,906	1144	1140	2,14
<i>Cis</i> -p-menth-2-em-1-ol	8,723	0,941	1121	1118	1,77
<i>trans</i> -p-menth-2-em-1-ol	9,234	0,965	1140	1136	1,47
acetato de bornila	10,067	1,003	1288	1287	0,29
borneol	10,132	1,006	1169	1165	0,31
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>10,39</b>	<b>1,017</b>	<b>1177</b>	<b>1174</b>	<b>57,35</b>
<i>p</i> -cimen-8-ol	10,6	1,025	1197	1196	0,08
$\alpha$ -terpineol	10,815	1,034	1188	1186	3,82
<i>trans</i> -piperitol= <i>p</i> -menth-1-em-3-ol	11,237	1,051	1219	1217	0,38
acetato de bornila	13,536	1,131	1288	1287	0,05
óxido de cariofileno	22,526	1,353	1583	1582	1,00
$\beta$ -eudesmol	24,579	1,391	1650	1649	0,4



**FIGURA 20** – Estruturas químicas dos componentes majoritários da FMOEAz: 1,8-Cineol e Terpinen-4-ol.

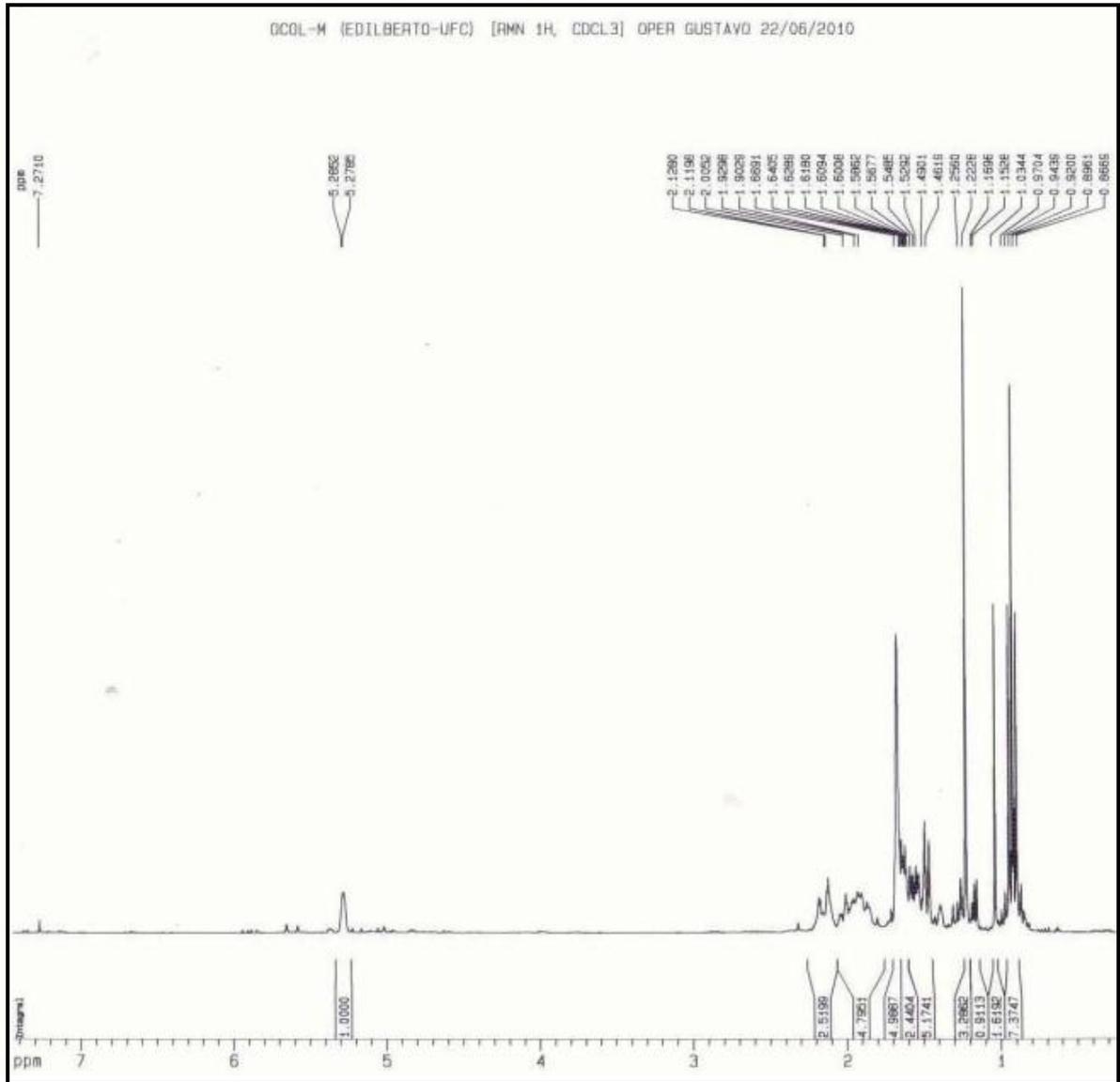


FIGURA 21 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) da FMOEAz.

### 3.2 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC), situada à rua Coronel Nunes de Melo, 1127, em Fortaleza-Ceará, a qual possui a infra-estrutura necessária para realização dos experimentos.



**FIGURA 22** – Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) e Laboratório de Farmacologia Pré-clínica.

### 3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos. Para os experimentos *in vitro* utilizaram-se animais com idade entre 8 a 10 semanas, pesando de 230 a 280 gramas. Para os experimentos *in vivo*, a idade para início do estudo variou de 10 a 12 semanas e o peso entre 250 e 330 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os ratos ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h), a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas convencionais de polipropileno com tampa de metal, com divisórias para ração e água. Cada gaiola continha quatro ratos, aos quais eram fornecidos ração e água *ad libitum*.



**FIGURA 23** – Rato Wistar macho. Fonte://www.eticaanimal.ufc.br/paginas/principios.html

### 3.4 Aspectos éticos

Os projetos de pesquisa, intitulados de “**Estudo do efeito anti-hipertensivo do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* em ratos hipertensos**” e o “**Efeito das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo***” foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), um órgão normativo e educativo, vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, que tem como objetivo estabelecer normas para a utilização de animais experimentais em projetos de pesquisa com base nos princípios éticos de cuidados animais preconizados internacionalmente. Os números dos protocolos de aprovação foram, respectivamente, nº 55/10 (ANEXO A) e nº 18/2011 (ANEXO B).

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 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.5 Experimentos

Esta tese compreende três etapas realizadas na seguinte ordem:

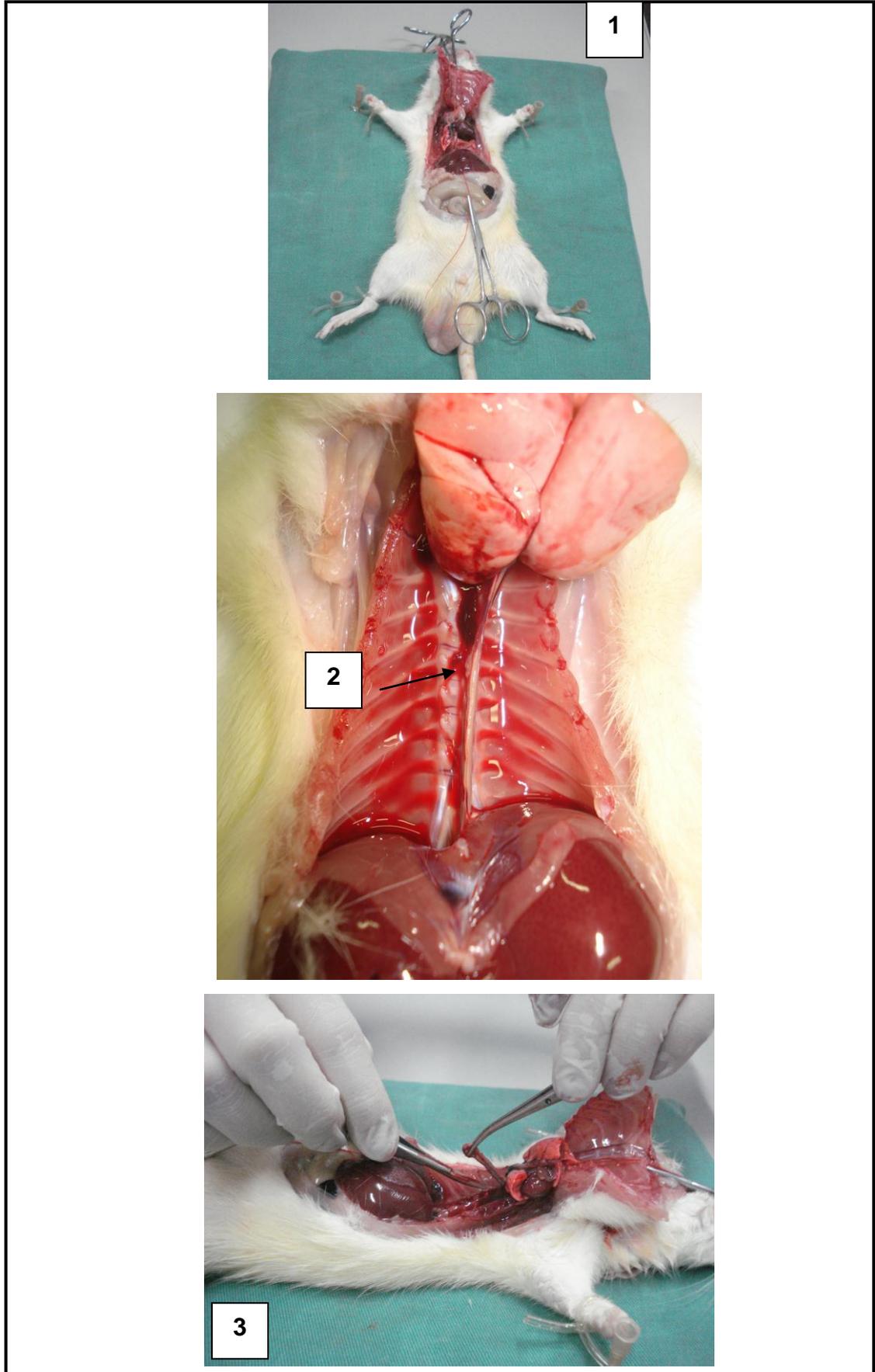
1. Estudo *in vitro* preliminar ou inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina;
2. Estudo *in vivo*: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz;
3. Aplicação de protocolos específicos *in vitro* para caracterização do possível mecanismo de ação da substância que mostrou melhor perfil farmacológico no estudo *in vitro* preliminar ou inicial e no estudo *in vivo*.

### 3.5.1 Procedimentos para realização dos estudos *in vitro*

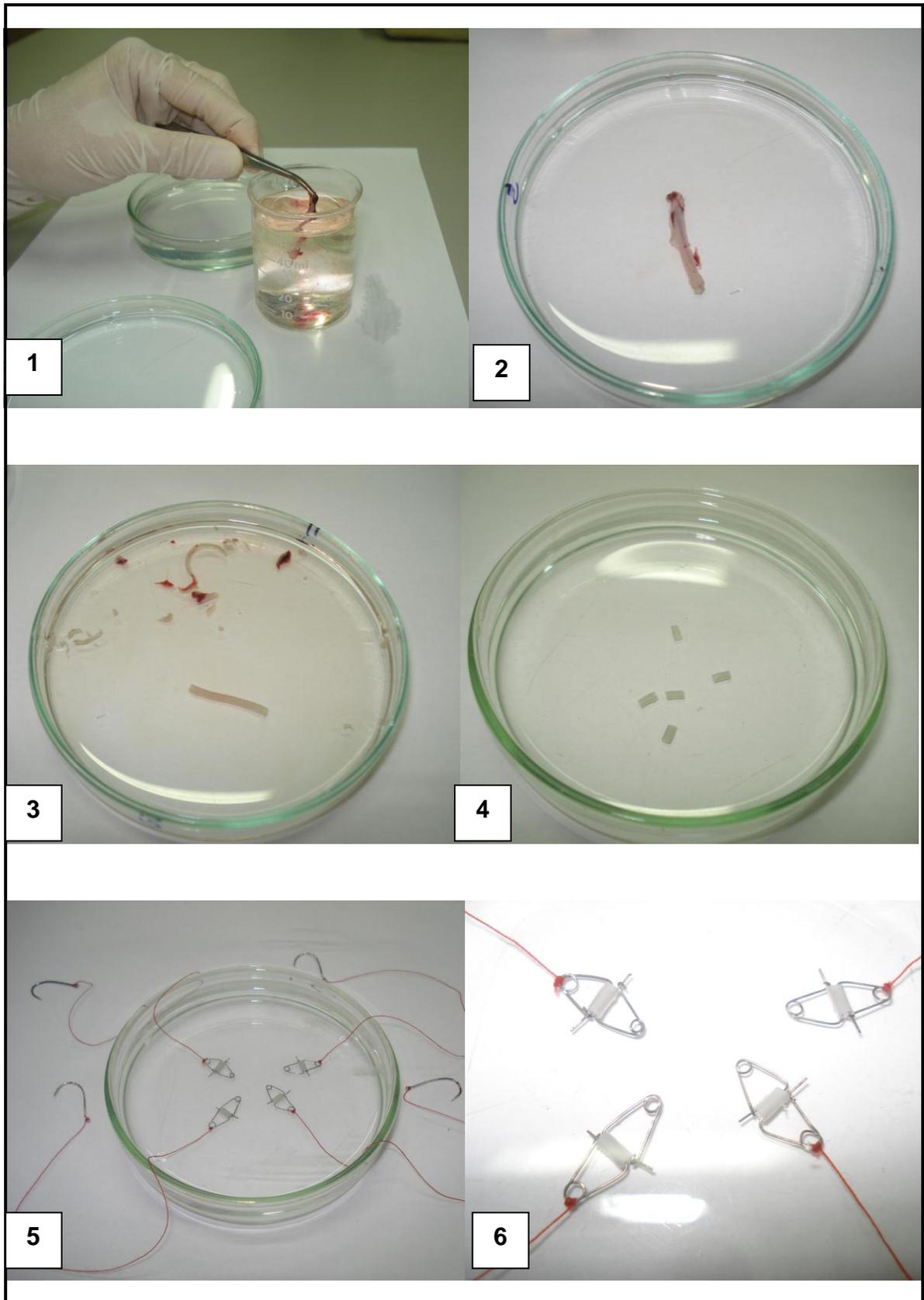
O estudo *in vitro* foi o experimento de tensão isométrica, utilizando-se a artéria aorta de rato no banho de órgãos isolado. Os animais foram sacrificados pela técnica de deslocamento cervical. Esse método é indicado quando não puderem ser utilizados métodos químicos, que possam interferir nos resultados do experimento. O deslocamento cervical consiste em segurar a cauda do animal com uma das mãos (pela base) e com a outra apoiar uma pinça cirúrgica, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical. Pressiona-se a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto que simultaneamente, traciona-se a cauda em sentido oposto, para trás (BRASIL, 2005).

Após ser sacrificado, o animal foi disposto em decúbito dorsal e suas patas dianteiras e traseiras foram imobilizadas, de forma a expor toda a extensão do tórax e abdômen. Com uma tesoura, foram separados os planos dérmicos e musculares a partir do nível da porção distal do esterno até o segundo espaço intercostal. Fez-se então uma incisão no gradil costal direito e esquerdo em toda a sua extensão, na face anterior do tórax, do nível do diafragma até o segundo espaço intercostal, de forma a rebater o gradil costal na direção cefálica. Uma vez expostos os órgãos torácicos, a veia cava inferior foi mobilizada com uma linha de algodão em sua extensão proximal e distal, sendo seccionada medialmente e rebatida na direção cefálica. Dessa forma, expôs-se a artéria aorta do animal, a qual foi seccionada com uma tesoura, e dissecada em toda a sua extensão até a crossa aórtica (Figura 24).

O fragmento de aorta torácica retirado foi mantido em solução de Krebs-Henseleit para retirada de tecido conectivo. Durante o processo evitou-se lesar ou tracionar a aorta. Após a limpeza, a artéria foi seccionada em anéis de 4 milímetros (mm) de comprimento, descartando-se os anéis oriundos das extremidades do vaso. Cada anel de aorta foi colocado em cliques triangulares conectados por um fio de algodão não elástico a um gancho produzido a partir de um alfinete (Figura 25). A solução de Krebs-Henseleit apresentava a seguinte composição (mmol/L): NaCl: 118,0; KCl: 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 1,2;  $\text{NaHCO}_3$ : 15,0;  $\text{CaCl}_2$ : 2,5 e Glicose: 5,5 (HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Também foi utilizada uma solução de Krebs-Henseleit isenta de cálcio (sem  $\text{CaCl}_2$ ). O pH de todas as soluções foi ajustado a 7,4 com ácido acético.

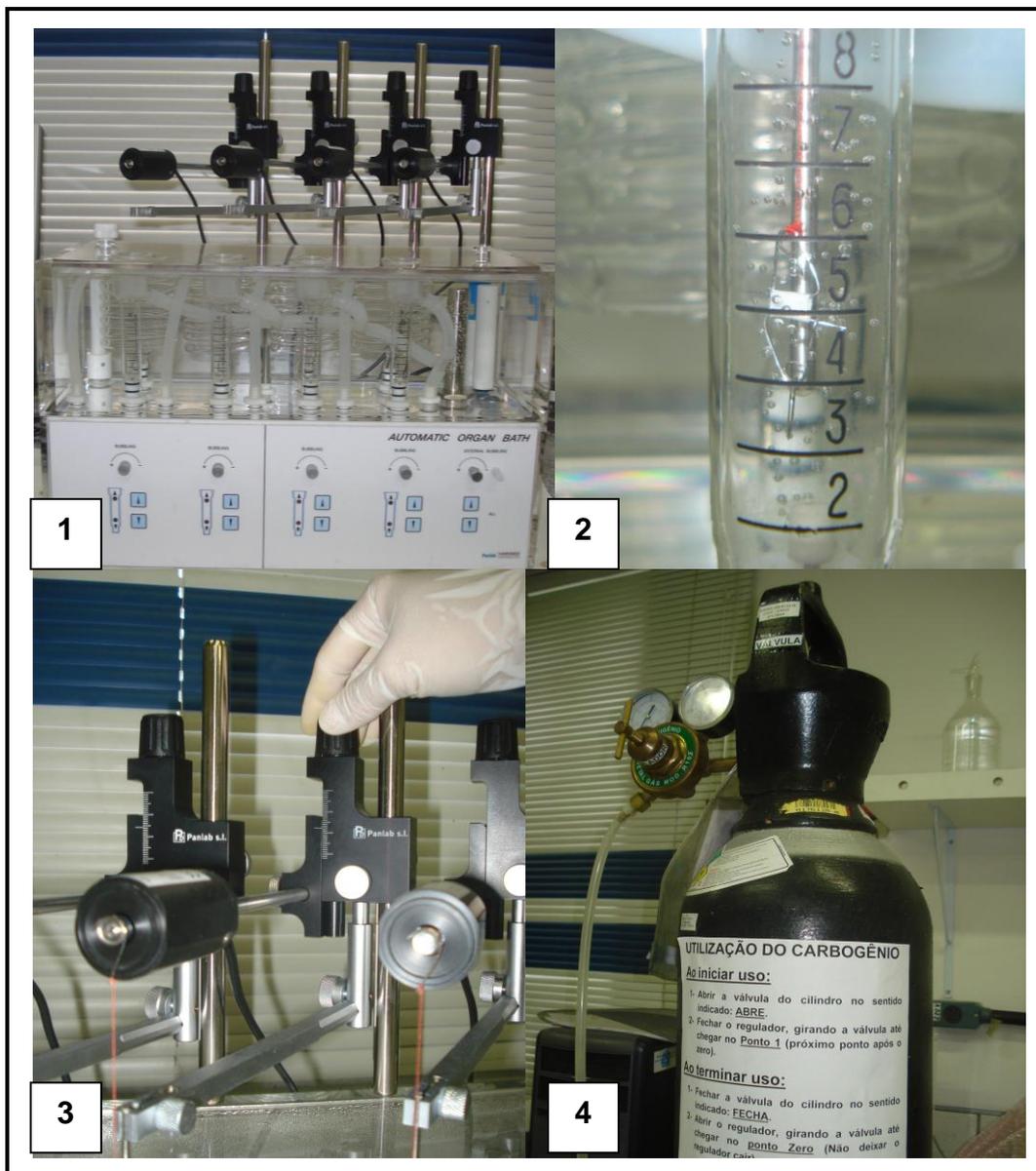


**FIGURA 24** – Procedimento para retirar aorta torácica do rato. 1: Animal em decúbito dorsal com exposição de órgãos. 2: Aorta. 3: Retirada da aorta torácica.



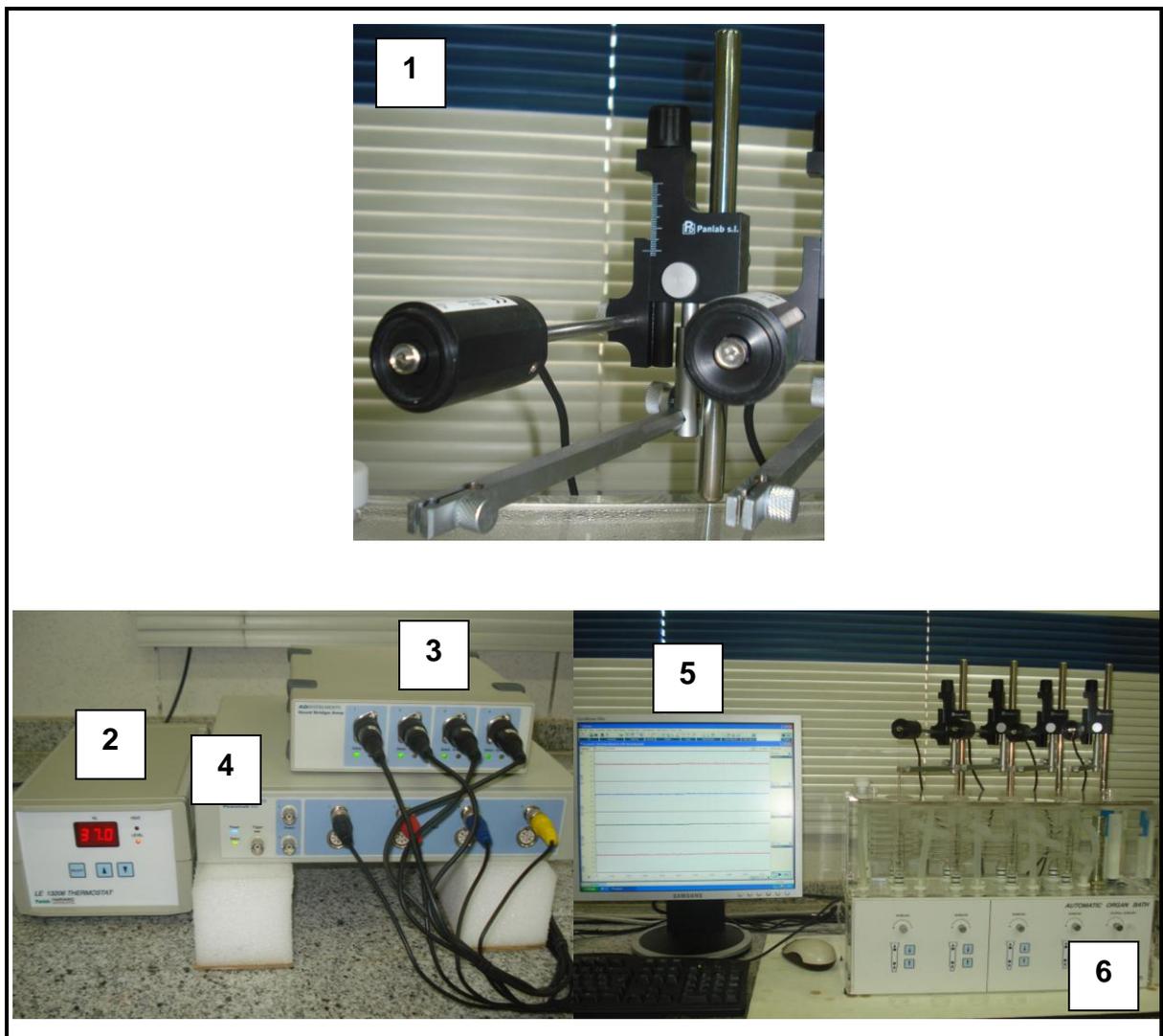
**FIGURA 25** – Preparação dos anéis de aorta para experimento de reatividade vascular. 1 e 2: Lavagem da aorta torácica em solução de Krebs-Henseleit. 3 e 4: Retirada do tecido conectivo e secção da aorta em anéis. 5 e 6: Colocação dos anéis aórticos em cliques metálicos.

Os quatro fragmentos de aorta foram levados ao banho de órgãos e colocados em cubas orgânicas. O aparelho de banho de órgãos contém quatro cubas de 10 mL, imersas em água destilada e mantidas a 37°C. Estas cubas são preenchidas com solução de Krebs-Henseleit e aeradas com carbogênio, uma mistura gasosa que contém 95% de Oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Os fragmentos de aorta foram posicionados nas cubas, com uma das extremidades fixada a uma haste metálica e a outra conectada a um sensor por um fio de algodão (Figura 26).



**FIGURA 26** – Experimento de reatividade vascular. 1: Banho de órgãos. 2: Cubas de 10 mL contendo anel aórtico aerado por carbogênio. 3: Ajuste da tensão do fio de algodão. 4: Cilindro de carbogênio.

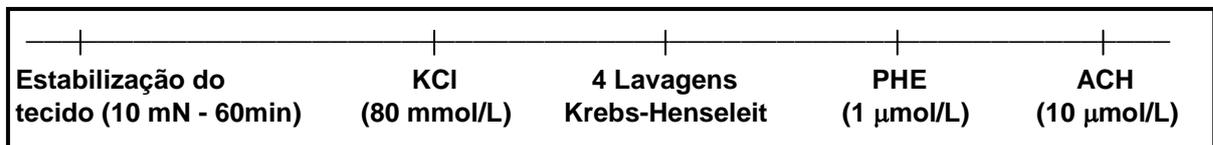
A tensão isométrica dos experimentos foi mensurada por um transdutor de tensão (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Spain), cujo sinal foi amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) e transmitido a um conversor analógico-digital (Power Lab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia), que por sua vez foi enviado para o computador para registro temporal da tensão pelo software de aquisição e processamento de sinais (LabChart 7.2 for Windows, ADInstruments, Australia) (Figura 27).



**FIGURA 27** – Equipamentos utilizados no experimento de reatividade vascular. 1: Sensor de tensão. 2: Termostato para controle de temperatura. 3: Amplificador de sinais. 4: Conversor analógico-digital. 5: Software para registro temporal da tensão. 6: Banho de órgãos.

Depois de colocados no aparelho de banho de órgãos, nos 60 minutos iniciais realizou-se a estabilização do tecido, ajustando-se periodicamente a tensão basal aplicada aos fragmentos de aorta a 10 miliNewtons (mN) ou 1 grama (HIPÓLITO *et al.*, 2009). Nesse período, a solução de Krebs das cubas foi renovada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização, cada fragmento de aorta foi testado quanto a sua viabilidade. Depois de 60 minutos de estabilização dos fragmentos de aorta realizou-se contração com Cloreto de Potássio (KCl) a 80 mmol/L (ESTRADA-SOTO *et al.*, 2010), sendo necessário uma contração de pelo menos 70% do basal. Depois, cada fragmento de aorta foi lavado com solução de Krebs-Henseleit quatro vezes. Após 5 minutos foi realizado o teste de viabilidade do endotélio, onde primeiro ocorreu contração com Fenilefrina (PHE) 1  $\mu\text{mol/L}$  (SOARES, 2008; CHEN *et al.*, 2009), seguida da avaliação do relaxamento pela adição da Acetilcolina (ACH) a 10  $\mu\text{mol/L}$  nas cubas (WONGSAWATKUL *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009) (Figura 28).



**FIGURA 28** – Representação esquemática do teste de viabilidade dos anéis aórticos.

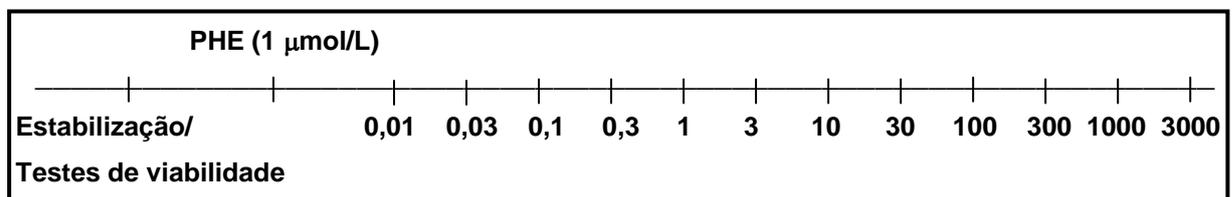
Consideraram-se preparações com endotélio íntegro aquelas que com a adição da acetilcolina apresentavam relaxamento maior ou igual a 80% (CHEN *et al.*, 2009; SILVA, 2009). Alguns protocolos de estudos utilizaram anéis aórticos sem endotélio, o que foi comprovado por um relaxamento com acetilcolina menor ou igual a 10% (CHEN *et al.*, 2009; SILVA, 2009). Antes de serem colocados nas cubas, os fragmentos de artéria tinham seu endotélio removido, com o auxílio do próprio clipe metálico, através da rolagem na artéria na placa de Petri. Para avaliação da integridade do endotélio foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Relaxamento (\%)} = \frac{\text{Máxima contração com PHE} - \text{Máximo relaxamento com ACH}}{\text{Máxima contração de PHE} - \text{Basal da PHE}} \times 100$$

### 3.5.2 Estudo *in vitro* preliminar ou inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina

Objetivo: Estudar os efeitos relaxantes do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz e verificar se estes são dependentes da concentração.

Sobre a contração mantida com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas dos compostos a serem testados até a obtenção do relaxamento máximo. Para tanto, utilizaram-se as seguintes concentrações: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000  $\mu\text{g/mL}$ . Com a aplicação deste protocolo definiu-se entre as substâncias estudadas aquela com menor  $\text{CE}_{50}$ , que é a concentração necessária para se obter 50% do efeito máximo. A substância com menor  $\text{CE}_{50}$  foi estudada em outros protocolos para determinar o possível mecanismo de ação. Neste experimento foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato (N = 8). Como controle utilizou-se Tween 80, veículo para diluição do OEAz e frações.



**FIGURA 29** – Representação esquemática do protocolo para análise inicial do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.

### 3.5.3 Estudo *in vivo*: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz

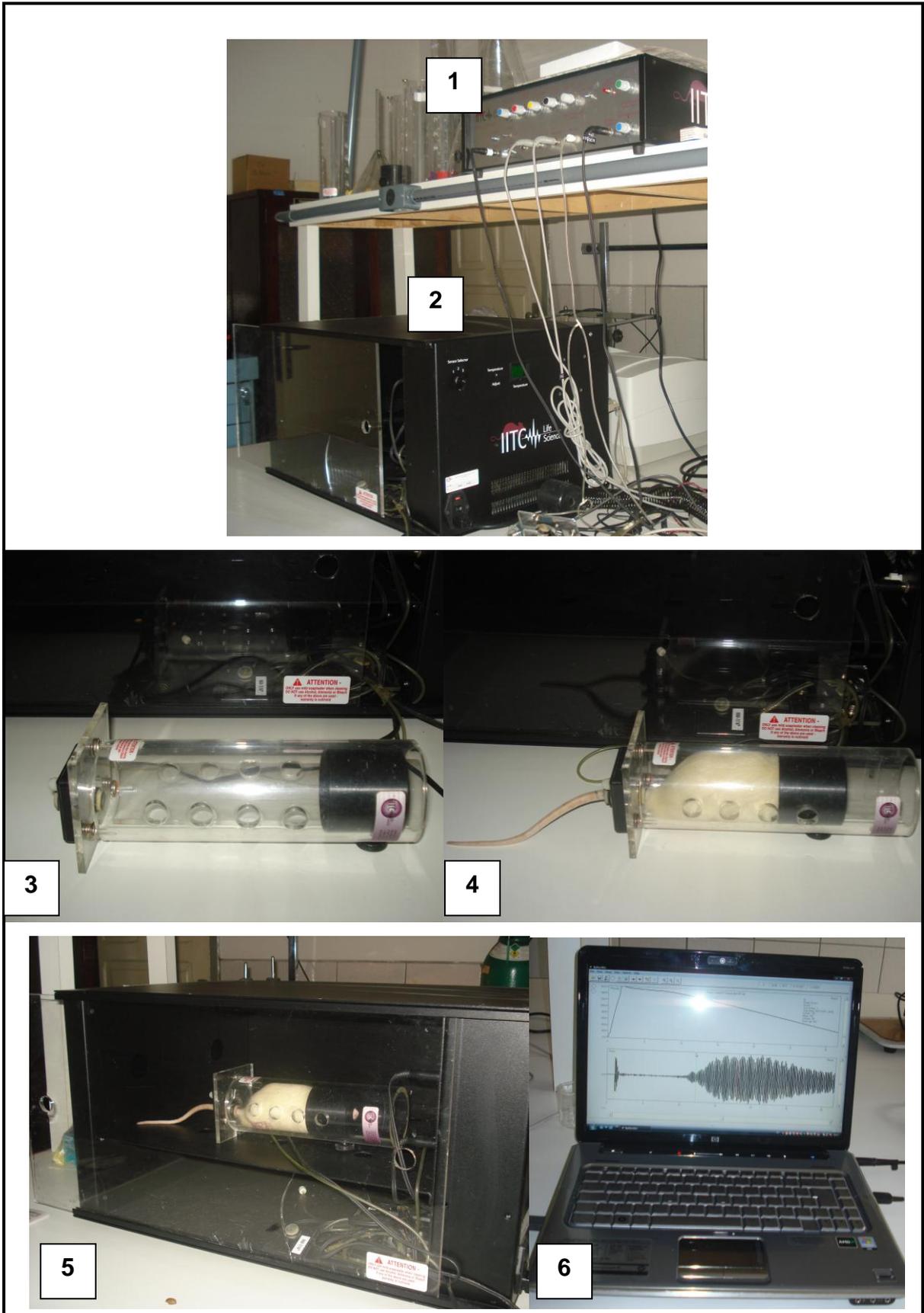
O experimento *in vivo* consistiu na medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda, um método já validado para experimentos crônicos com roedores (IRVINE; WHITE; CHAN, 1997; VAN *et al.*, 2000; FRITZ; RINALDI, 2008). O aparelho utilizado neste estudo era composto de um módulo amplificador automático (modelo 229, IITC Life Science) e uma câmara de aquecimento com temperatura controlada automaticamente, em torno de 34°C.

Os ratos foram imobilizados sem dor em um tubo cilíndrico de acrílico, no qual eram ventilados pelos orifícios do cilindro, e assim, eram realizadas as medidas da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM). O sistema também obtinha a frequência cardíaca (FC). Este cilindro era transferido à câmara de aquecimento, que além de manter a temperatura adequada, proporcionava tranquilidade ao animal, visto que o privava de estímulos externos. Para tal procedimento, a região proximal da cauda dos animais era encaixada em um orifício recoberto por um manguito de borracha, o qual continha um sensor para captar o pulso do animal pela artéria caudal. O sensor era conectado ao módulo amplificador cujo sinal era enviado ao computador e analisado pelo software de aquisição de dados (BpMonWin.exe, IITC Life Science). O aparato utilizado neste experimento está representado na Figura 30.

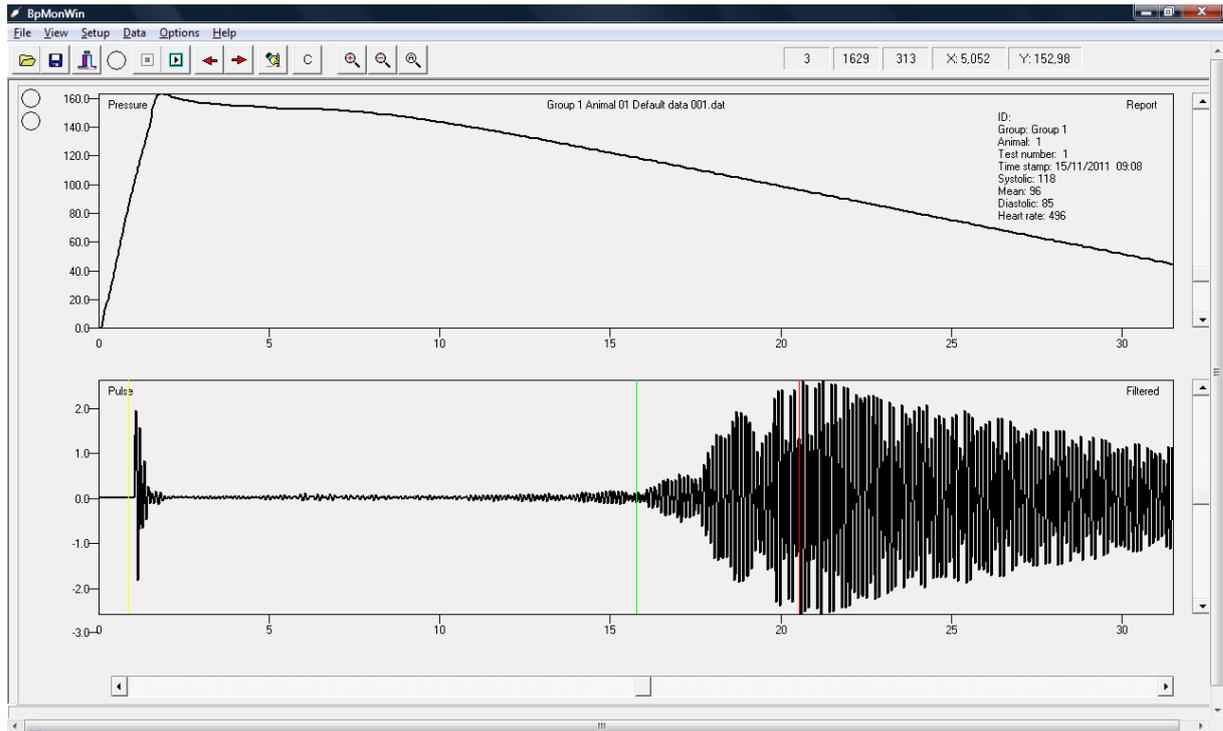
Para medição das pressões, o sistema insuflava automaticamente o manguito até uma pressão máxima definida previamente pelo pesquisador. Em seguida, o aparelho realizava a desinsuflação gradual do manguito, obtendo-se a PAS. A partir da PAS, o sistema calculava as outras variáveis. Nesse método, a medida mais fidedigna é a PAS. Um mês antes do experimento, os animais foram colocados três vezes por semana nos cilindros de contenção para adaptação ao aparelho. Ademais, para cada animal a pressão era verificada três vezes e obtido um valor médio das três medições. A Figura 31 exemplifica um traçado obtido neste experimento.

A partir da pressão arterial sistólica foram determinadas outras variáveis, a saber: área sob a curva e taxa de redução da pressão arterial sistólica. A área sob a curva é uma medida do efeito hipotensor global dos tratamentos utilizados no estudo, sendo calculada pelo método dos trapézios (MOTULSKY, 1999; MOTULSKY, 2003). Enquanto a taxa de redução da pressão arterial sistólica (mmHg/dia) representa a velocidade do efeito hipotensor proporcionado por um determinado tratamento, sendo obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de redução da PAS} = \frac{\text{PAS (30º dia)} - \text{PAS (60º dia)}}{30}$$



**FIGURA 30** – Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda. 1: Módulo amplificador automático. 2: Câmara de aquecimento. 3 e 4: Cilindro de acrílico para contenção e verificação da pressão caudal do rato por meio de sensor. 5: Rato no cilindro dentro da câmara de aquecimento. 6: Software de aquisição de dados.



**FIGURA 31** – Gráfico obtido através de medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda, evidenciando pressão arterial do rato de 118 x 85 mmHg.

Neste experimento, todos os animais foram submetidos inicialmente a um modelo de hipertensão mediante a administração de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), o qual é conhecido como modelo de hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico (FAZAN JR.; SILVA; SALGADO, 2001; RANG *et al.*, 2007). As primeiras descrições sobre a hipertensão induzida por inibição do óxido nítrico foram documentadas de forma independente por Ribeiro *et al.* (1992) e Baylis *et al.* (1992).

O óxido nítrico (NO) desempenha um importante papel na regulação da resistência vascular sistêmica, exercendo efeito vasodilatador, entre outros. O NO é sintetizado a partir da L-arginina e do O<sub>2</sub> molecular pela óxido nítrico sintase. Existem três isoformas da óxido nítrico sintase (a forma induzível, e as formas constitutivas endotelial e neuronal). Essas enzimas são flavoproteínas diméricas, que contêm tetraidrobiopterina e possuem homologia com o citocromo P450 (RANG *et al.*, 2007). O L-NAME é um análogo sintético da arginina, que compete com ela ocasionando a inibição da síntese do óxido nítrico, sendo um instrumento experimental utilizado como modelo de hipertensão, a qual se instala já nos primeiros dias do tratamento (FAZAN JR.; SILVA; SALGADO, 2001).

Este protocolo teve duração total de 60 dias. Inicialmente foi calculada a ingesta hídrica diária para 4 ratos (quantidade contida em uma única caixa). Com a obtenção do valor médio da quantidade de água ingerida por rato/dia, calculou-se a quantidade de L-NAME para os animais, na dose de 30 mg/kg/rato por dia (MORÁN *et al.*, 2009), sendo adicionado o fármaco na água de beber.

Ademais, este protocolo teve duas fases: Na primeira fase (1° ao 30° dias), ocorria a administração do L-NAME. Nesse período, foi realizado o estudo de um grupo controle para o modelo de hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico, ao qual era administrada somente água desprovida de L-NAME. Na segunda fase (31° ao 60° dias), o tratamento com L-NAME era mantido e realizava-se a administração por gavagem das substâncias em estudo: (OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz). Como controles positivos utilizaram-se o Captopril e a Nifedipina. O controle negativo foi a água destilada. Essas terapias foram administradas uma vez ao dia por gavagem, às 8 horas da manhã. A medição da pressão arterial foi efetuada duas horas depois da administração.

A dose de OEAz utilizada neste protocolo foi determinada a partir de estudos de toxicidade aguda e crônica em camundongos, realizados pelo Professor Dr. João Batista Calixto (Universidade Federal de Santa Catarina, 2008), onde a dose em que não foram observados eventos adversos (NOAEL) foi de 200 mg/Kg. Para a conversão da dose de fármacos utilizadas em camundongos para a dose equivalente em ratos foi aplicada a seguinte fórmula (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005; REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007):

$$DER = NOAEL \times (km_{\text{camundongo}}/km_{\text{rato}})$$

DER: Dose equivalente em ratos

NOAEL: Dose do fármaco em que não foram observados eventos adversos no animal (mg/kg)

$km_{\text{camundongo}}$ : Fator para conversão da dose em camundongos = 3

$km_{\text{rato}}$ : Fator para conversão da dose em ratos = 6

Cálculo: DER = 200 x (3/6)

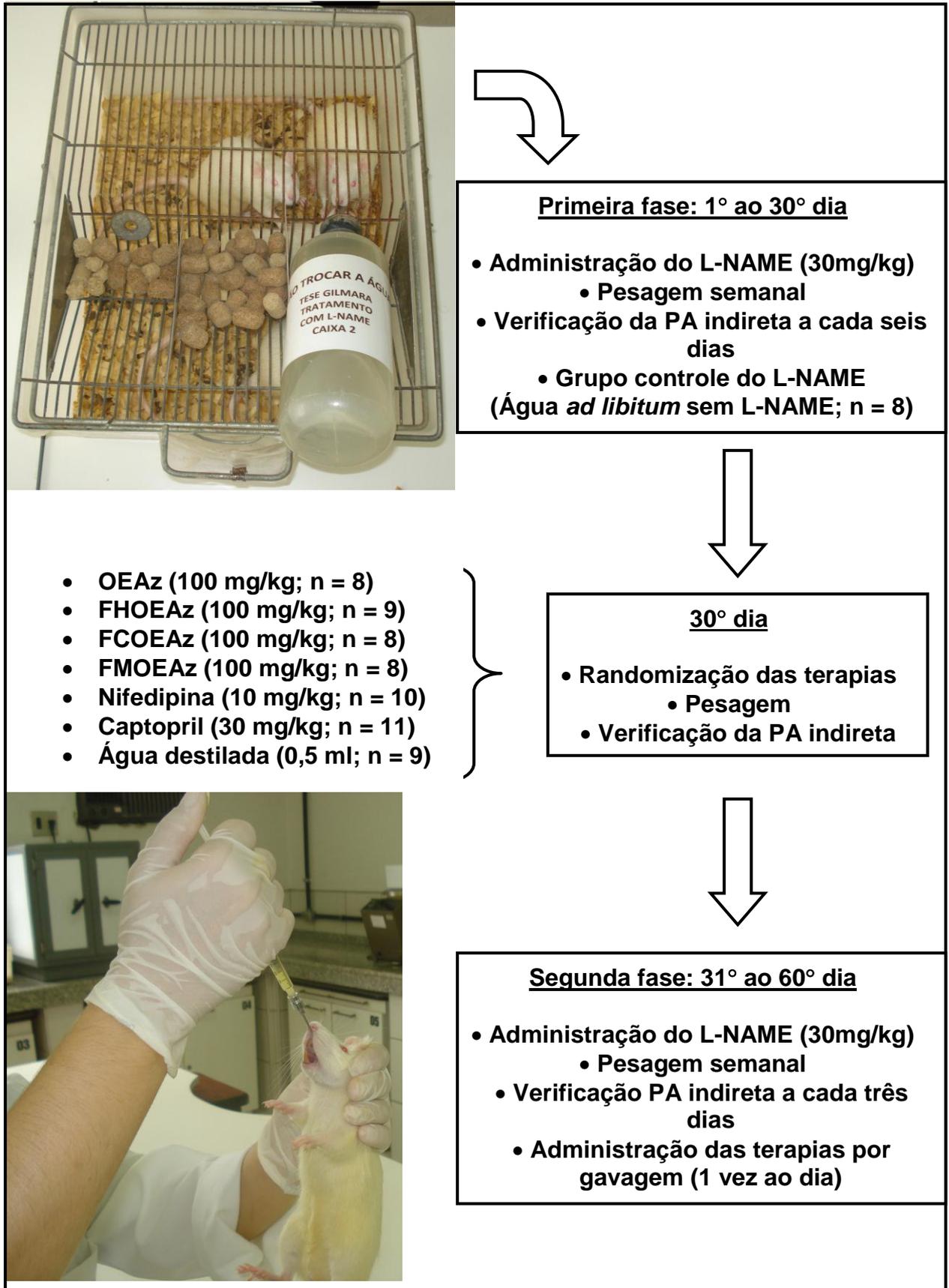
$$DER = 100 \text{ mg/kg}$$

Considerando que a dose do OEAz determinada foi de 100mg/kg, também foi utilizada a mesma dosagem para as frações (FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz). A dose da Nifedipina (10 mg/kg), que é um antagonista dos canais de cálcio tipo L, com ação mais seletiva sobre o sistema vascular, foi determinada a partir de estudos anteriores (CURWEN *et al.*, 2008; TOM *et al.*, 2011). Quanto à dose do Captopril (30 mg/kg), um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), esta foi determinada também a partir de pesquisas prévias (AHN *et al.*, 2007; UMAR *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2011). O veículo utilizado para administração de todas as terapias foi água destilada, cujo volume total foi de 0,5 mL.

Do 1° ao 30° dias do protocolo, os parâmetros cardiovasculares (PAS, PAD, PAM e FC) dos animais foram mensurados a cada seis dias, com o objetivo de observar o aumento gradual da PA. Do 31° ao 60° dias, a verificação foi realizada a cada três dias, para observação dos valores pressóricos. O peso foi verificado a cada sete dias para ajuste das doses dos fármacos utilizados. Na análise de dados foi calculada a variação percentual do peso, obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\Delta \text{Peso (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

A Figura 32 apresentada a seguir descreve os grupos experimentais e o fluxograma do estudo *in vivo*.



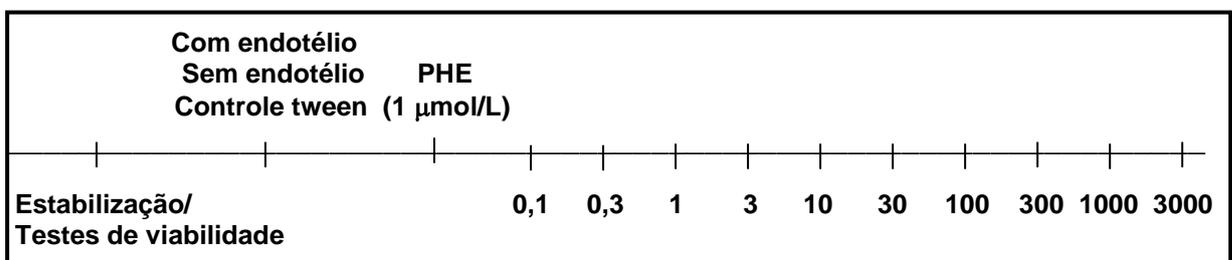
**FIGURA 32** – Descrição dos grupos e fluxograma do experimento *in vivo*: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico.

3.5.4 Aplicação de protocolos específicos *in vitro* para caracterização do possível mecanismo de ação da substância que mostrou melhor perfil farmacológico no estudo *in vitro* preliminar ou inicial e no estudo *in vivo*

Depois da avaliação inicial das substâncias testadas *in vitro* e *in vivo*, constatou-se que a fração metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (FMOEAz) foi a substância com menor  $CE_{50}$  (concentração ou dose necessária para produzir 50% da resposta máxima) nos experimentos *in vitro* e efeito farmacológico mais satisfatório nos experimentos *in vivo*. A partir desses achados, a FMOEAz foi submetida a estudos de reatividade vascular para identificação do possível mecanismo de ação, por meio da aplicação de protocolos específicos descritos a seguir:

3.5.4.1 Efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina e a participação do endotélio vascular

Em diferentes preparações de aorta de rato (N = 6), com endotélio íntegro e desnudo, foram realizadas curvas concentração-efeito para a FMOEAz (0,1 – 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a pré-contracção com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). Também foi realizada uma curva controle com o veículo da FMOEAz, o Tween (Figura 33).

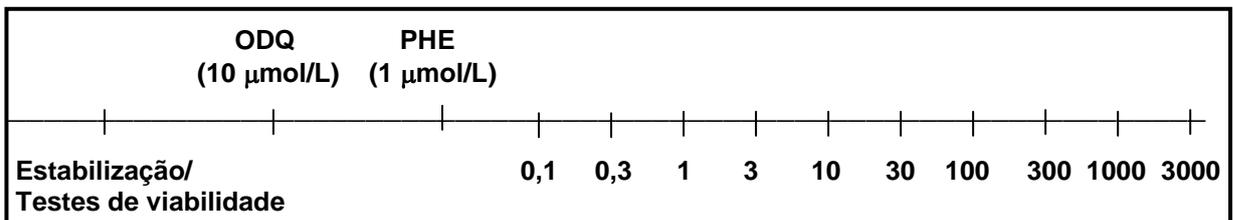


**FIGURA 33** – Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito da FMOEAz em anéis aórticos pré-contraídos com Fenilefrina e a participação do endotélio vascular.



### 3.5.4.4 Contribuição da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) para o efeito relaxante da FMOEAz

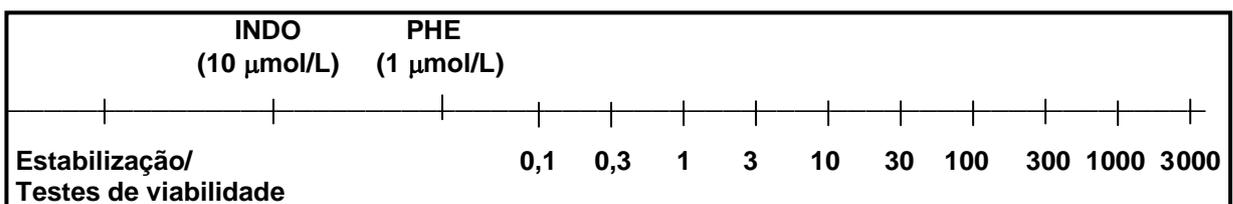
Foi utilizado o inibidor da GCs, o 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ). Em preparações de aorta de rato (N = 6) foram realizadas curvas concentração-efeito com FMOEAz (0,1 – 3000 µg/mL) sobre a pré-contração de anéis aórticos com Fenilefrina (1 µmol/L) após incubação por 30 minutos de ODQ (10 µmol/L) (YEH *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2008; LEE *et al.*, 2011) (Figura 36).



**FIGURA 36** – Representação esquemática do protocolo para avaliação da contribuição da GCs para o efeito relaxante da FMOEAz.

### 3.5.4.5 Avaliação do envolvimento de prostanóides no efeito relaxante da FMOEAz

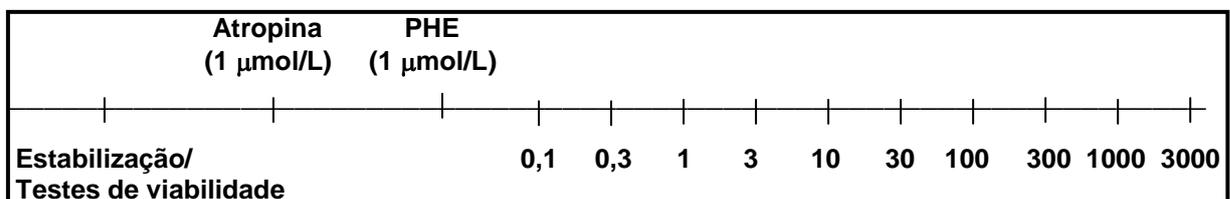
Os efeitos vasculares exercidos pela FMOEAz podem ter ação sinérgica ou adicional mediada por substâncias provenientes da bioconversão do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (COX). Assim, para avaliar a possibilidade de participação de prostanóides no mecanismo de relaxamento vascular promovido pela FMOEAz foram realizadas curvas concentração-efeito para a FMOEAz (0,1 – 3000 µg/mL) sobre a pré-contração de anéis aórticos com Fenilefrina (1 µmol/L) após incubação por 30 minutos da Indometacina (INDO), que é um inibidor não seletivo da COX a 10 µmol/L (RIBEIRO, 2008; SILVA, 2009; KAMADYAAPA *et al.*, 2009). Foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato (N = 6) (Figura 37).



**FIGURA 37** – Representação esquemática do protocolo para avaliação do envolvimento de prostanóides no efeito relaxante da FMOEAz.

### 3.5.4.6 Participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante da FMOEAz

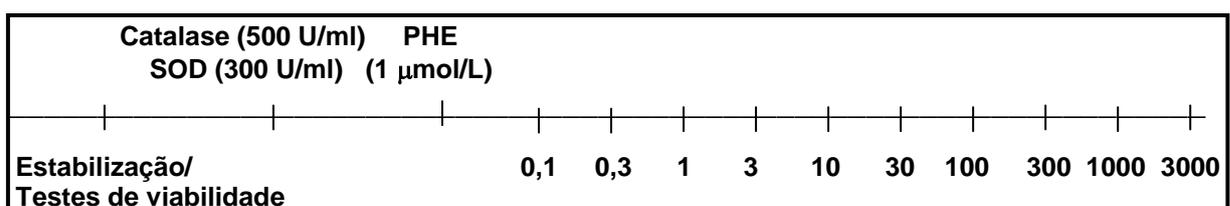
Para avaliar a participação dos receptores muscarínicos da acetilcolina no efeito relaxante da FMOEAz, utilizou-se a Atropina, um antagonista colinérgico. Foram realizadas curvas concentração-efeito para a FMOEAz (0,1 – 3000 µg/mL) sobre a pré-contracção de anéis aórticos com Fenilefrina (1 µmol/L) após incubação por 30 minutos da Atropina (1 µmol/L) (SOARES, 2008; ASSREUY *et al.*, 2011). Foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato (N = 6) (Figura 38).



**FIGURA 38** – Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação dos receptores muscarínicos para o efeito relaxante da FMOEAz.

### 3.5.4.7 Participação de espécies reativas de oxigênio no efeito vasodilatador da FMOEAz

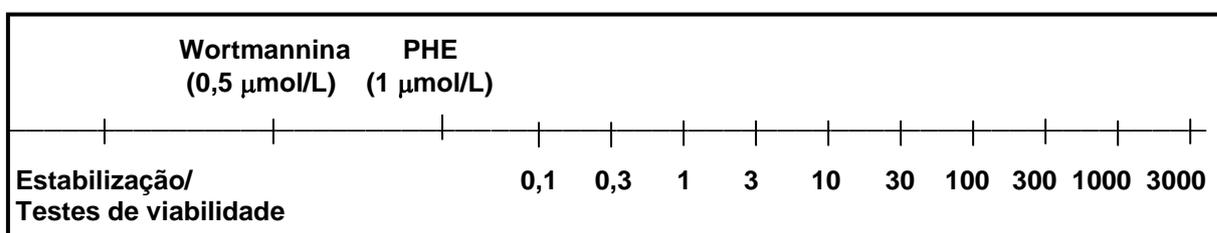
Foram utilizadas substâncias com atividade enzimática, que combatem espécies reativas de oxigênio: Catalase, 500 U/ml (SATO *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2009) que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) e a Superóxido Dismutase (SOD), 300 U/ml (ANOZIE *et al.*, 2007; CAMPANA *et al.*, 2009), que catalisa a reação ( $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ). Em preparações de aorta de rato (N = 6) foram realizadas curvas concentração-efeito com FMOEAz (0,1 – 3000 µg/mL) sobre a pré-contracção com Fenilefrina (1 µmol/L) após incubação por 30 minutos de cada uma das substâncias citadas (Figura 39).



**FIGURA 39** – Representação esquemática do protocolo para análise da participação de espécies reativas de oxigênio no efeito vasodilatador da FMOEAz.

### 3.5.4.8 Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz

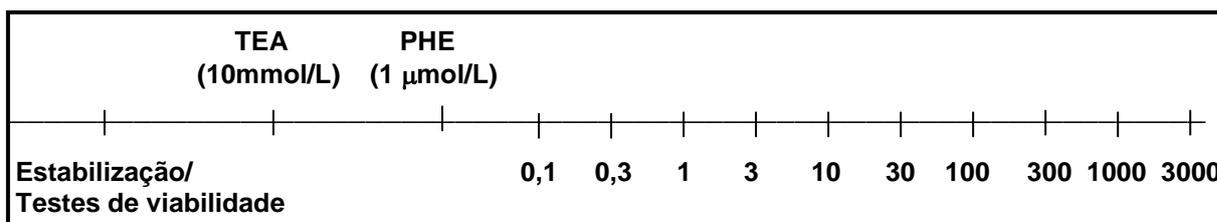
Em diferentes preparações de aorta de rato (N = 6) foram realizadas curvas concentração-efeito com a FMOEAz (0,1 – 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a pré-contracção de anéis aórticos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) após incubação por 30 minutos de Wortmannina (0,5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) (HIPÓLITO *et al.*, 2011), um inibidor do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que está envolvido em numerosos processos celulares, dentre eles, a via de sinalização PI3K/Akt que envolve a fosforilação da óxido nítrico sintase, ativando a enzima e promovendo vasodilatação.



**FIGURA 40** – Representação esquemática do protocolo da avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz.

### 3.5.4.9 Contribuição do bloqueio não seletivo dos canais de $\text{K}^+$ no efeito relaxante induzido pela FMOEAz

Em diferentes preparações de aorta de rato (N = 6), foram bloqueados de forma não seletiva os canais de potássio com o Tetraetilamônio (TEA) (10  $\text{mmol}/\text{L}$ ) (SOARES, 2008; ZHANG *et al.*, 2010). Foram realizadas curvas concentração-efeito para a FMOEAz (0,1 – 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a pré-contracção com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) após a incubação por 30 minutos com tal bloqueador.



**FIGURA 41** – Representação esquemática do protocolo para análise da contribuição do bloqueio não seletivo dos canais de  $\text{K}^+$  no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.

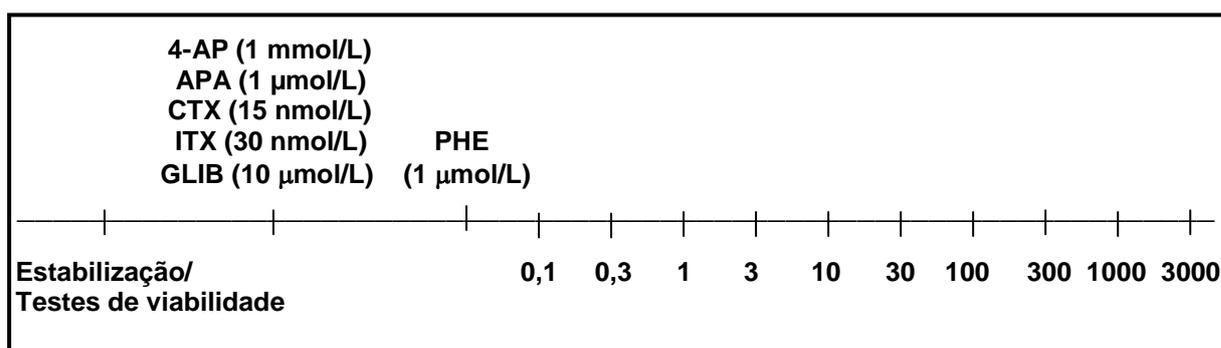
### 3.5.4.10 Contribuição do bloqueio seletivo dos canais de K<sup>+</sup> no efeito relaxante induzido pela FMOEAz

Foi utilizado como bloqueador seletivo dos canais de potássio voltagem-dependente a 4-aminopiridina (4-AP) (1 mmol/L) (CHEN *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

Como bloqueadores seletivos de canais de potássio de baixa, intermediária e alta condutância ativados por Ca<sup>2+</sup>, utilizaram-se, respectivamente, a Apamina (APA) (1 µmol/L) (OLOYO *et al.*, 2011); Caribdotoxina (CTX) (15 nmol/L) (SEOK *et al.*, 2011) e Iberiotoxina (ITX) (30 nmol/L) (SENEJOUX *et al.*, 2011).

Como bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de ATP, usou-se a Glibenclamida (GLIB) (10 µmol/L) (RIBEIRO, 2008; XUE *et al.*, 2011).

Em diferentes preparações de aorta de ratos (N = 6), cada um dos fármacos foi testado separadamente. Foram realizadas curvas concentração-efeito para a FMOEAz (0,1 – 3000 µg/mL) sobre a pré-contração com Fenilefrina (1 µmol/L) após incubação por 30 minutos com cada um dos inibidores.



**FIGURA 42** – Representação esquemática do protocolo para análise da contribuição do bloqueio seletivo dos canais de K<sup>+</sup> no efeito relaxante induzido pela FMOEAz.

### 3.5.4.11 Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de $K^+$

O objetivo deste protocolo foi investigar o efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio regulados por voltagem, sem depleção do  $Ca^{2+}$  intracelular, utilizando como controle a Nifedipina ou Tween (ADARAMOYE *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011; HOE *et al.*, 2011).

A primeira parte deste protocolo inclui a estabilização do fragmento de aorta, bem como os testes de viabilidade do tecido, o que se dá em solução de Krebs Normal. Após este procedimento, realizam-se seis lavagens com solução de Krebs sem  $Ca^{2+}$ . O Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) (1mmol/L), um quelante dos íons  $Ca^{2+}$  é adicionado ao meio, permanecendo por 15 minutos (ADARAMOYE *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2009). Em seguida, ocorrem três lavagens com Krebs sem  $Ca^{2+}$ , para retirada do EGTA. Este procedimento depleta o  $Ca^{2+}$  extracelular, sendo depois acrescentado KCl a 60 mmol/L ao meio. Após três minutos de incubação do KCl, adiciona-se em cada uma das cubas a FMOEAz (30, 100 e 300  $\mu$ g/ml); 30  $\mu$ L de Tween ou Nifedipina (100  $\mu$ mol/L). Cada preparação é exposta a apenas uma concentração da FMOEAz. Em seguida, realiza-se curva com  $CaCl_2$  (0,01 - 30 mmol/L). Estes experimentos foram realizados em artérias com endotélio íntegro e desnudo (N = 6).

Krebs Normal	Krebs sem $Ca^{2+}$ (6 lavagens)		EGTA (1 mmol/L)	Krebs sem $Ca^{2+}$ (3 lavagens)			KCl (60 mmol/L)	
Estabilização/ Testes de viabilidade								
Krebs $Ca^{2+}$ free								
FMOEAz (30)	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$	$CaCl_2$
FMOEAz (100)	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	30
FMOEAz (300)								
Tween (30 $\mu$ l)								
Nifedipina (100 $\mu$ mol/L)								

**FIGURA 43** – Representação esquemática do protocolo para investigação do efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem, sem depleção do  $Ca^{2+}$  intracelular.

### 3.5.4.12 Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de Fenilefrina ou alta concentração de $K^+$ após depleção do $Ca^{2+}$ intracelular

O objetivo deste protocolo foi investigar o efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio operados por receptor (Fenilefrina) ou canais de cálcio regulados por voltagem (KCl), após depleção do  $Ca^{2+}$  intracelular (ADARAMOYE *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011; HOE *et al.*, 2011).

A primeira parte deste protocolo inclui a estabilização do fragmento de aorta, bem como os testes de viabilidade do tecido, o que se dá em solução de Krebs Normal. Após este procedimento realizam-se seis lavagens com solução de Krebs sem  $Ca^{2+}$ . O Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) (1 mmol/L), um quelante dos íons  $Ca^{2+}$  é adicionado ao meio, permanecendo por 15 minutos (HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Em seguida, coloca-se Fenilefrina (1  $\mu$ mol/L), deixando junto com o EGTA por mais 30 minutos. São realizadas seis lavagens com Krebs sem  $Ca^{2+}$ , e novamente acrescentado EGTA (1 mmol/L) ao meio, o qual após 15 minutos é retirado com três lavagens com Krebs sem  $Ca^{2+}$ . Após três minutos de incubação do KCl ou Fenilefrina, adiciona-se às cubas 300  $\mu$ g/ml da FMOEAz ou 30  $\mu$ L de solução de Tween. Em seguida, realiza-se a curva de  $CaCl_2$  (0,01 – 30 mM). Estes experimentos são realizados em artérias com endotélio íntegro e desnudo (N = 6).

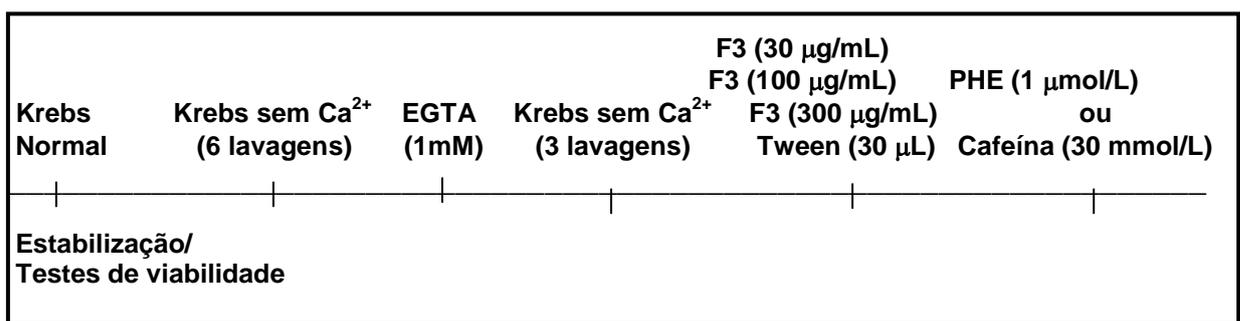
Krebs Normal	Krebs sem $Ca^{2+}$ (6 lavagens)	EGTA (1mM) PHE (1 $\mu$ M)	Krebs sem $Ca^{2+}$ (6 lavagens)	EGTA (1 mM)	Krebs sem $Ca^{2+}$ (3 lavagens)	PHE KCl		
Estabilização/ Testes de viabilidade								
Krebs sem $Ca^{2+}$								
FMOEAz (300) Tween (30 $\mu$ l)	$CaCl_2$ 0,01	$CaCl_2$ 0,03	$CaCl_2$ 0,1	$CaCl_2$ 0,3	$CaCl_2$ 1	$CaCl_2$ 3	$CaCl_2$ 10	$CaCl_2$ 30

**FIGURA 44** – Representação esquemática do protocolo para investigação do efeito inibitório da FMOEAz sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio operados por receptor ou canais de  $Ca^{2+}$  regulados por voltagem, após depleção do  $Ca^{2+}$  intracelular.

### 3.5.4.13 Efeito do pré-tratamento com FMOEAz na contração induzida por Fenilefrina ou Cafeína na ausência de cálcio extracelular

O objetivo deste protocolo foi investigar se a FMOEAz interfere na liberação de cálcio dos estoques intracelulares (ADARAMOYE *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011; HOE *et al.*, 2011).

A primeira parte deste protocolo inclui a estabilização do fragmento de aorta, bem como os testes de viabilidade do tecido, o que se dá em solução de Krebs Normal. Após este procedimento realizam-se seis lavagens com solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . O ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) (1 mmol/L), um quelante dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  é adicionado ao meio, permanecendo por 15 minutos, sendo retirado com três lavagens de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$  (HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Em seguida, incuba-se por 30 minutos a FMOEAz (30, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ ) e 30  $\mu\text{L}$  de solução de Tween. Após este período, adiciona-se ao meio a Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou a Cafeína (30 mmol/L). Estes experimentos são realizados em artérias com endotélio íntegro e desnudo (N = 6).



**FIGURA 45** – Representação esquemática do protocolo para investigação da interferência da FMOEAz na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares.

### 3.6 Fármacos e diluições utilizadas no estudo

#### 3.6.1 Estudos *in vitro*

Todos os fármacos e reagentes utilizados foram provenientes da Sigma-Aldrich (USA). Em todas as diluições finais foi utilizada a água destilada. Para diluir o OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz utilizou-se o polissorbato 80 (Tween 80), um surfactante não iônico e emulsionante. A máxima concentração de Tween 80 nas cubas do banho de órgãos foi de 0,01%, o que de acordo com outro estudo pode ser de até 0,06% (LIMA *et al.*, 2010). Em alguns fármacos utilizou-se ácido acético, álcool, solução de NaOH, solução bicarbonato de sódio a 5% e dimetilsulfóxido (DMSO), não se realizando curva controle para estes diluentes, visto que as concentrações nas cubas do banho de órgão foram irrisórias, bem como estudos prévios já haviam mostrado ausência de atividade biológica nas presentes condições experimentais (LIMA-ACCIOLY *et al.*, 2006; HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Todos os fármacos foram sonicados imediatamente antes da colocação nas cubas. Os fármacos e diluições utilizadas nos experimentos *in vitro* são mostrados no Quadro 4.

#### 3.6.2 Estudos *in vivo*

O veículo para o OEAZ, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz, Captopril e Nifedipina foram água destilada, com o volume sempre ajustado para 0,5 mL. Apenas o veículo do L-NAME foi água potável, visto que era adicionado à água de beber dos ratos. O Captopril foi proveniente da Sigma-Aldrich (USA). A Nifedipina (Adalat®) em cápsulas de 10 mg foi fabricada pela Bayer Schering Pharma. Os fármacos, dosagens e veículos dos estudos *in vivo* são mostrados no Quadro 5.

Fármacos	Soluções-estoque	Solução para uso	Diluyente
Acetilcolina	10 <sup>-1</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	Água destilada
Apamina	5 mg/mL (solução ácido acético 0,05 M)	-	Água destilada
Atropina	10 <sup>-1</sup> M (600 µL de água destilada + 400 µL de álcool)	10 <sup>-3</sup> M	Água destilada
CaCl <sub>2</sub>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-1</sup> e 1 M	-	Água destilada
Cafeína	1000 mM	-	Água destilada aquecida a 100°C
Caribdotoxina	1 mg/mL	-	Água destilada
Catalase	500 U/mL	-	Água destilada
EGTA	100 mM (800 µL de água destilada + 200 µL de solução de NaOH 1 M)	-	Água destilada
Fenilefrina	10 <sup>-2</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	Água destilada
Glibenclamida	10 mM + DMSO	-	Água destilada
Iberiotoxina	0,7 mg/mL	-	Água destilada
Indometacina	10 mM + solução bicarbonato de sódio 5%	-	Água destilada
KCl	3 M	-	Água destilada
L-NAME	10 mM	-	Água destilada
Nifedipina	100 mM + DMSO 50 mg/mL	-	-
ODQ	20 mM	-	Água destilada
OEAZ, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz	0,1 g (OEAZ, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz + 5 µL tween 80 + completa com água destilada para 1 mL)	Reconstituição para as diferentes dosagens	Água destilada
SOD	300 U/mL	-	Água destilada
Tetraetilamônio	2 M	-	Água destilada
Tween 80	0,5%	Reconstituição para as diferentes dosagens	Água destilada
Wortmannina	11,67 mM + DMSO 14 mg/mL	10 <sup>-3</sup> M	Água destilada
4-Aminopiridina	100 mM	-	Água destilada

**QUADRO 4** – Fármacos e diluições utilizadas nos experimentos *in vitro*.

Fármacos	Dosagem	Veículo
OEAZ FHOEAz FCOEAz FMOEAz	100 mg/kg/dia	Água destilada
Captopril	30 mg/kg/dia	Água destilada
L-NAME	30 mg/kg/dia	Água potável
Nifedipina	10 mg/kg/dia	Água destilada

**QUADRO 5** – Fármacos, dosagem e veículo utilizados nos experimentos *in vivo*.

### 3.7 Equipamentos e materiais utilizados no estudo

- Agitador de tubos, Quimis Modelo Q.241.2®
- Balança analítica Mettler Toledo, Modelo XS205 dual range (5 casas decimais)®
- Banho de ultra-som Ultra Sônia, Modelo 1434 DA®
- Banho-maria Nova Técnica, Modelo NT248®
- Bridge Amp (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia)®
- Freezer Classic Luxo Prosdócimo 260®
- Micropipetas automáticas Gilson de 0,2-2; 2-20; 20-100; 200-1000  $\mu\text{L}$ ®
- Módulo amplificador automático com câmara de aquecimento com temperatura controlada automaticamente (Modelo 229, IITC Life Science)®
- PHmetro, Micronal B474®
- Refrigerador Brastemp Frost Free 390®
- Sensor de tensão (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Spain)®
- Sistema de aquisição de dados (Power Lab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia)®
- Sistema de filtração de água destilada, Gesellschaft für Labortechnik mbH, modelo D-30938 Burgwedel®
- Software (LabChart 7.2 for Windows, ADInstruments, Australia)®
- Software de aquisição de dados (BpMonWin.exe, IITC Life Science)®

### 3.8 Análise estatística

#### 3.8.1 Análise estatística dos estudos *in vivo*

Nos ensaios *in vivo*, as variáveis quantitativas foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi observado em todos os casos, calcularam-se, para a estatística descritiva, a média e o desvio padrão, assim como foram empregados testes paramétricos para a estatística analítica. Na verificação da validade do modelo experimental de hipertensão arterial sistêmica, utilizou-se o teste *t* para variáveis não emparelhadas para comparar os grupos Água e L-NAME em relação à PAS, PAD, PAM e FC em cada tempo, assim como para realizar comparações entre os dois grupos no que se refere à taxa de aumento da PAS e à variação da massa corporal. Comparações entre os diversos tempos (dias 6, 12, 18, 24 e 30) e o tempo basal (dia zero) dentro do mesmo grupo (Água e L-NAME) foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Nos ensaios para avaliação do efeito hipotensor das substâncias estudadas, a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os grupos Controle, Captopril, Nidedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em relação à PAS, PAD, PAM e FC em cada tempo (análise intergrupos), assim como para verificar diferenças entre tais grupos relativas à taxa de redução da PAS, área sob a curva e variação da massa corporal. Comparações entre os diversos tempos da fase de tratamento (dias 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57 e 60) com o valor basal (dia 30) dentro do mesmo grupo (análise intragrupo) foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett (ARMITAGE; BERRY, 1994).

### 3.8.2 Análise estatística dos estudos *in vitro*

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

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

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, o efeito redutor da resposta contrátil ao agonista, relativo às substâncias estudadas, correspondeu à diferença entre a contração verificada em cada concentração e o valor basal, sendo expresso em miliNewtons (mN).

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 (após normalização) 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:

$$y = a + \frac{b - a}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \cdot s}},$$

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 factor*) e determina a angulação da curva. Em todas as análises, o valor de  $s$  foi fixado em 1, o que denota uma curva dose-resposta padrão. A  $CE_{50}$  (*effective concentration*), por sua vez, é definida como a concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou a resposta

semimáxima; ou, mais precisamente, o valor da concentração que corresponde ao ponto médio entre a resposta mínima e a máxima.

A  $CE_{50}$  foi usada para quantificar a potência das substâncias, tendo em vista que constitui um parâmetro ordinariamente utilizado para tal finalidade, uma vez que define um ponto na curva dose-resposta peculiar a um dado fármaco. Os valores da  $CE_{50}$ , juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), foram calculados a partir das curvas de regressão. A estatística  $F$  foi usada para comparar a  $CE_{50}$  entre as diversas substâncias ou associações (MOTULSKY; 2003).

O efeito máximo ( $E_{max}$ ), por sua vez, foi definido como a máxima resposta proporcionada por uma dada substância ou associação de compostos.

Na análise dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado, inicialmente, para verificar a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas. Como tal requisito foi observado em todos os casos, a estatística descritiva envolveu o cálculo da média e erro padrão da média (EPM), enquanto, para a estatística analítica, empregaram-se testes paramétricos. Comparações entre dois grupos de tratamento foram efetuadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis independentes. Para comparar o efeito de três ou mais substâncias ou associações, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois, ou ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, para determinar diferenças entre os compostos testados e o tratamento controle (ARMITAGE; BERRY, 1994).

Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor  $P$  menor que 0,05.

O *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.



---

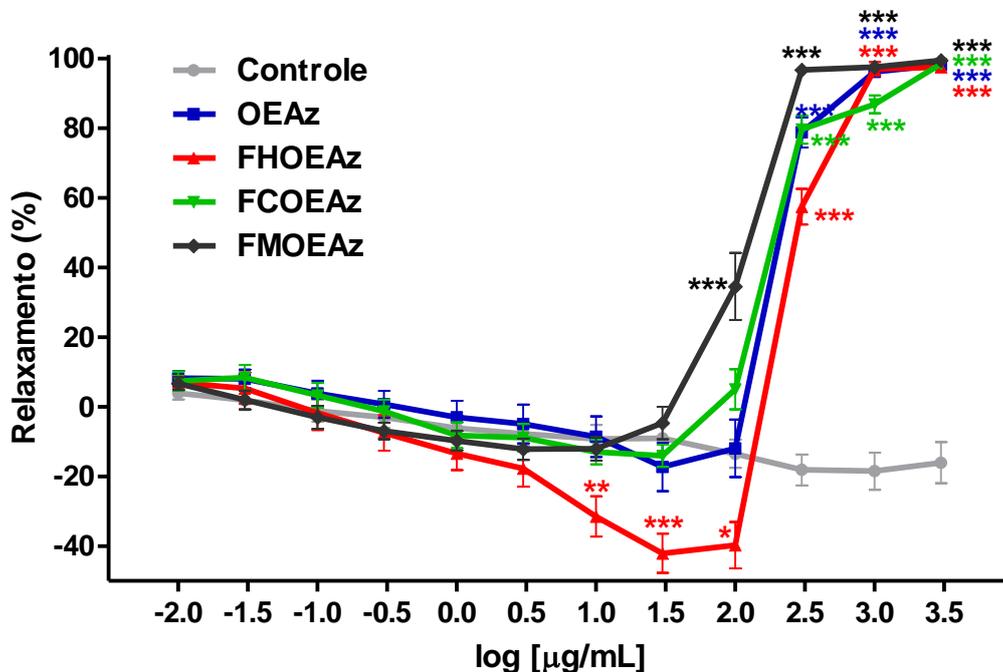
## RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo *in vitro* inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina

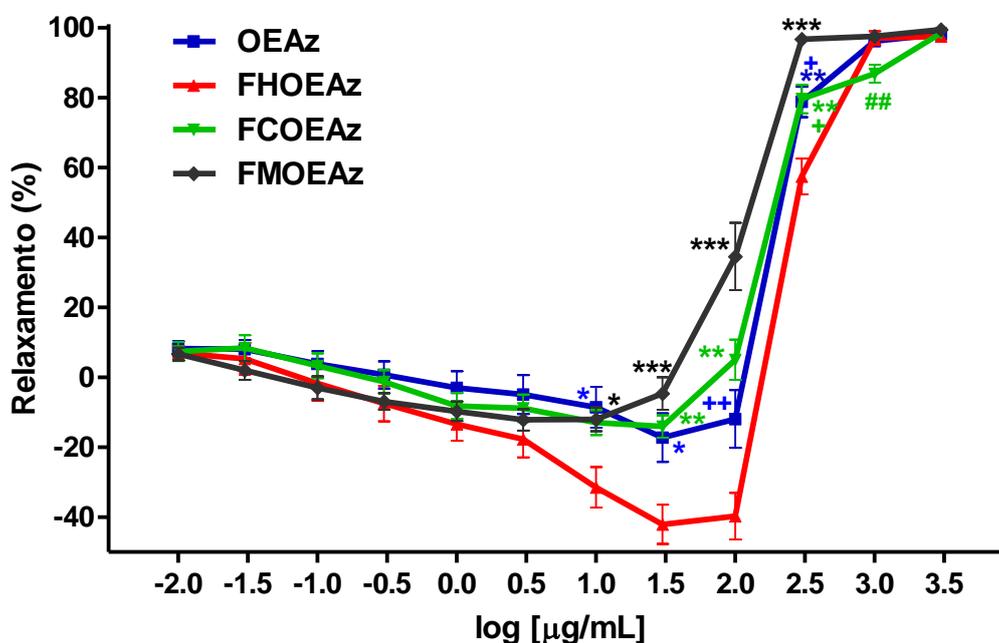
Foram obtidas curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (0,01 – 3.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do OEAz, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz e controle (Tween 80). Utilizaram-se preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina. Comparações entre a intensidade do relaxamento induzido por cada um dos quatro tratamentos e a observada no Controle (veículo), em cada concentração, foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Constatou-se que o OEAz e suas frações provocam relaxamento dependente da concentração, e que na concentração mais alta (3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) há relaxamento total dos anéis de aorta. Ademais, a curva relativa à FMOEAz apresenta mais pontos de significância estatística (Figura 46).



**FIGURA 46** – Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (0,01 a 3000,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) e frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos em cada grupo. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001: em relação ao Controle.

Foi observada a ocorrência de efeito bifásico caracterizado por uma resposta contrátil induzida de forma mais acentuada pela fração hexânica (FHOEAz), principalmente, nas doses de 10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . O efeito bifásico também aconteceu de forma menos pronunciada com o OEAz, FCOEAz e FMOEAz. A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar a intensidade do relaxamento induzido pelos quatro tratamentos em cada concentração. Estes achados estão representados na Figura 47. Vale ressaltar que um exemplo de traçado obtido no experimento de reatividade vascular inicial está expresso no APÊNDICE A.



**FIGURA 47** – Efeito bifásico induzido pela fração hexânica (FHOEAz) e, de forma menos pronunciada, pelo óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) e frações clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos em cada grupo. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001: em relação à FHOEAz; +P < 0,05; ++P < 0,01; +++P < 0,001: em relação à FMOEAz; ##P < 0,01: FCOEAz menor que OEAz, FHOEAz e FMOEAz.

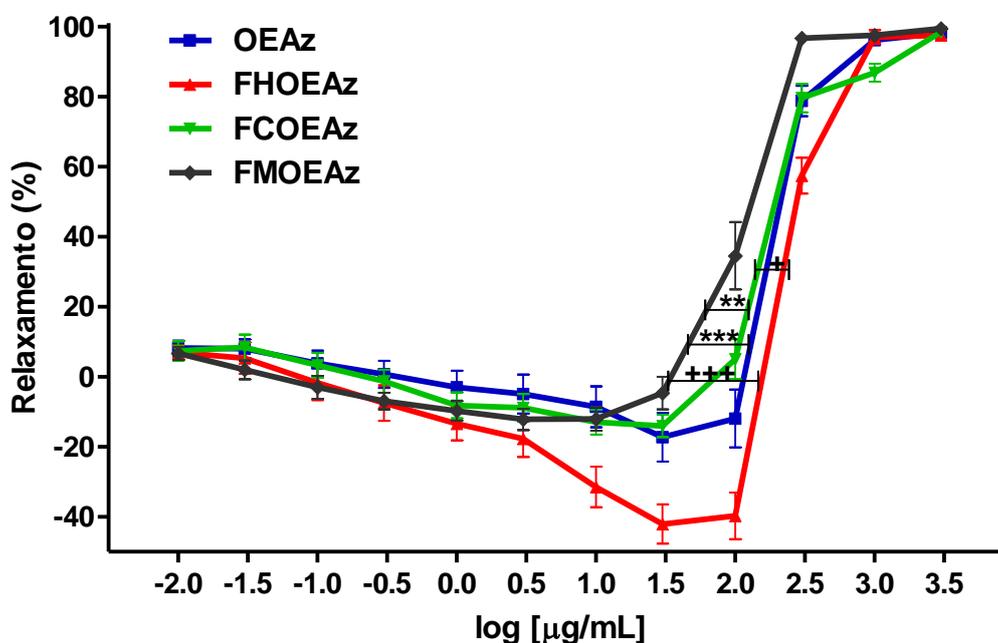
Avaliou-se a potência do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com Fenilefrina. A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$ , assim como os intervalos de confiança de 95% (IC95%), para o OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, os quais estão expressos na Tabela 6 a seguir:

**TABELA 6** – Valores da  $CE_{50}$  e  $E_{max}$  referentes ao efeito vasodilatador do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) e das frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em relação ao grau de relaxamento. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos em cada grupo.

Substância	$CE_{50}$		$E_{max}$	
	Valor	IC 95%	Média	EPM
OEAz	378,01	218,72 a 653,31	98,22	1,18
FHOEAz	581,59	301,02 a 1123,69	97,59	1,61
FCOEAz	300,34§	194,40 a 464,01	98,51	1,05
FMOEAz	150,45*†‡	105,48 a 214,58	99,46	0,54

$CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{g/ml}$ . IC95%: intervalo de confiança de 95%; EPM: erro padrão da média. §P=0,0352 em relação a FHOEAz. \*P < 0,0001 em relação a FHOEAz; †P = 0,0003 comparado a OEAz; ‡P = 0,0025 em relação a FCOEAz.

Verificou-se que a  $CE_{50}$  relativa à FMOEAz foi significativamente menor que a referente ao OEAz (P = 0,0003), à FCOEAz (P = 0,0025) e à FHOEAz (P < 0,0001). Observou-se ainda que a  $CE_{50}$  da FCOEAz foi significativamente menor (P = 0,0352) que aquela da FHOEAz (Figura 48).



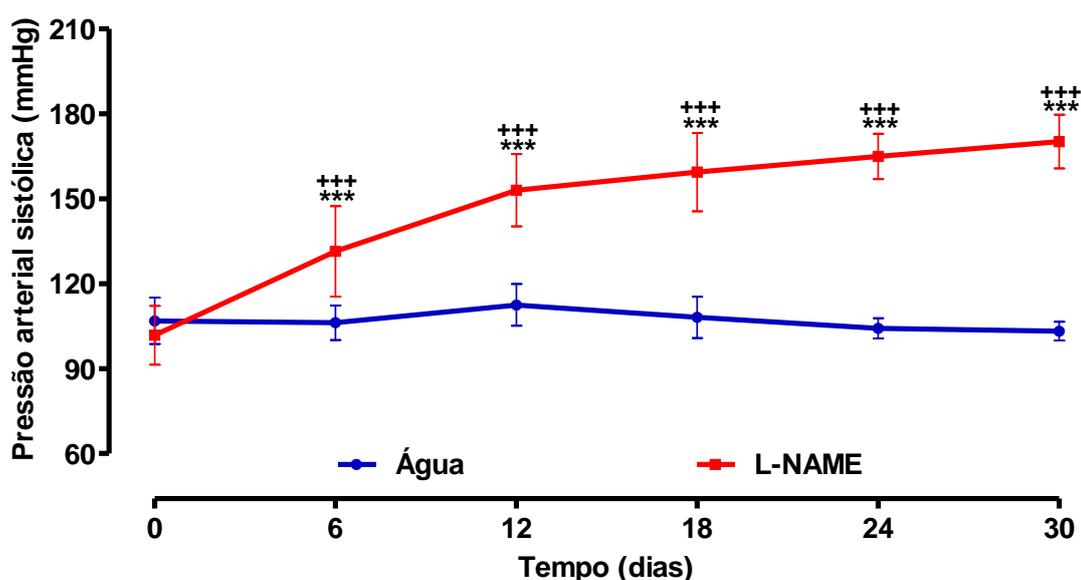
**FIGURA 48** – Avaliação da potência do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) e frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz) em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos em cada grupo. A  $CE_{50}$  relativa à FMOEAz foi significativamente menor que a do OEAz (\*\*\*P = 0,0003), à FCOEAz (\*\*P = 0,0025) e à FHOEAz (+++P < 0,0001). A  $CE_{50}$  da FCOEAz foi significativamente menor (+P = 0,0352) que a da FHOEAz.

## 4.2 Estudo *in vivo*: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz

### 4.2.1 Modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico

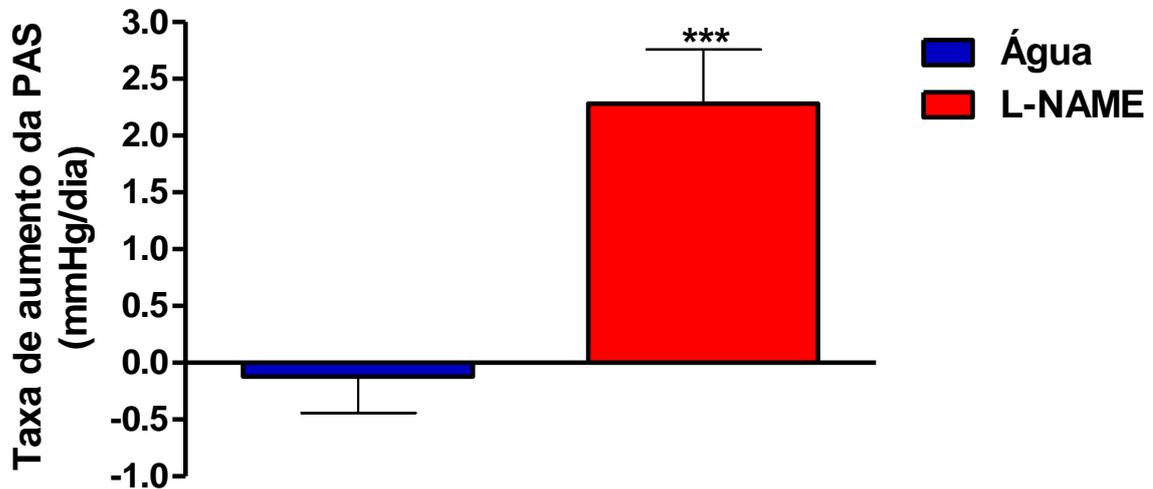
A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi induzida e mantida pela administração crônica de L-NAME na água de beber, enquanto os animais do grupo de comparação receberam água potável. Para análise dos valores da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foi utilizado o teste *t* para dados independentes para comparar os dois grupos em cada tempo. Comparações entre os diversos tempos (dias 6, 12, 18, 24 e 30) e o tempo basal (dia 0) dentro do mesmo grupo foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet.

Constatou-se que a PAS do grupo tratado com L-NAME teve aumento estatisticamente significativo quando comparado ao tempo basal (dia 0) e em relação ao grupo controle, tratado com água potável (Figura 49).



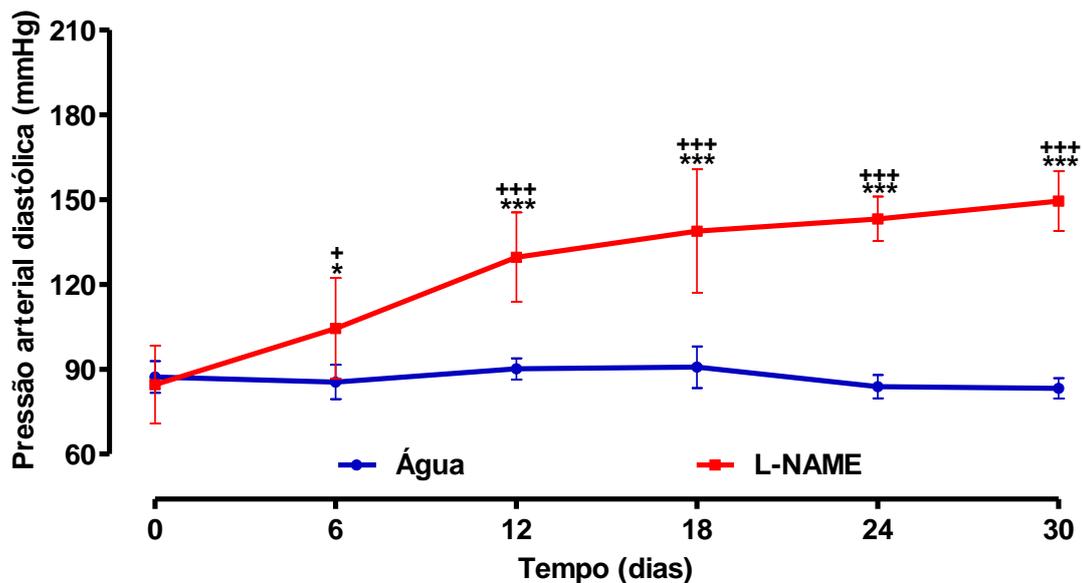
**FIGURA 49** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. \*\*\*P < 0,001 em relação ao Controle; +++P < 0,001 em relação ao dia 0 no mesmo grupo.

Foi calculada a taxa de aumento da pressão arterial sistólica (TAPAS) observada nos grupos tratados com água e L-NAME durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias). Os dados foram expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. O teste *t* para dados independentes foi usado para comparar os dois grupos de tratamento. Verificou-se que a TAPAS mensurada no grupo L-NAME ( $2,28 \pm 0,48$  mmHg/dia) foi significativamente maior ( $P < 0,0001$ ) que a observada no grupo Água ( $-0,12 \pm 0,32$  mmHg/dia) (Figura 50).

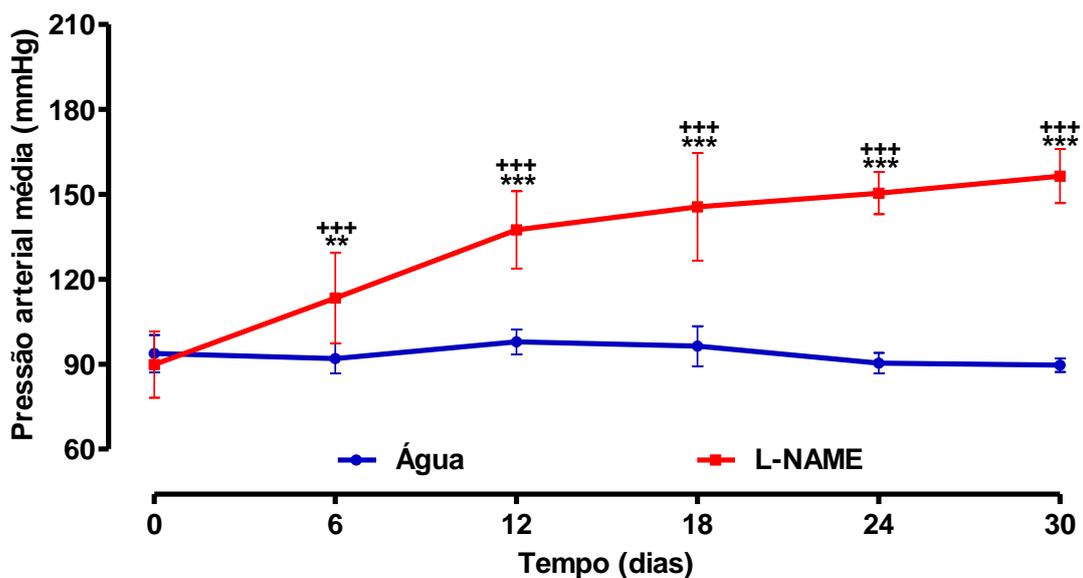


**FIGURA 50** – Taxa de aumento da pressão arterial sistólica (TAPAS) observada nos grupos Água e L-NAME durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. TAPAS grupo L-NAME ( $2,28 \pm 0,48$  mmHg/dia) > grupo Água ( $-0,12 \pm 0,32$  mmHg/dia) (\*\* $P < 0,0001$ ).

Foi constatado que a PAD e a PAM do grupo tratado com L-NAME tiveram aumento estatisticamente significativo quando comparado ao tempo basal (dia 0) e em relação ao grupo controle, tratado com água potável, como mostra as Figuras 51 e 52.

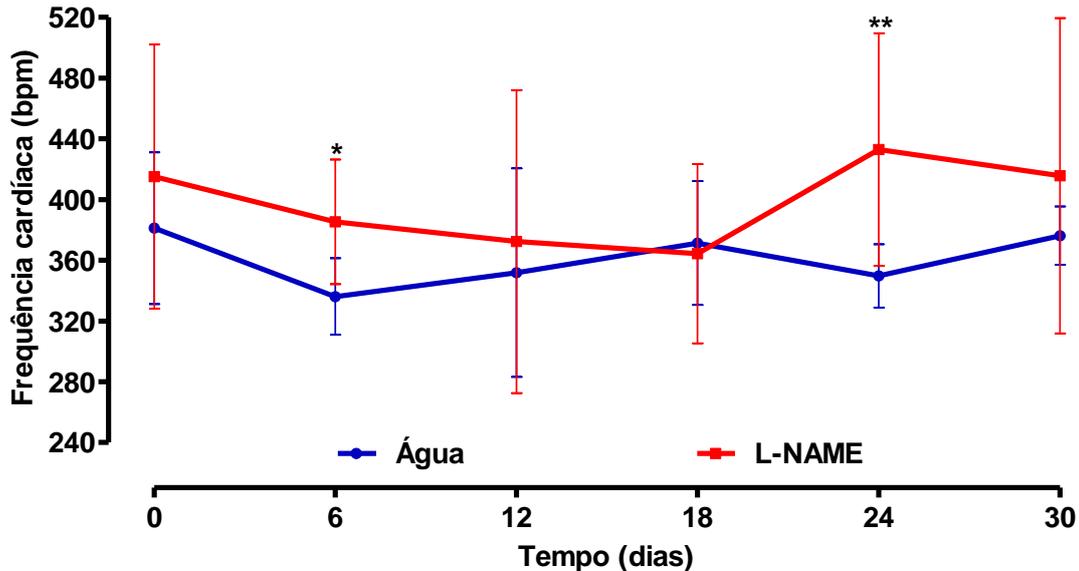


**FIGURA 51** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. \*P = 0,0121; \*\*\*P < 0,001 em relação ao Controle; +P < 0,05; +++P < 0,001 em relação ao dia 0 no mesmo grupo.



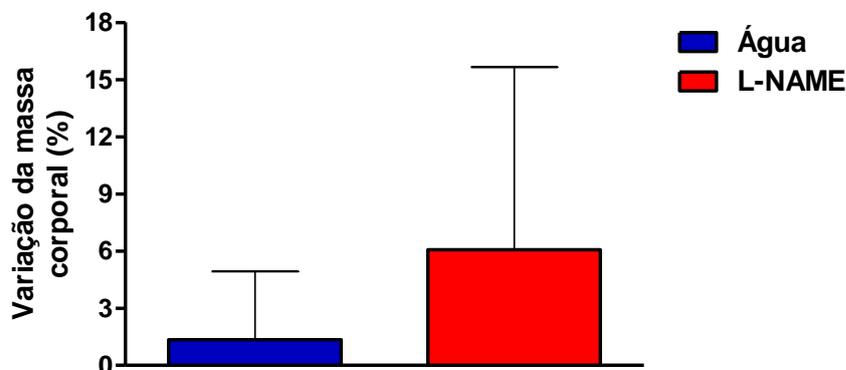
**FIGURA 52** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. \*\*P = 0,0026; \*\*\*P < 0,001 em relação ao Controle; +++P < 0,001 em relação ao dia 0 no mesmo grupo.

Quanto a frequência cardíaca (FC) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS), constatou-se na análise intragrupo, que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dias 6, 12, 18, 24 e 30 e o dia 0 (basal) em nenhum dos grupos. No entanto, houve diferenças pontuais quando considerada a análise intergrupo, em que nos dias 6 e 24, a FC no grupo L-NAME foi maior que do grupo controle (Figura 53).



**FIGURA 53** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de indução da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. Análise intragrupo: não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes. Análise intergrupo: houve diferença estatisticamente significativa nos dias 6 (\* $P = 0,0103$ ) e 24 (\*\* $P = 0,0097$ ).

Em relação à massa corporal dos animais dos grupos Água e L-NAME, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

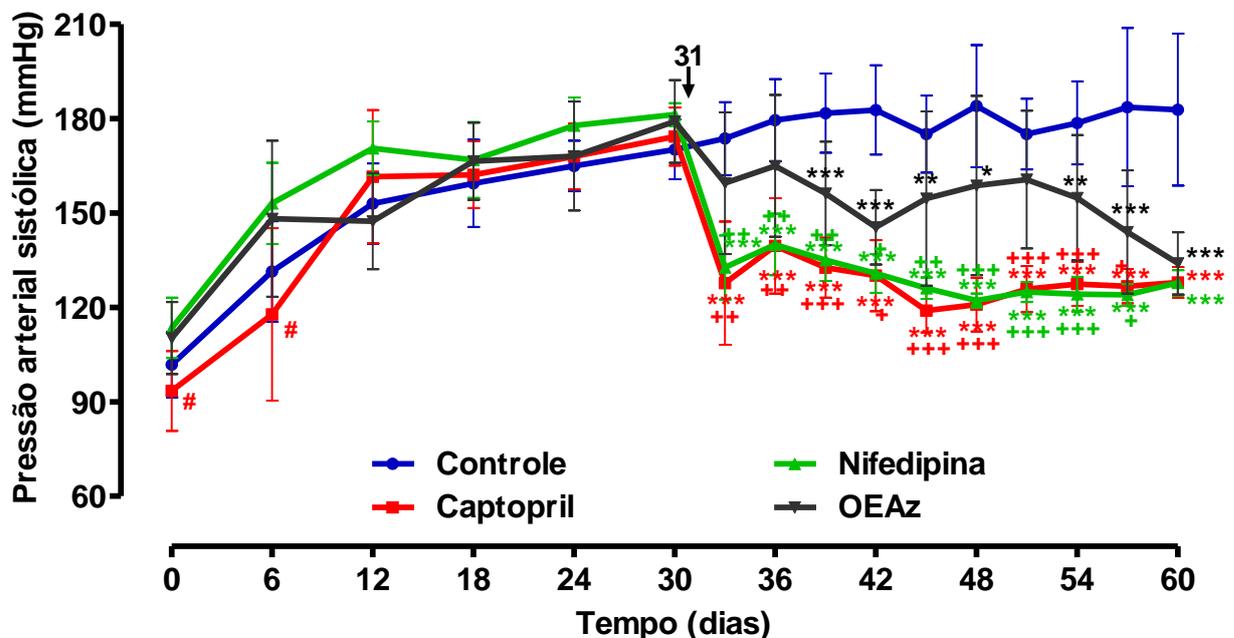


**FIGURA 54** – Variação da massa corporal, em termos percentuais dos grupos Água e L-NAME durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias), em relação ao valor basal. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 ratos do grupo Controle e 9 animais do grupo L-NAME. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,2085$ ) entre os grupos: L-NAME ( $6,07 \pm 9,58\%$ ); Água ( $1,34 \pm 3,59\%$ ).

#### 4.2.2 Análise da pressão arterial sistólica

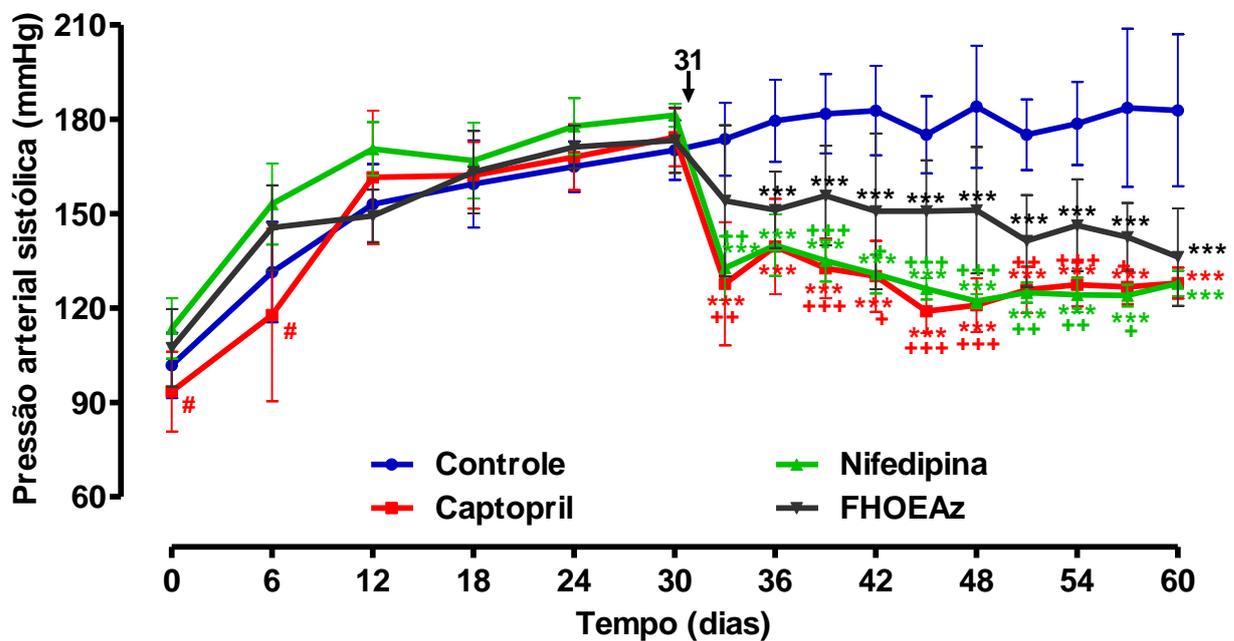
A pressão arterial sistólica (PAS) foi monitorada nos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de pré-tratamento ou indução da HAS, correspondendo aos primeiros 30 dias, e a fase de tratamento (31º ao 60º dias). Para a PAS, a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os grupos em cada tempo. A seta na Figura marca o início dos tratamentos, correspondendo ao 31º dia do experimento.

Analisando o comportamento temporal da PAS no grupo tratado com OEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou no 9º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se num padrão um pouco irregular até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do OEAz em todos os dias avaliados (Figura 55).



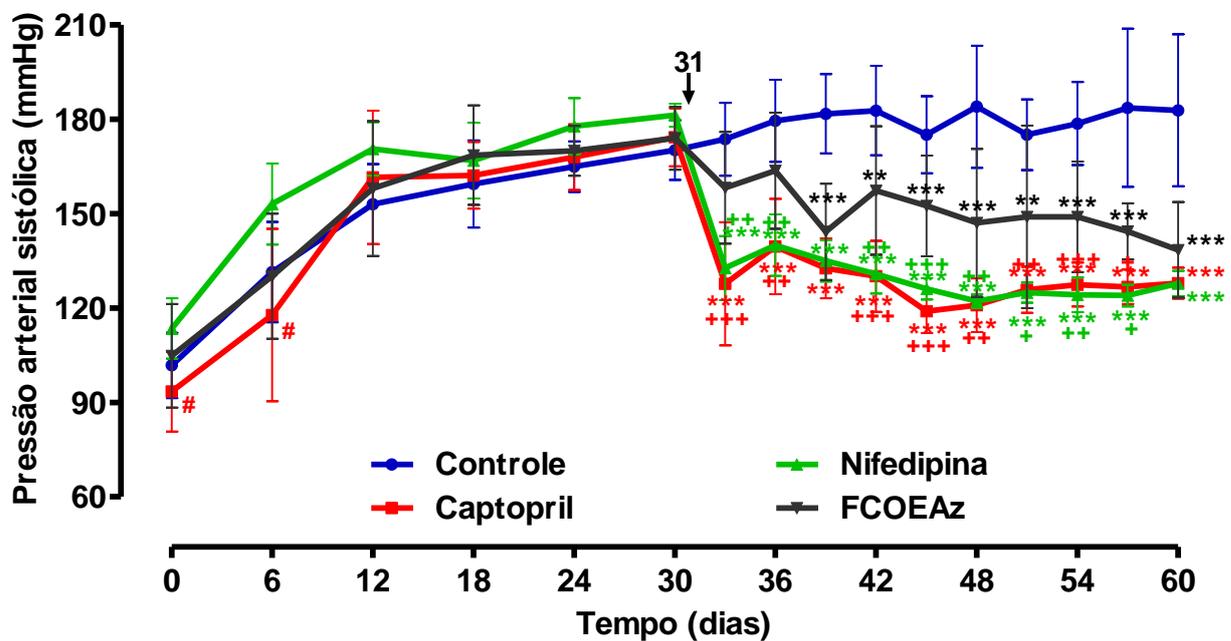
**FIGURA 55** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos EOAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina e OEAz; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação ao OEAz.

A análise do comportamento temporal da PAS no grupo tratado com FHOEAz mostrou que o efeito hipotensor iniciou no 36º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FHOEAz em todos os dias avaliados (Figura 56).



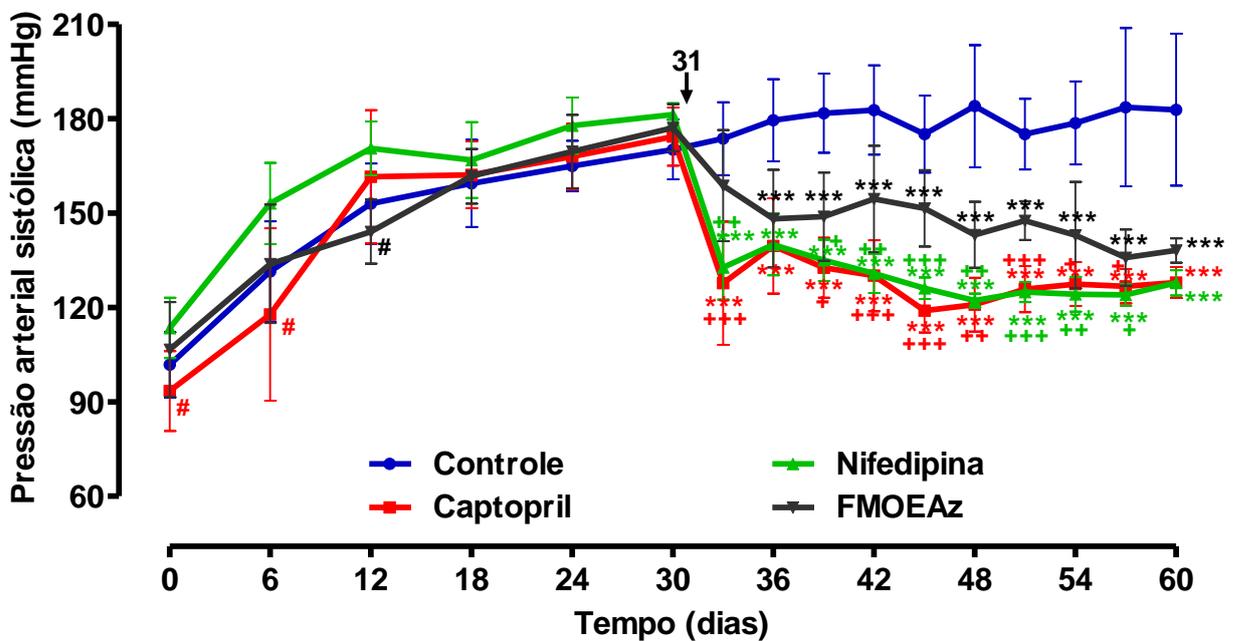
**FIGURA 56** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. # $P < 0,05$  versus Nifedipina e FHOEAz; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FHOEAz.

A análise do comportamento temporal da PAS no grupo tratado com FCOEAz mostrou que o efeito hipotensor iniciou no 39º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FCOEAz em todos os dias avaliados (Figura 57).



**FIGURA 57** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FCOEAz.

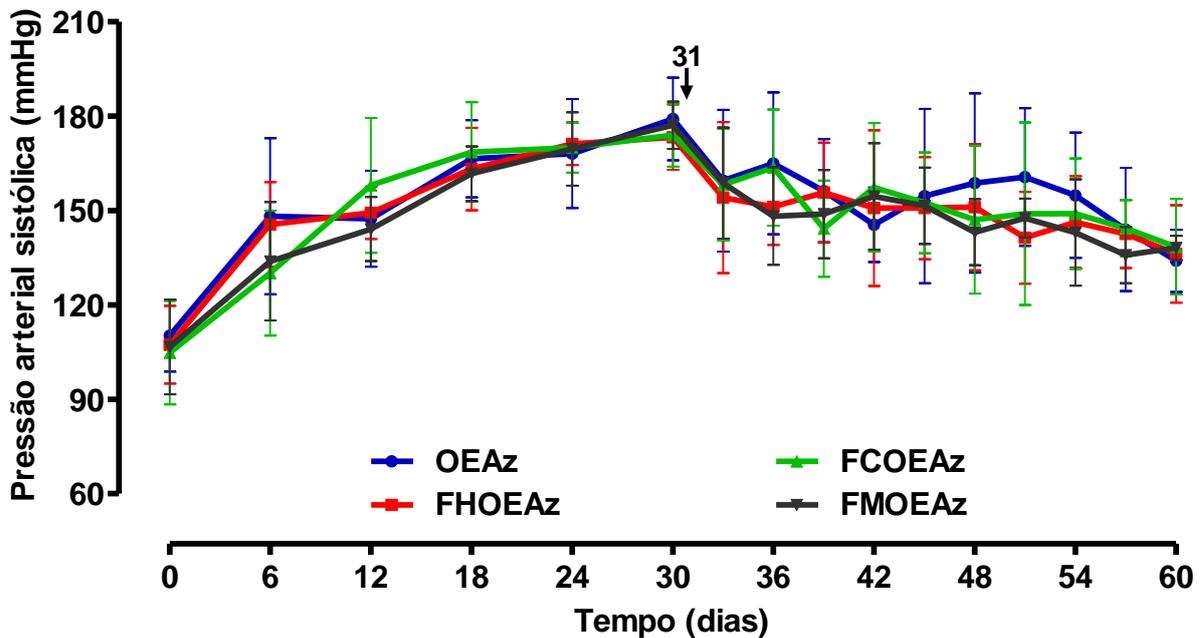
A análise do comportamento temporal do grupo tratado com FMOEAz mostrou que o efeito hipotensor iniciou no 36º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se constante até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FMOEAz em todos os dias avaliados. A partir do gráfico dessa análise pôde-se constatar que a FMOEAz possuiu pontos com valores de maior significância estatística (Figura 58).



**FIGURA 58** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FMOEAz.

Foi realizada a análise da progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. A hipertensão arterial foi induzida e mantida pela administração crônica de L-NAME durante 60 dias, sendo que a partir do 31º dia foram administradas as substâncias em estudo.

Constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 59).

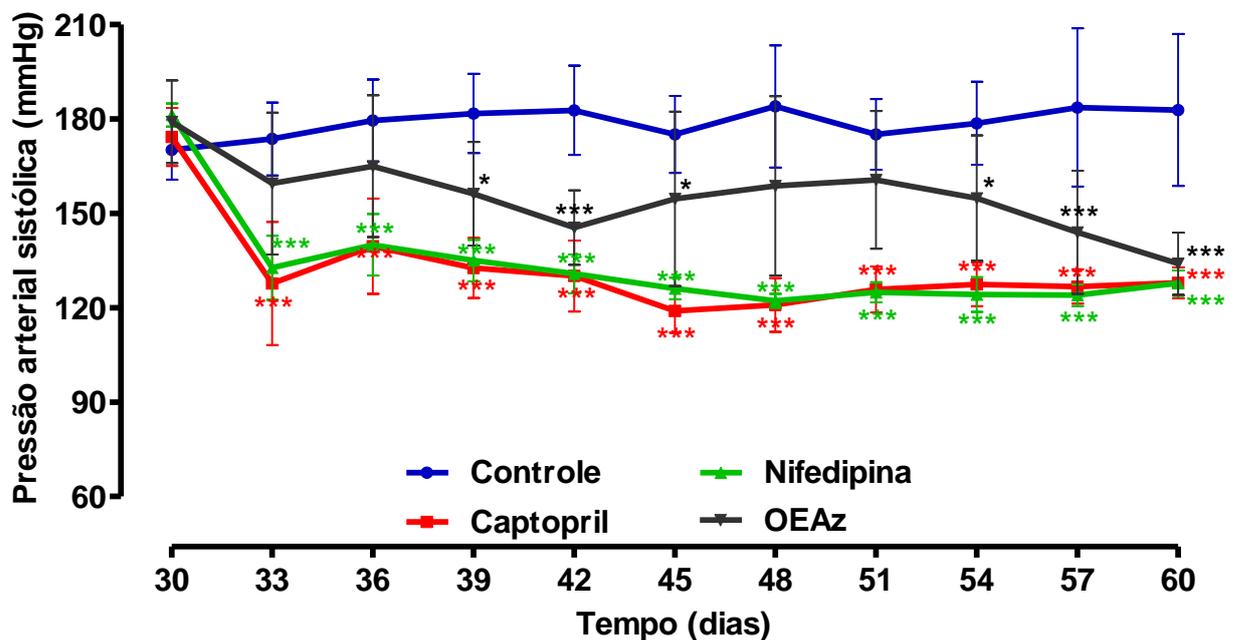


**FIGURA 59** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Foi realizada a análise do comportamento temporal da pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (31<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias), em relação ao basal (30<sup>o</sup> dia).

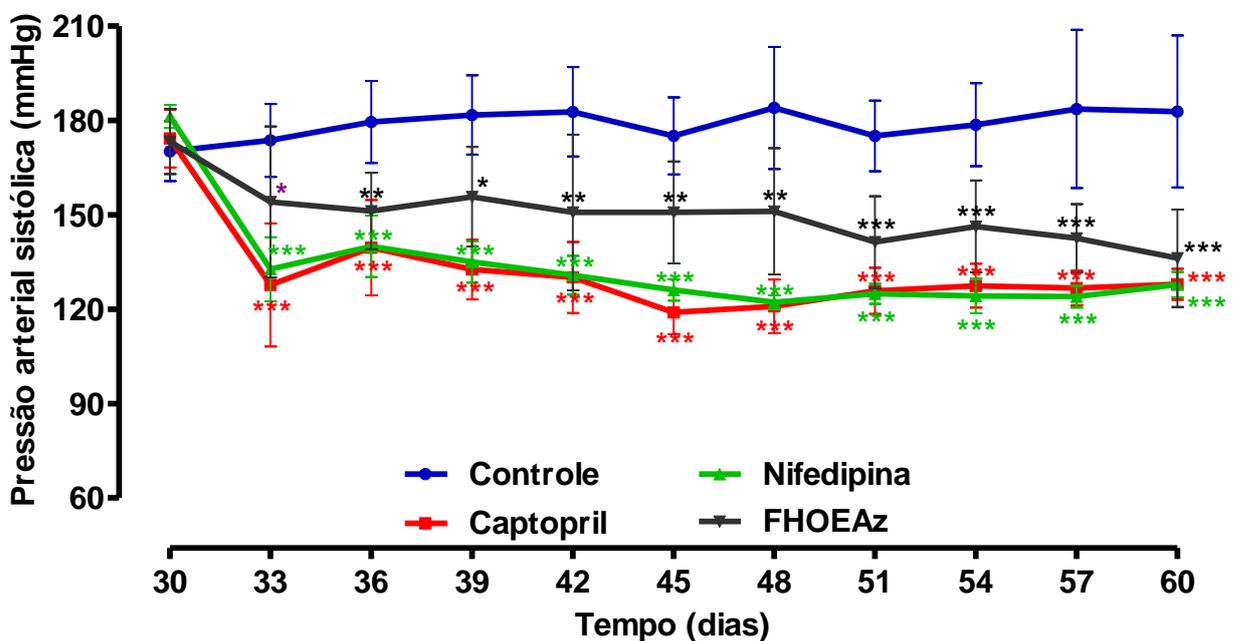
A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi usada para comparar os diversos tempos estudados com o valor basal da PAS, mensurado no dia 30.

Constatou-se que o OEAz só teve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 39, 45 e 54 ( $P < 0,05$ ) e nos dias 42, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30<sup>o</sup> dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada a partir do 33<sup>o</sup> dia de tratamento, seguindo-se até o 60<sup>o</sup> dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 60.



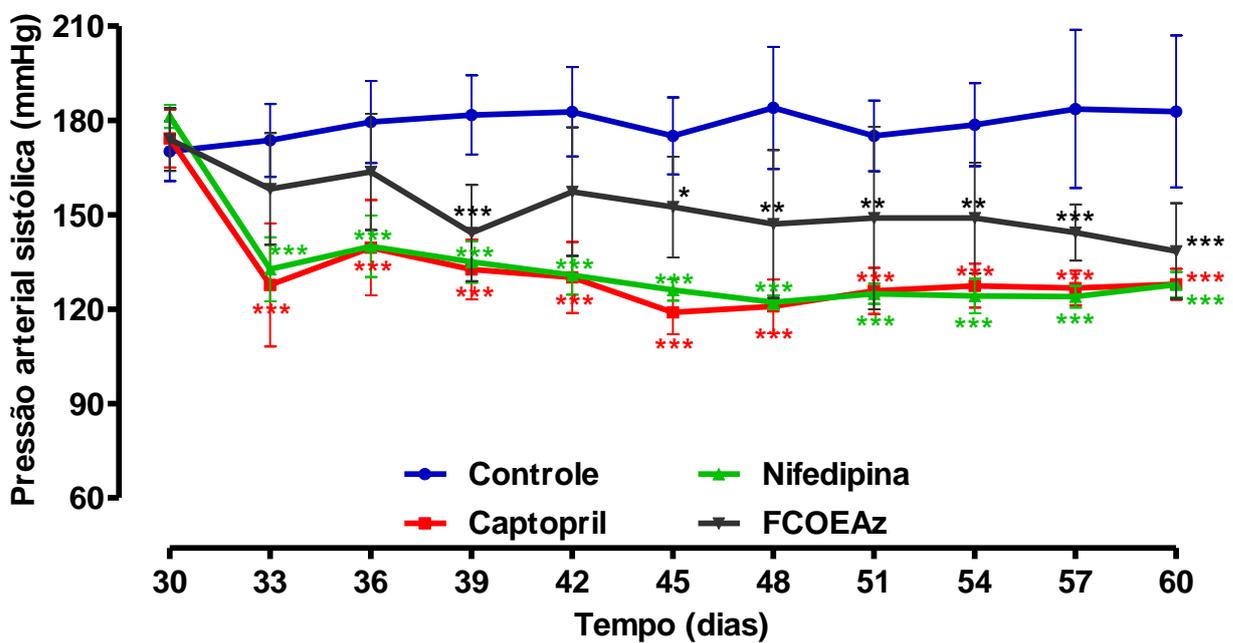
**FIGURA 60** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Na análise da pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com FHOEAz, o efeito hipotensor foi observado de forma estatisticamente significativa nos dias 33, 39 ( $P < 0,05$ ), 36, 42, 45, 48 ( $P < 0,01$ ), 51, 54, 57, 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada desde o 33º dia de tratamento, seguindo-se até o 60º dia (Figura 61).



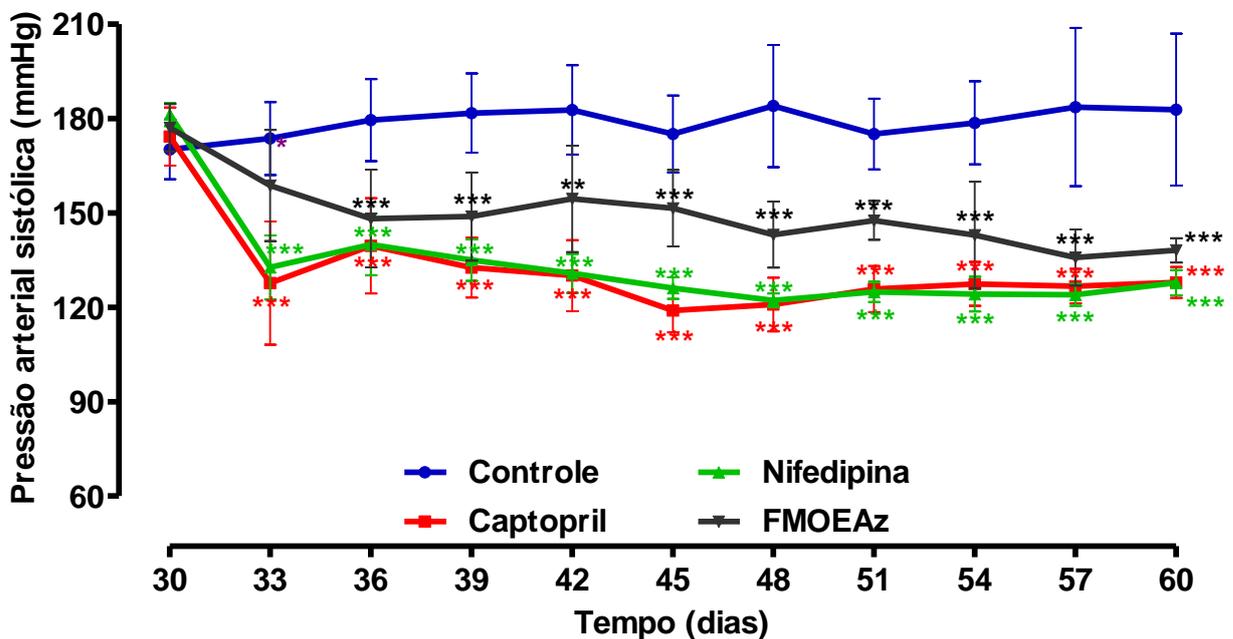
**FIGURA 61** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Na análise da pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com FCOEAz, o efeito hipotensor foi observado de forma estatisticamente significativa nos dias 45 ( $P < 0,05$ ), 48, 51, 54 ( $P < 0,01$ ), 39, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada desde o 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 62.



**FIGURA 62** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

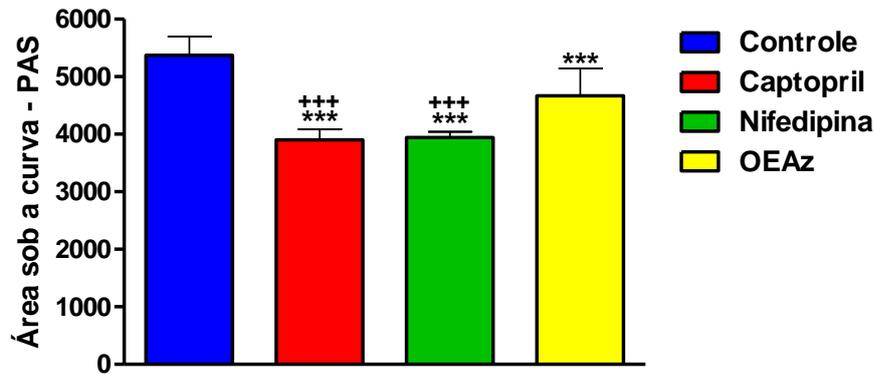
Na análise da pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com FMOEAz, o efeito hipotensor foi observado de forma estatisticamente significativa nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 42 ( $P < 0,01$ ), 36, 39, 45, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada desde o 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 63.



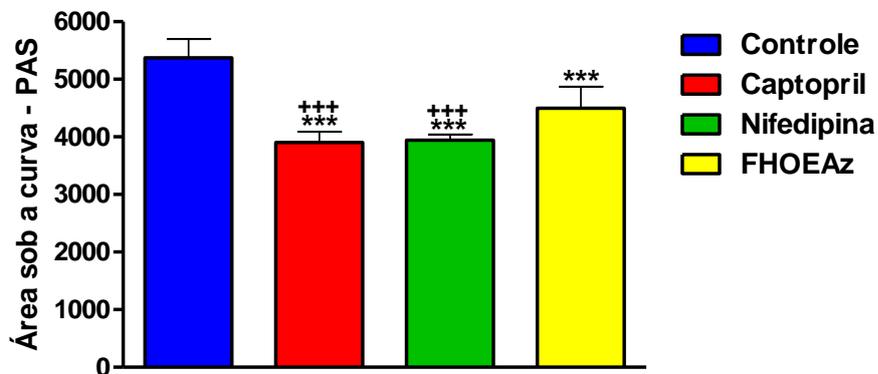
**FIGURA 63** – Progressão temporal da pressão arterial sistólica (PAS) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Foi calculada a área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), uma medida do efeito global dos tratamentos, referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Para tanto, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar dos quatro.

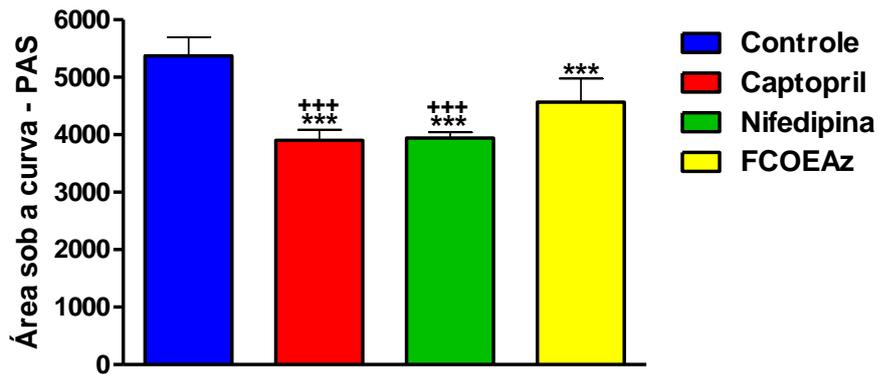
Constatou-se que a área sob a curva referente aos grupos Captopril, Nifedipina, OEAz e frações foram menores que a do grupo controle ( $P < 0,001$ ). Entretanto, as áreas sobre a curva dos grupos Nifedipina e Captopril foram menores que as dos grupos OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz ( $P < 0,001$ ). Estes informações estão representadas nas Figura 64, 65, 66 e 67, respectivamente.



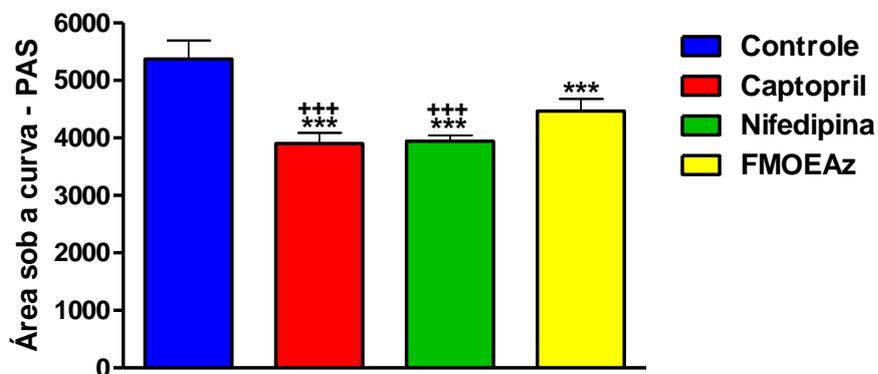
**FIGURA 64** – Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle; +++ $P < 0,001$  versus OEAz.



**FIGURA 65** – Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle; +++ $P < 0,001$  versus FHOEAz.

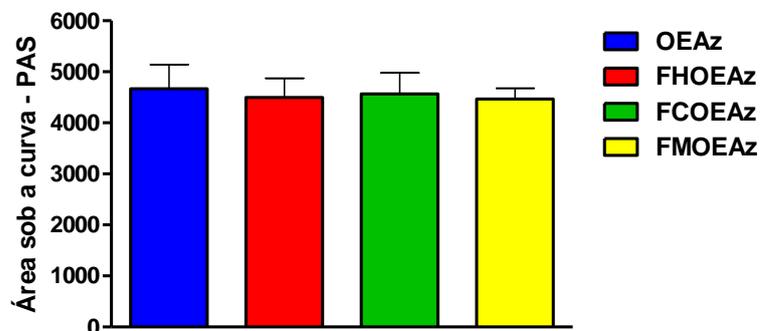


**FIGURA 66** – Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos EOAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\*P < 0,001 versus Controle; +++P < 0,001 versus FCOEAz.



**FIGURA 67** – Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dia), referente aos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos EOAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\*P < 0,001 versus Controle; +++P < 0,001 versus FMOEAz.

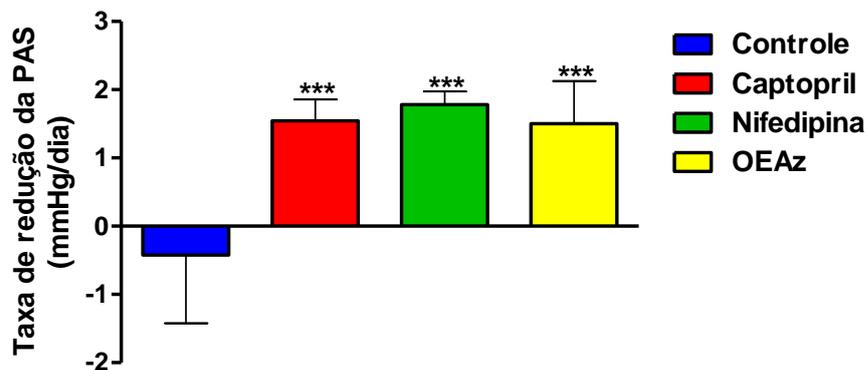
Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz (Figura 68).



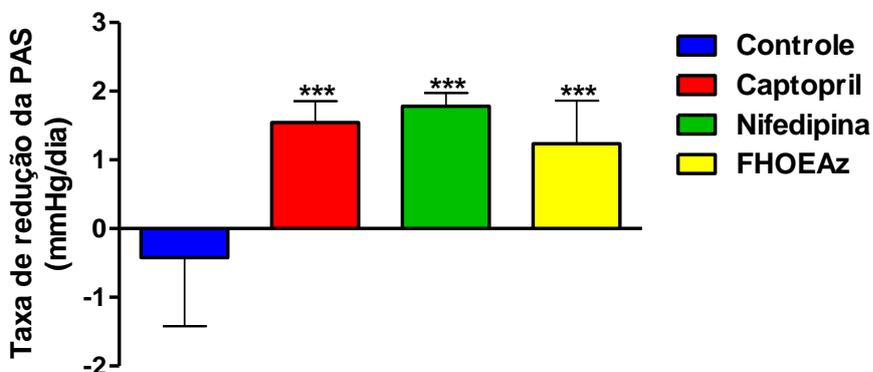
**FIGURA 68** – Área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), referente aos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento.

Obteve-se a taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) que representa a velocidade do efeito hipotensor proporcionado por um determinado tratamento. Foi calculada a taxa de redução da PAS dos grupos Controle negativo (água destilada), controles positivos (Captopril e Nifedipina) e OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (30<sup>o</sup> a 60<sup>o</sup> dias). A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os grupos.

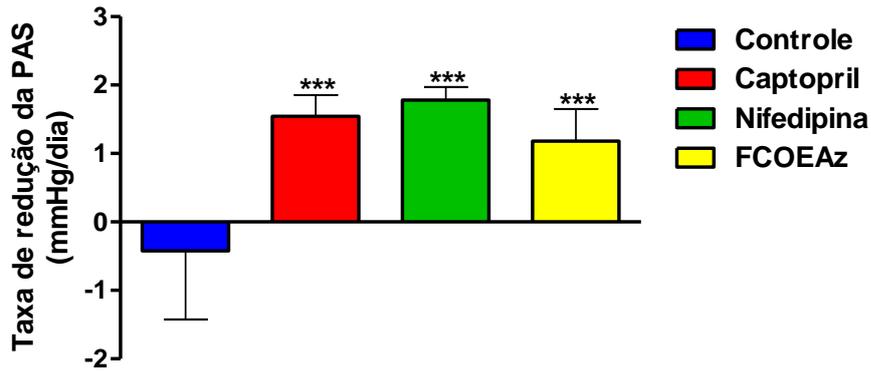
Constatou-se que a taxa de redução da PAS foi significativamente maior nos grupos Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz ( $P < 0,001$ ) quando comparado ao Controle. Esses dados estão expressos na Figura 69, 70, 71 e 72 respectivamente.



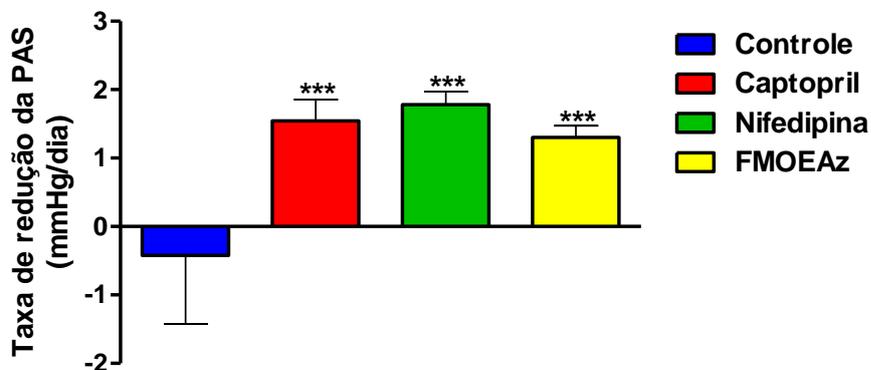
**FIGURA 69** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz durante a fase de tratamento (30<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos EOAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle.



**FIGURA 70** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz durante a fase de tratamento (30<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle.

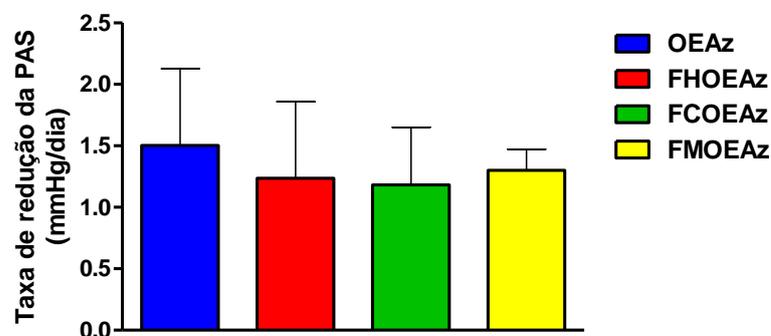


**FIGURA 71** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\*P < 0,001 versus Controle.



**FIGURA 72** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\*P < 0,001 versus Controle.

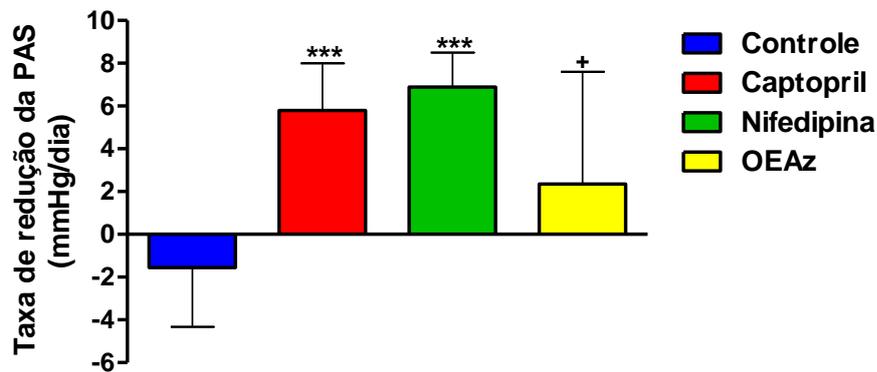
Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz (Figura 73).



**FIGURA 73** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) observada nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (30° ao 60° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento.

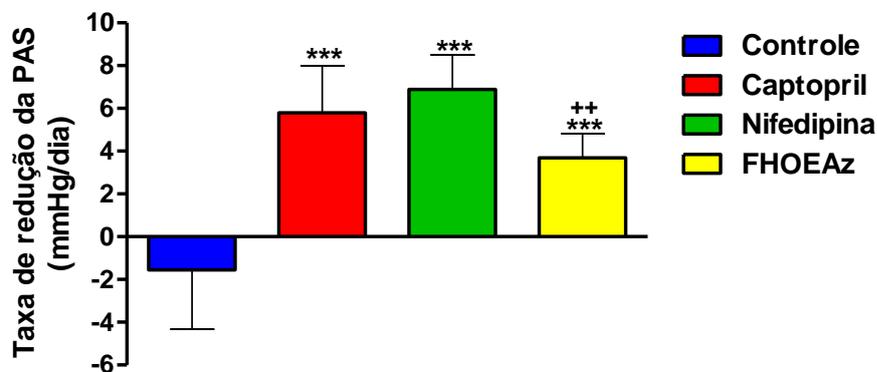
Foi obtida a taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) durante os primeiros 6 dias de tratamento (30° ao 36° dias), visando observar o efeito agudo dos tratamentos. A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os grupos.

Observou-se que a taxa de redução da PAS foi maior nos grupos Captopril e Nifedipina, quando comparado ao controle ( $P < 0,001$ ), enquanto a taxa de redução da PAS do OEAz foi inferior ao grupo Nifedipina ( $P < 0,05$ ) (Figura 74).



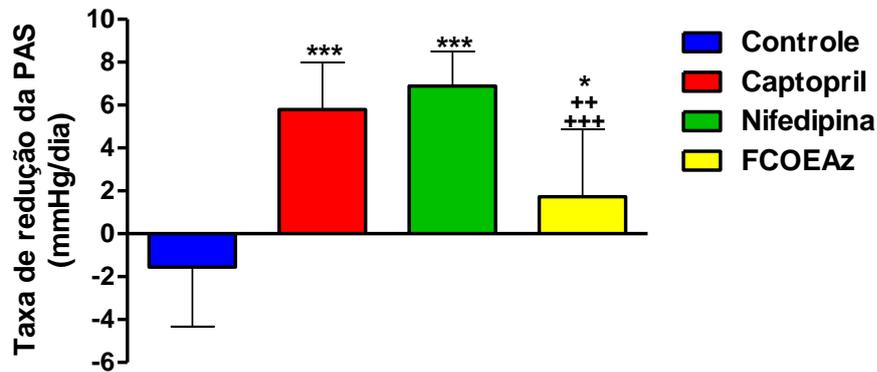
**FIGURA 74** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle; + $P < 0,05$  em relação à Nifedipina.

A taxa de redução da PAS foi maior nos grupos Captopril, Nifedipina e FHOEAz, quando comparado ao controle ( $P < 0,001$ ), enquanto que no grupo FHOEAz foi inferior ao grupo Nifedipina ( $P < 0,05$ ) (Figura 75).



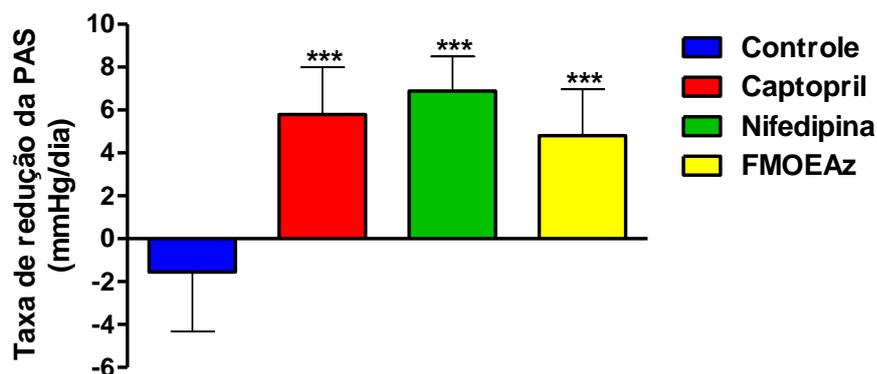
**FIGURA 75** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle; ++ $P < 0,01$  em relação à Nifedipina.

A taxa de redução da PAS foi maior nos grupos Captopril e Nifedipina ( $P < 0,001$ ) e FCOEAz ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao controle, enquanto que no grupo FMOEAz foi inferior ao grupo Captopril ( $P < 0,01$ ) e Nifedipina ( $P < 0,001$ ) (Figura 76).



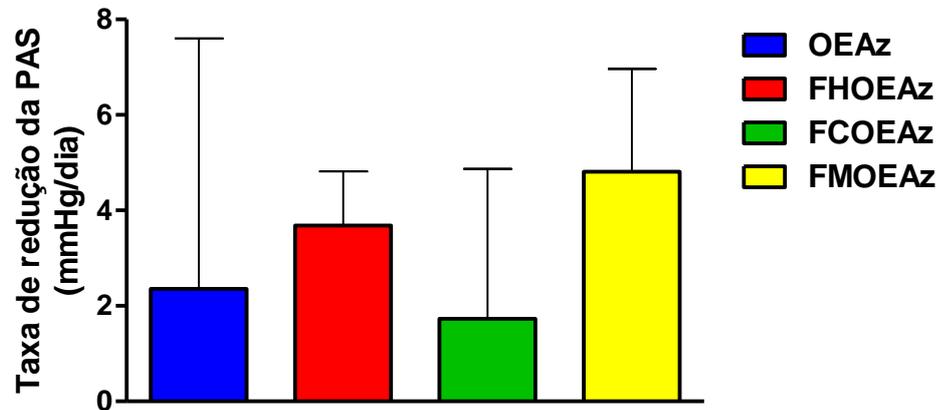
**FIGURA 76** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° a 36° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; ++ $P < 0,01$  versus Captopril; +++ $P < 0,001$  versus Nifedipina.

A taxa de redução da PAS foi maior nos grupos Captopril, Nifedipina e FMOEAz, quando comparado ao controle ( $P < 0,001$ ) (Figura 77).



**FIGURA 77** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° a 36° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*\*\* $P < 0,001$  versus Controle.

Quando comparadas as taxas de redução da PAS para os grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento (Figura 78).

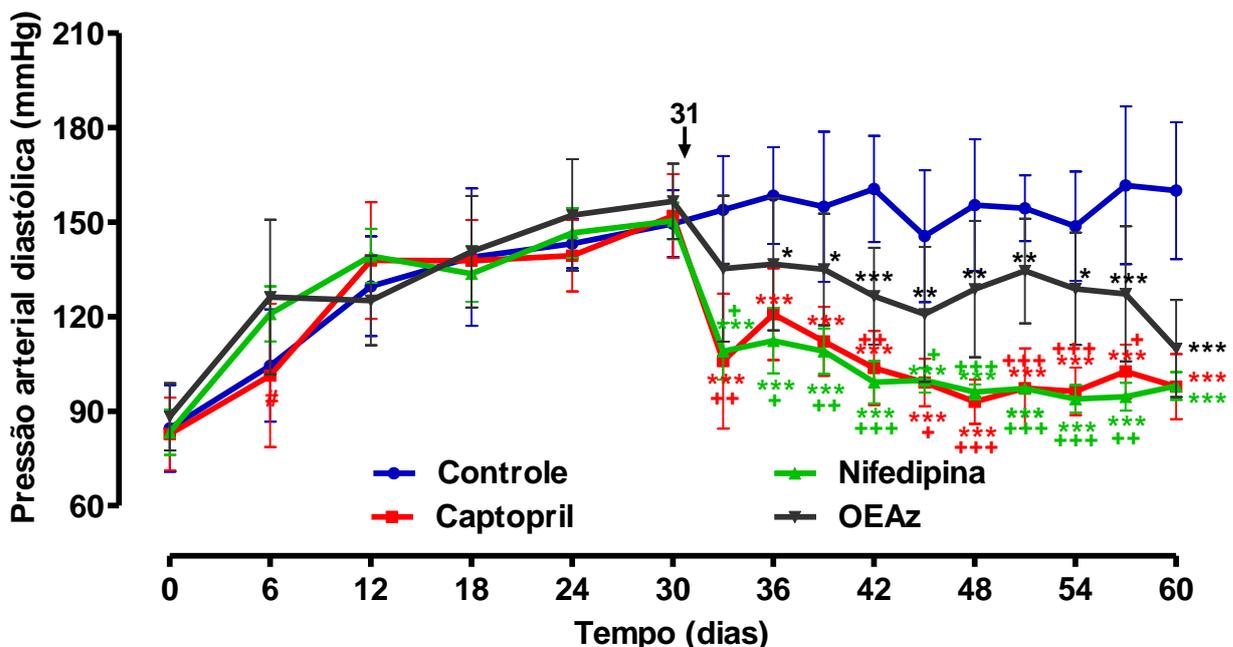


**FIGURA 78** – Taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos EOAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante os primeiros 6 dias da fase de tratamento (30° ao 36° dias). Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento.

#### 4.2.3 Análise da pressão arterial diastólica

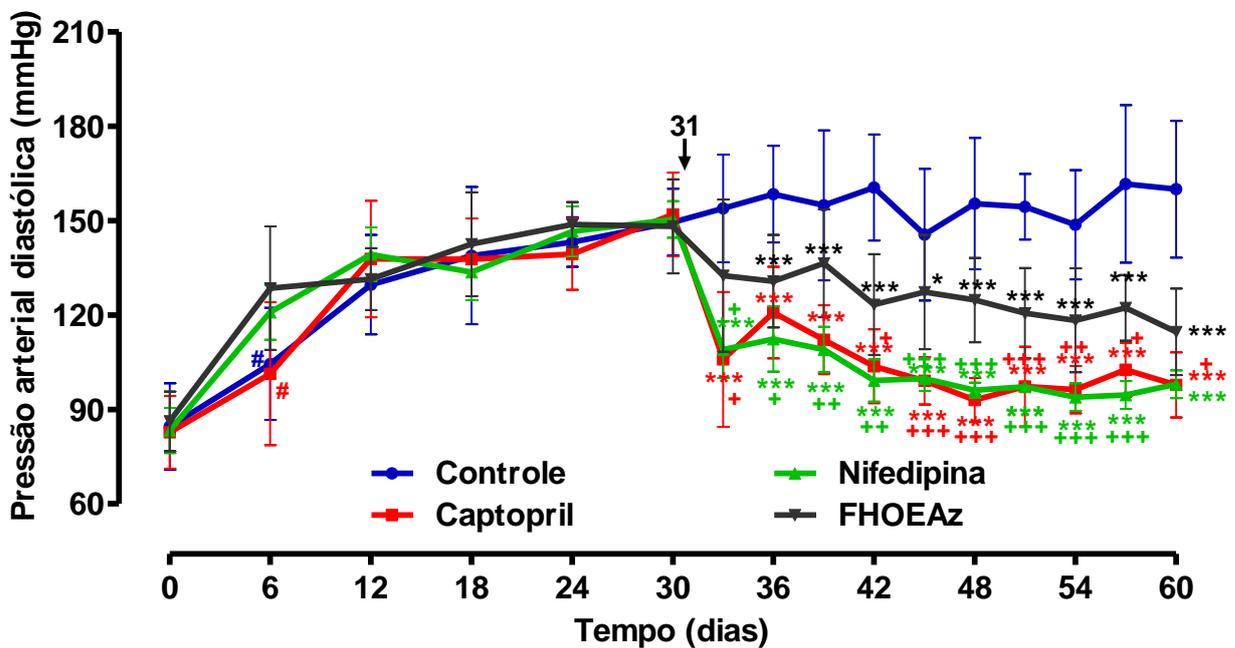
A pressão arterial diastólica (PAD) foi monitorada nos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de pré-tratamento, correspondendo aos primeiros 30 dias, e a fase de tratamento (31<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias). A hipertensão arterial foi induzida e mantida pela administração crônica de L-NAME durante 60 dias, sendo que a partir do 31<sup>o</sup> dia foram administradas as substâncias em estudo. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparar os quatro grupos em cada tempo. A seta na Figura a seguir marca o início dos tratamentos, correspondendo ao 31<sup>o</sup> dia do experimento.

Analisando o comportamento temporal da PAD no grupo tratado com OEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 36<sup>o</sup> dia de tratamento ( $P < 0,05$  em relação ao Controle), mantendo-se num padrão um pouco irregular até o 60<sup>o</sup> dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33<sup>o</sup> dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do OEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 79.



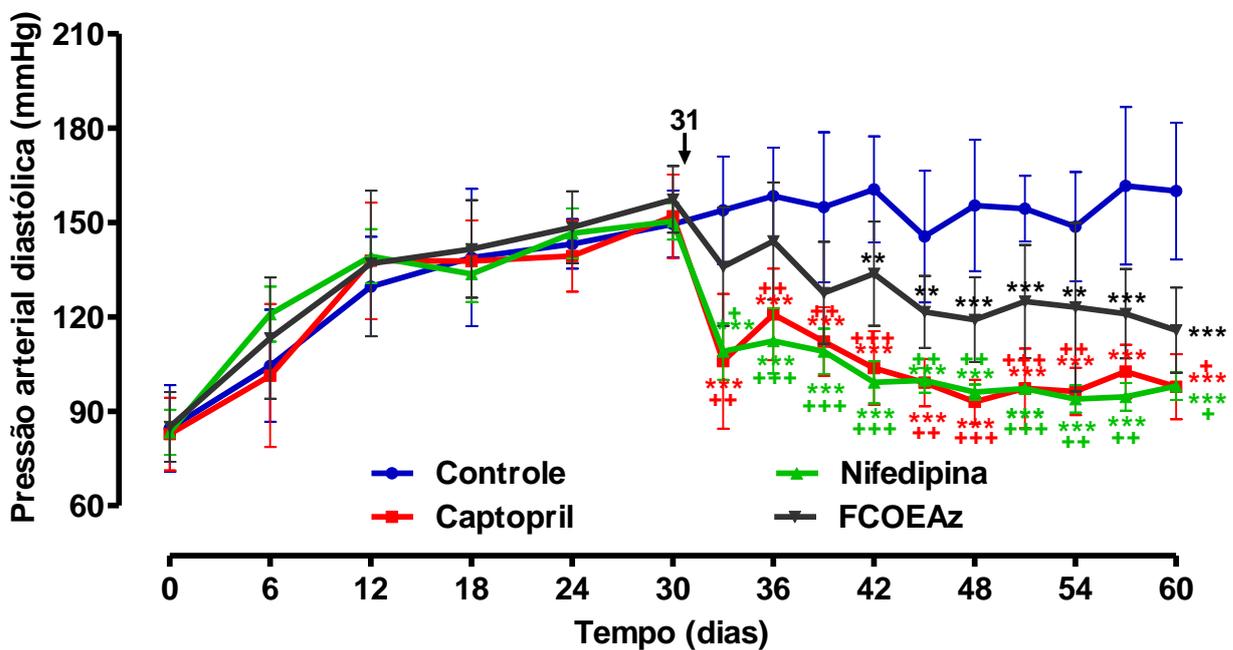
**FIGURA 79** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus OEAz; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação ao OEAz.

Analisando o comportamento temporal da PAD no grupo tratado com FHOEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 33º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se em padrão decrescente até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do grupo tratado com FHOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 80.



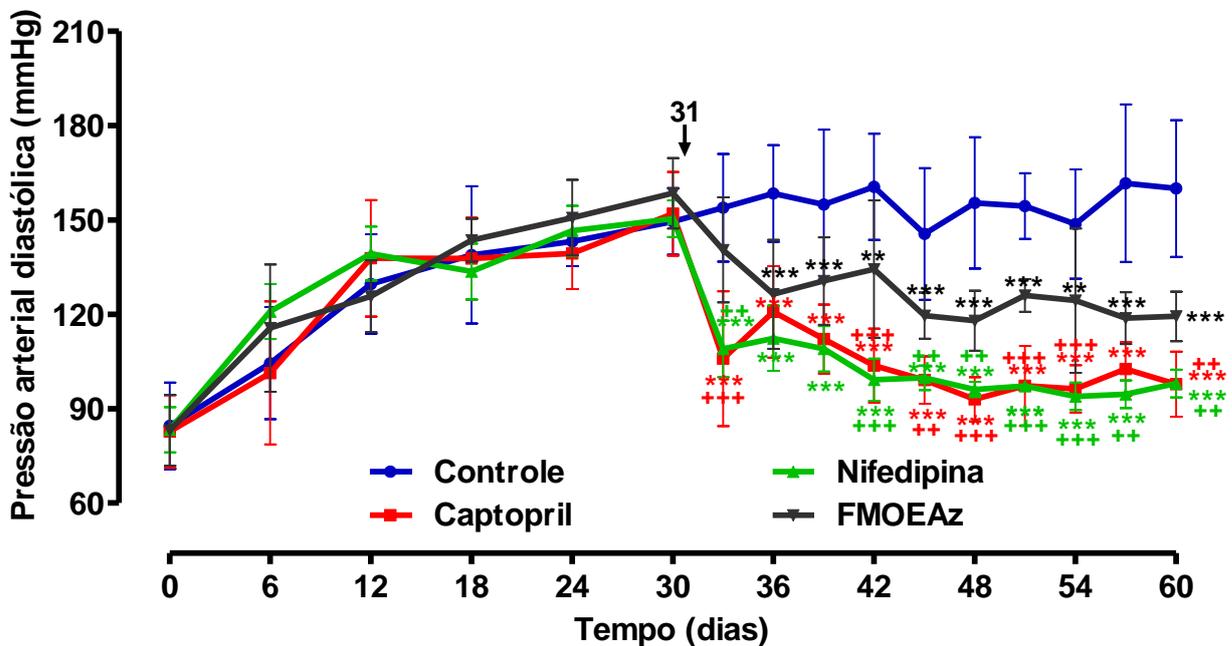
**FIGURA 80** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. # $P < 0,05$  versus FHOEAz; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FHOEAz.

Analisando o comportamento temporal da PAD no grupo tratado com FCOEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 42º dia de tratamento ( $P < 0,01$  em relação ao Controle), mantendo-se em padrão decrescente até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do FCOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 81.



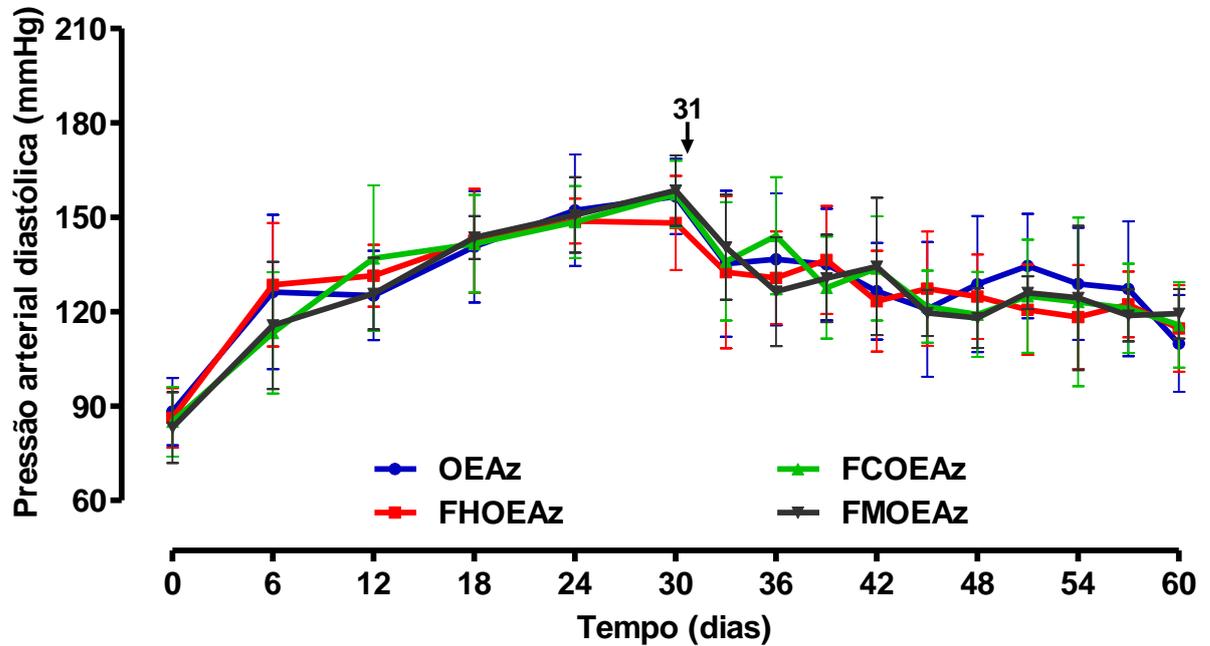
**FIGURA 81** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FCOEAz.

Analisando o comportamento temporal da PAD no grupo tratado com FMOEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 36º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), mantendo-se em padrão decrescente até o 60º dia do experimento. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do FMOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 82.



**FIGURA 82** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FMOEAz.

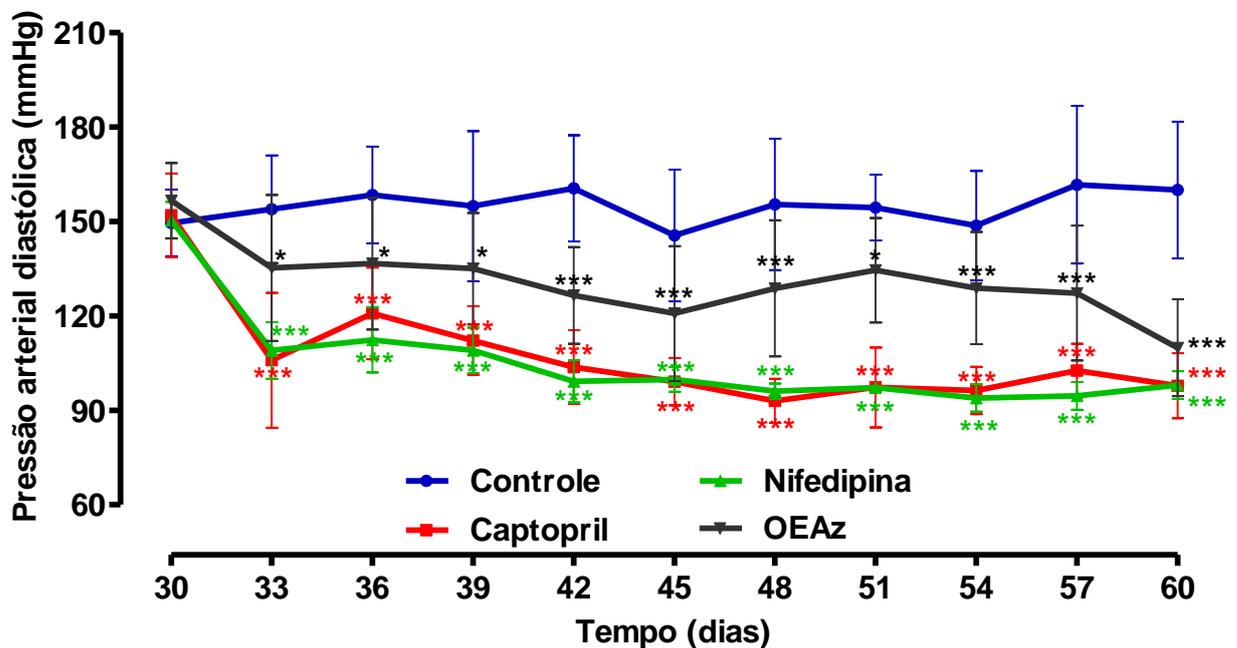
Quando comparados os grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 83).



**FIGURA 83** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

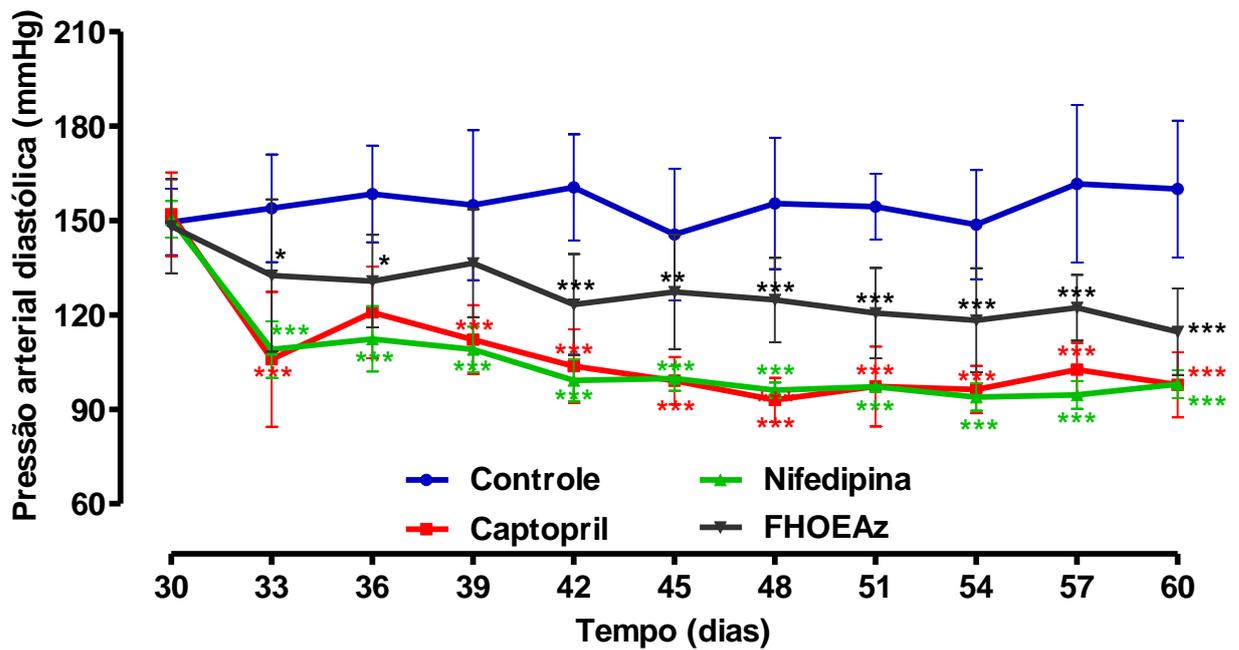
Foi realizada a análise do comportamento temporal da pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (31º ao 60º dias), em relação ao basal (30º dia). A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, foi usada para comparar os diversos tempos estudados com o valor basal da PAS, mensurado no dia 30.

Constatou-se que em relação à PAD, no grupo tratado com OEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33, 36, 39 e 51 ( $P < 0,05$ ) e nos dias 42, 45, 48, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 84.



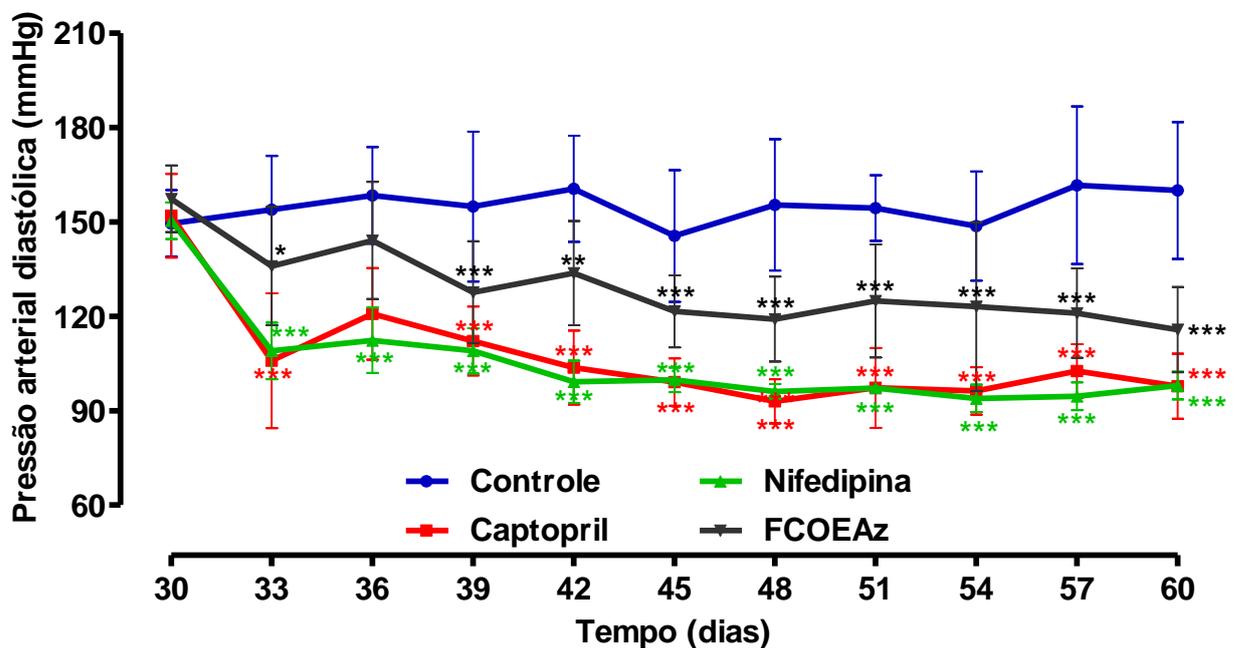
**FIGURA 84** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAD no grupo tratado com FHOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33, 36 ( $P < 0,05$ ), 45 ( $P < 0,01$ ), e nos dias 42, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 85.



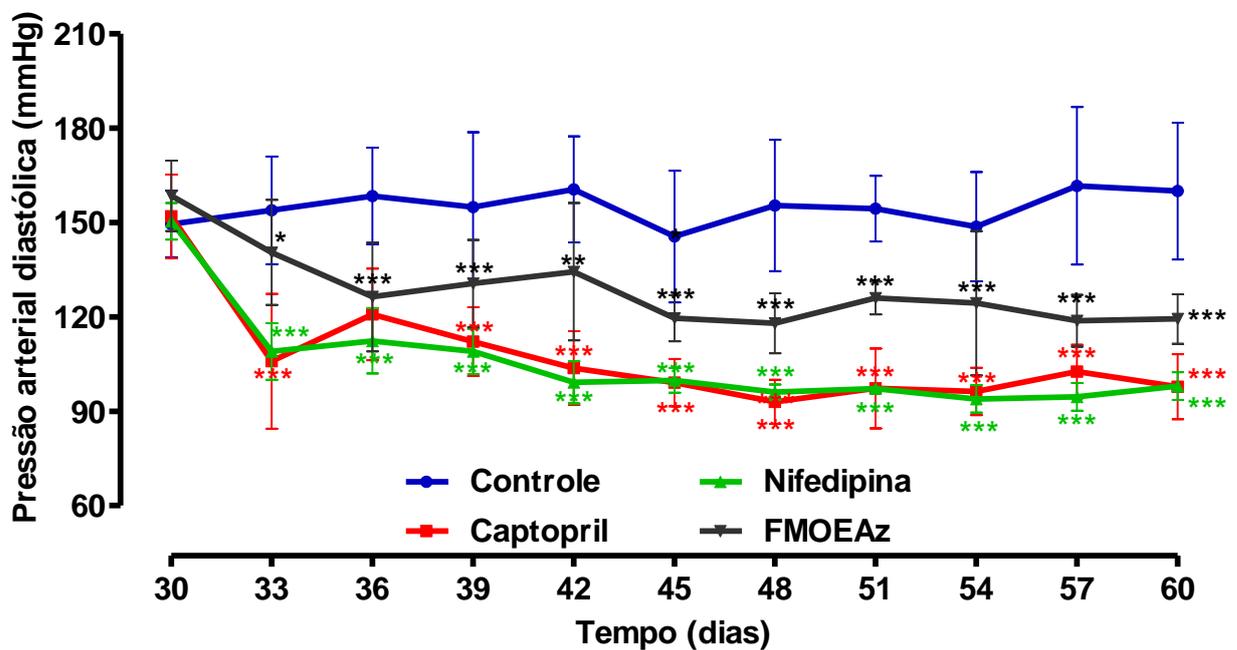
**FIGURA 85** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAD no grupo tratado com FCOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 42 ( $P < 0,01$ ), e nos dias 39, 45, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 86.



**FIGURA 86** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAD no grupo tratado com FMOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 42 ( $P < 0,01$ ), e nos dias 36, 39, 45, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 87.

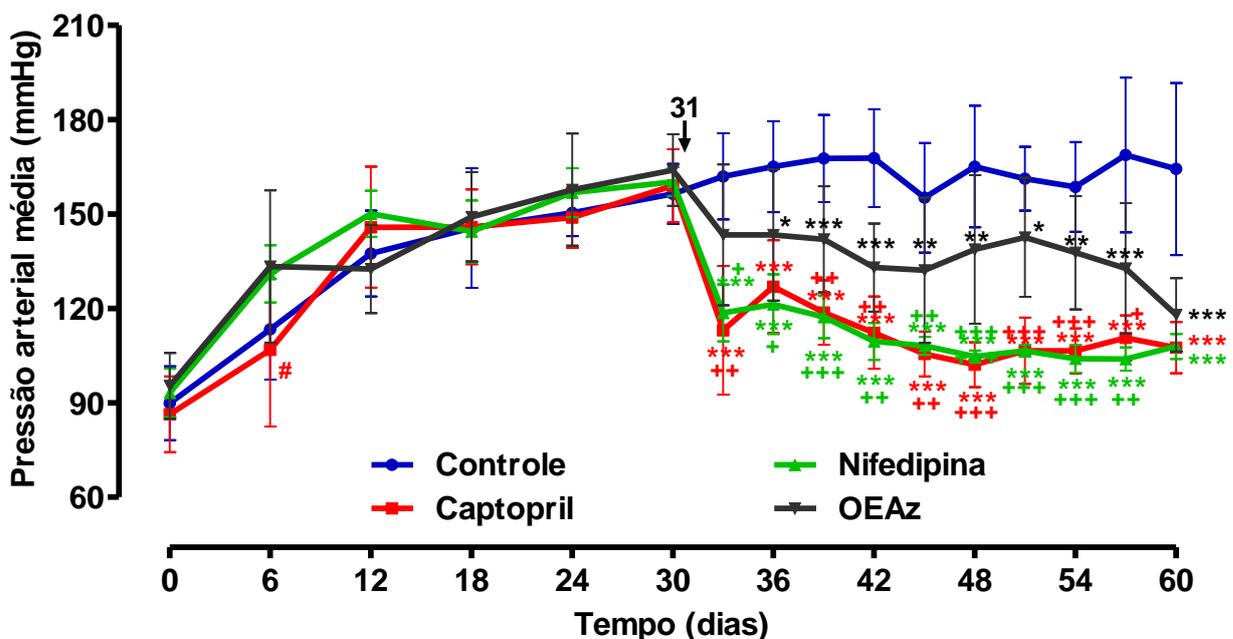


**FIGURA 87** – Progressão temporal da pressão arterial diastólica (PAD) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

#### 4.2.4 Análise da pressão arterial média

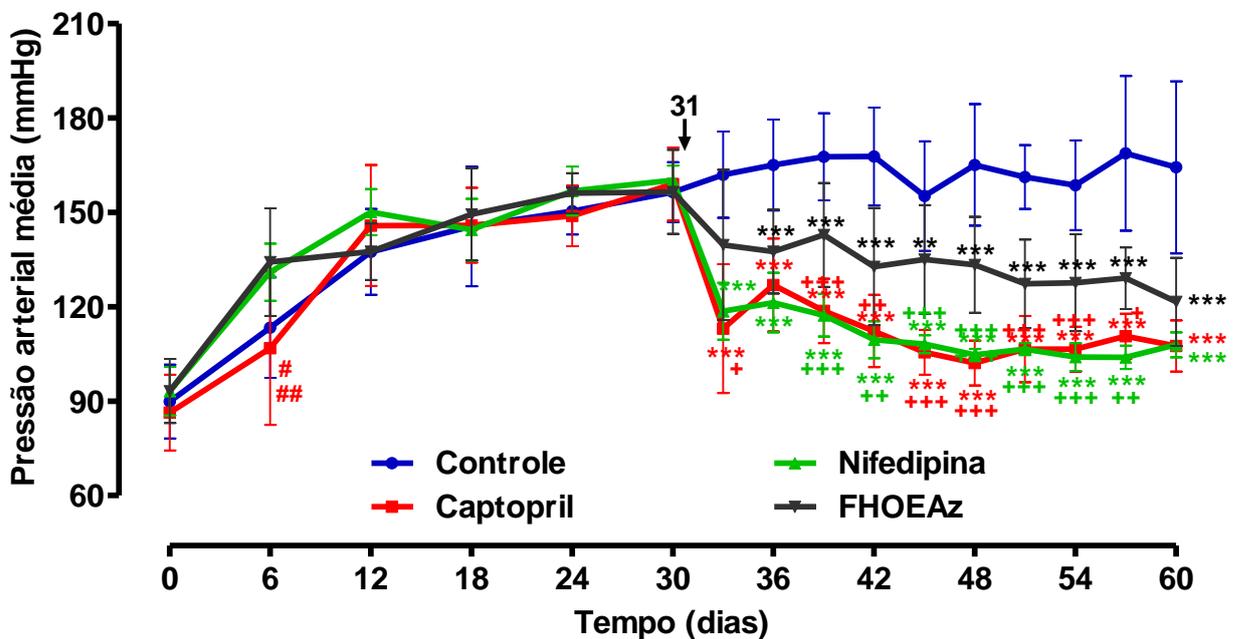
A pressão arterial média (PAM) foi monitorada nos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de pré-tratamento, correspondendo aos primeiros 30 dias, e a fase de tratamento (31<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar os quatro grupos em cada tempo. A seta na Figura a seguir marca o início dos tratamentos, correspondendo ao 31<sup>o</sup> dia do experimento.

Analisando o comportamento temporal da PAM no grupo tratado com OEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 36<sup>o</sup> dia de tratamento ( $P < 0,05$  em relação ao Controle), mantendo-se num padrão um pouco irregular até o 60<sup>o</sup> dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33<sup>o</sup> dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a do OEAz em todos os dias avaliados (Figura 88).



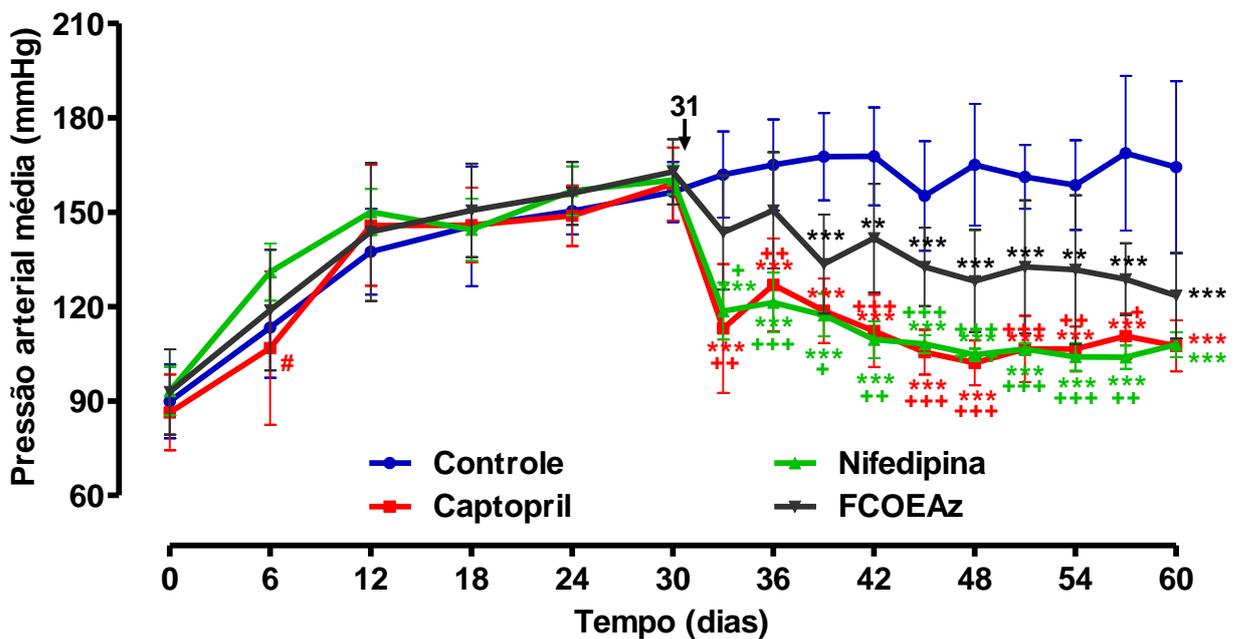
**FIGURA 88** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina e OEAz; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação ao OEAz.

Analisando o comportamento temporal da PAM no grupo tratado com FHOEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 36º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), permanecendo até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FHOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 89.



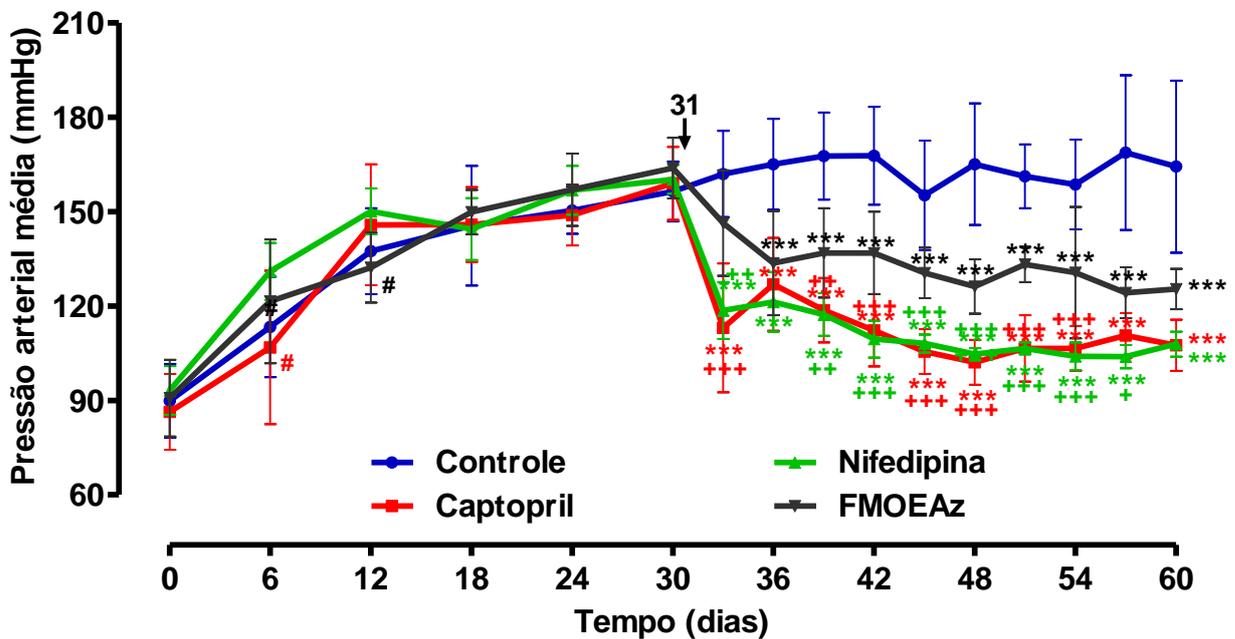
**FIGURA 89** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. #P < 0,05 versus Nifedipina; ##P < 0,01 versus FHOEAz; \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao Controle; +P < 0,05; ++P < 0,01; +++P < 0,001 em relação à FHOEAz.

A análise do comportamento temporal da PAM no grupo tratado com FCOEAz, constatou que o efeito hipotensor iniciou-se no 39º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), permanecendo até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FCOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 90.



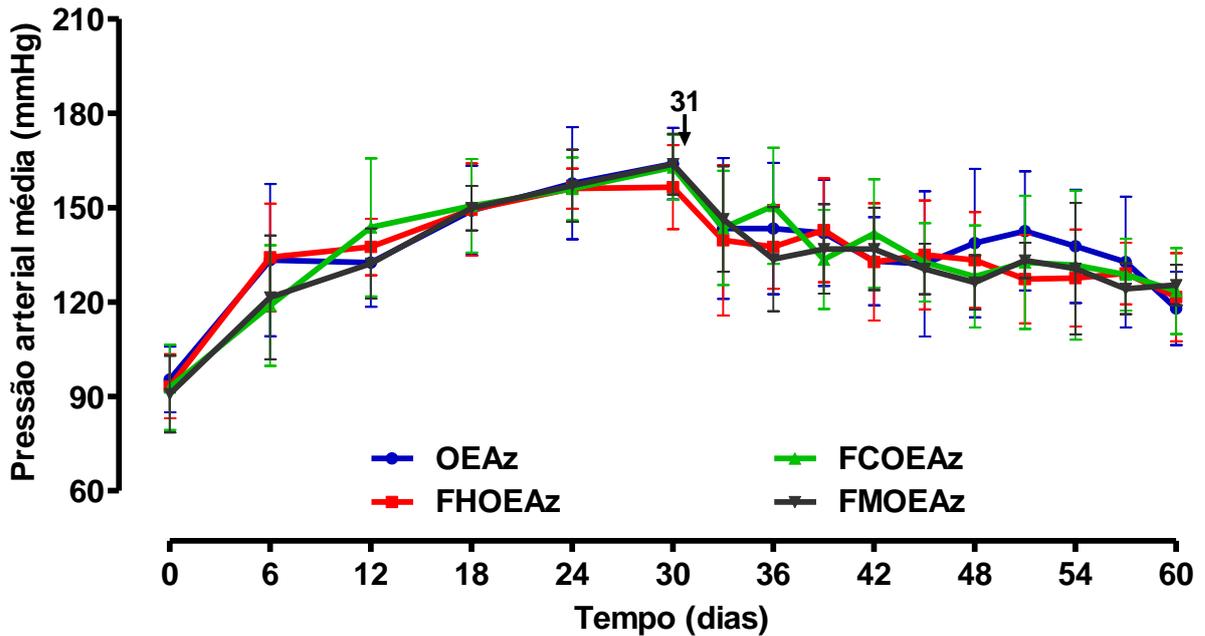
**FIGURA 90** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FCOEAz.

Analisando o comportamento temporal da PAM no grupo tratado com FMOEAz, constatou-se que o efeito hipotensor iniciou-se no 36º dia de tratamento ( $P < 0,001$  em relação ao Controle), permanecendo até o 60º dia. Entretanto, o efeito hipotensor nos dois controles positivos (Captopril e Nifedipina) foi observado a partir do 33º dia, se mantendo constante até o final do experimento. Ademais, a atividade hipotensora dos controles positivos foi significativamente maior que a da FMOEAz em todos os dias avaliados. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 91.



**FIGURA 91** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. # $P < 0,05$  versus Nifedipina; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao Controle; + $P < 0,05$ ; ++ $P < 0,01$ ; +++ $P < 0,001$  em relação à FMOEAz.

Foi realizada a análise da progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 92).

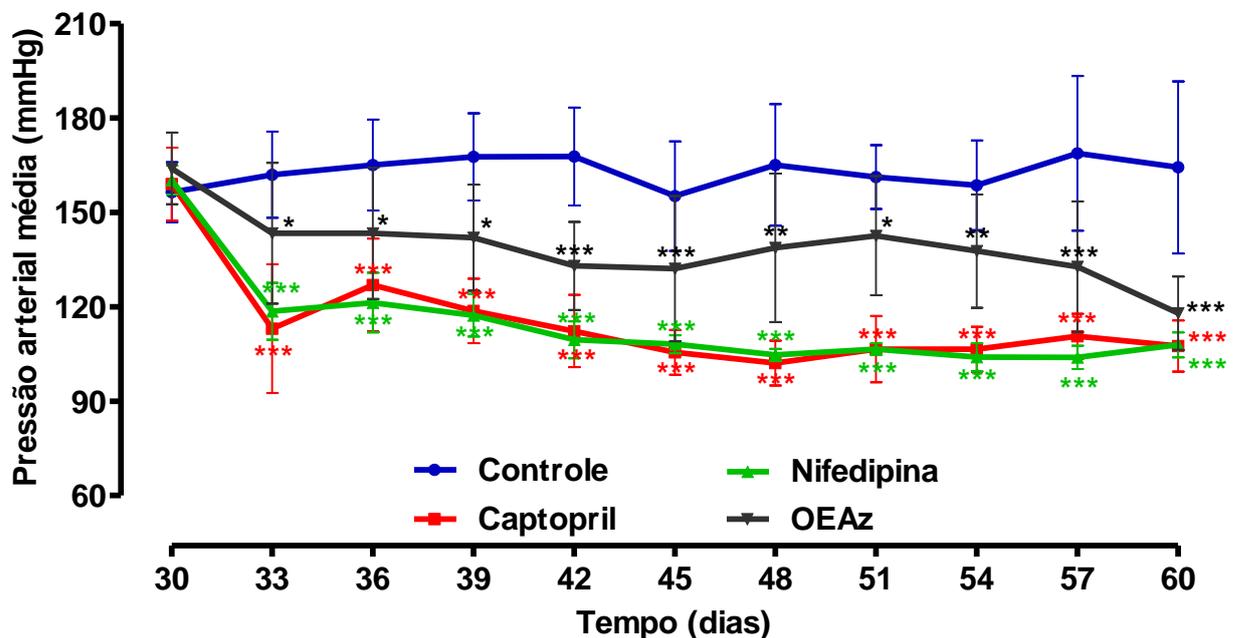


**FIGURA 92** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Foi realizada a análise do comportamento temporal da pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (31º ao 60º dias), em relação ao basal (30º dia).

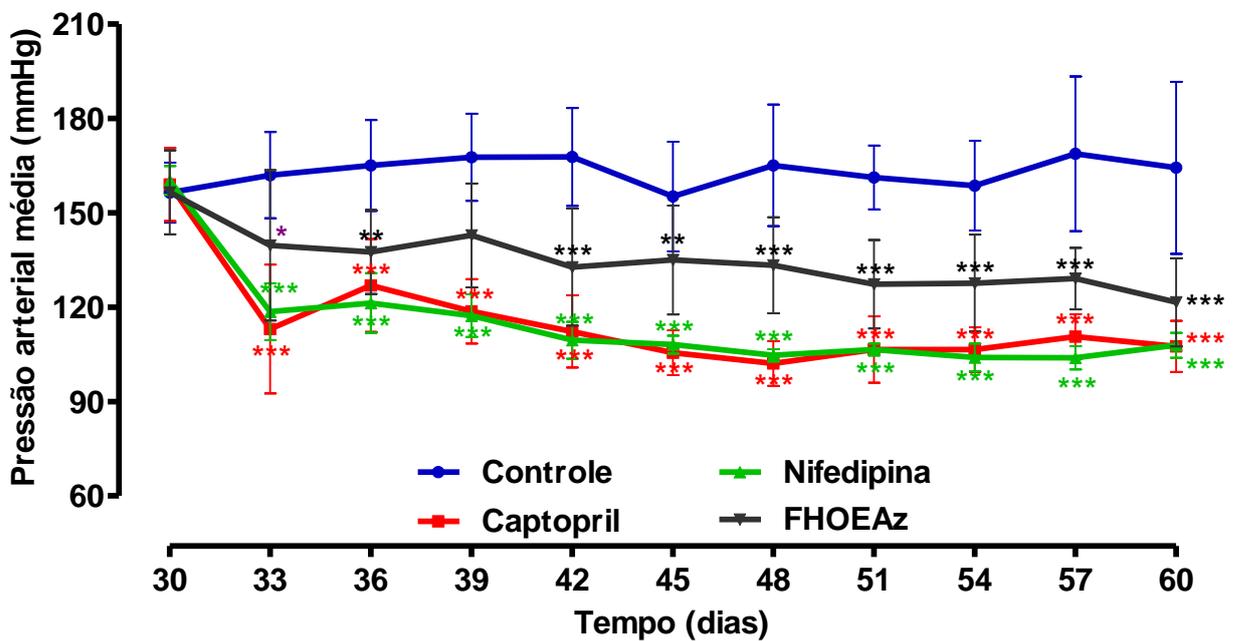
A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi usada para comparar os diversos tempos estudados com o valor basal da PAM, mensurado no dia 30.

Constatou-se que em relação à PAM, no grupo tratado com OEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33, 36, 39 e 51 ( $P < 0,05$ ), 48, 54 ( $P < 0,01$ ) e 42, 45, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada desde no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 93.



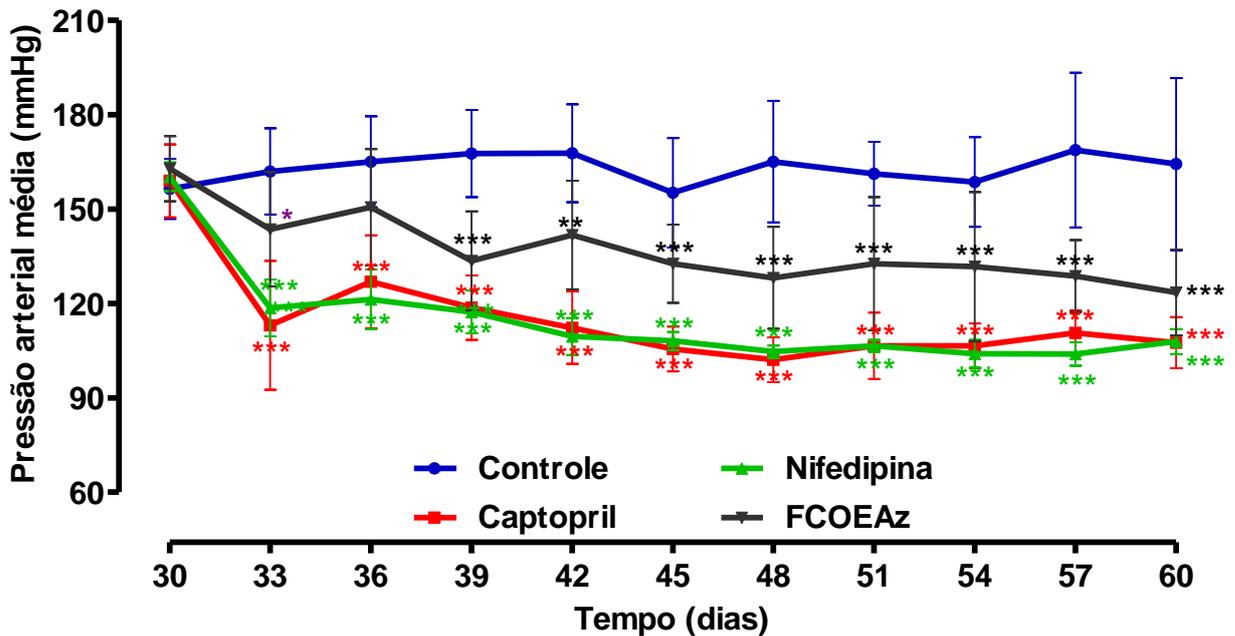
**FIGURA 93** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAM, no grupo tratado com FHOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 36 e 45 ( $P < 0,01$ ), 42, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 94.



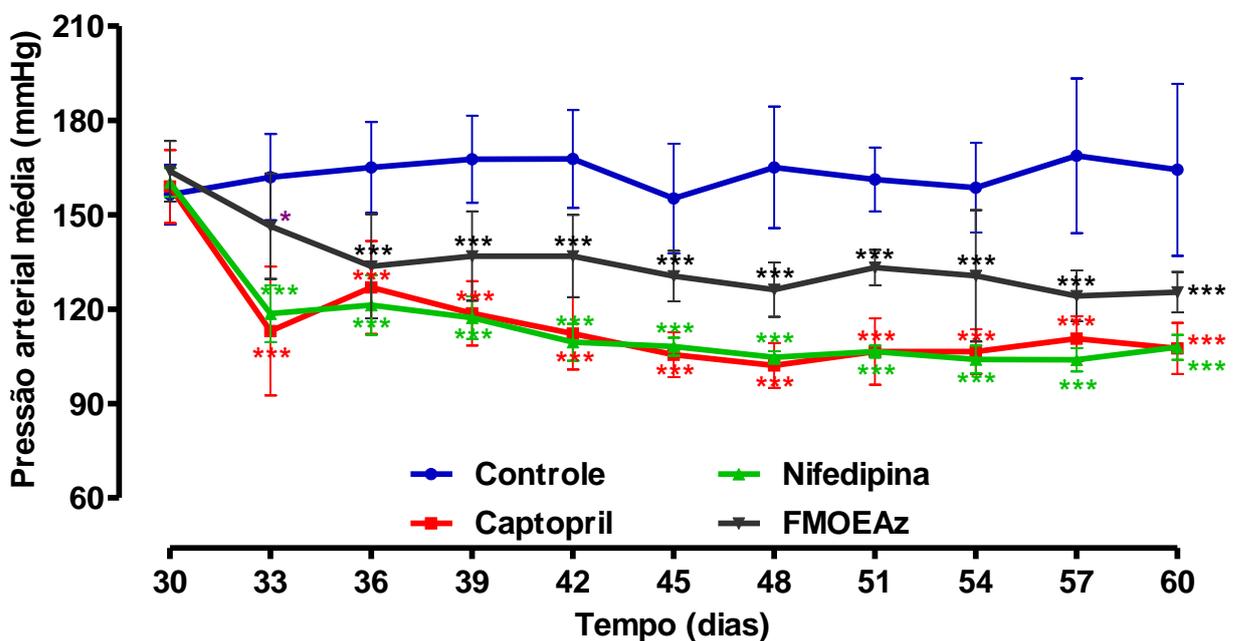
**FIGURA 94** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAM, no grupo tratado com FCOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 42 ( $P < 0,01$ ), 39, 45, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada no 33º dia de tratamento seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 95.



**FIGURA 95** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

Constatou-se que em relação à PAM, no grupo tratado com FMOEAz houve efeito hipotensor estatisticamente significativo nos dias 33 ( $P < 0,05$ ), 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57 e 60 ( $P < 0,001$ ) em relação ao 30º dia (basal) no mesmo grupo, enquanto nos controles positivos (Captopril e Nifedipina) a diferença em relação ao basal foi evidenciada desde no 33º dia de tratamento, seguindo-se até o 60º dia. O gráfico dessa análise está expresso na Figura 96.

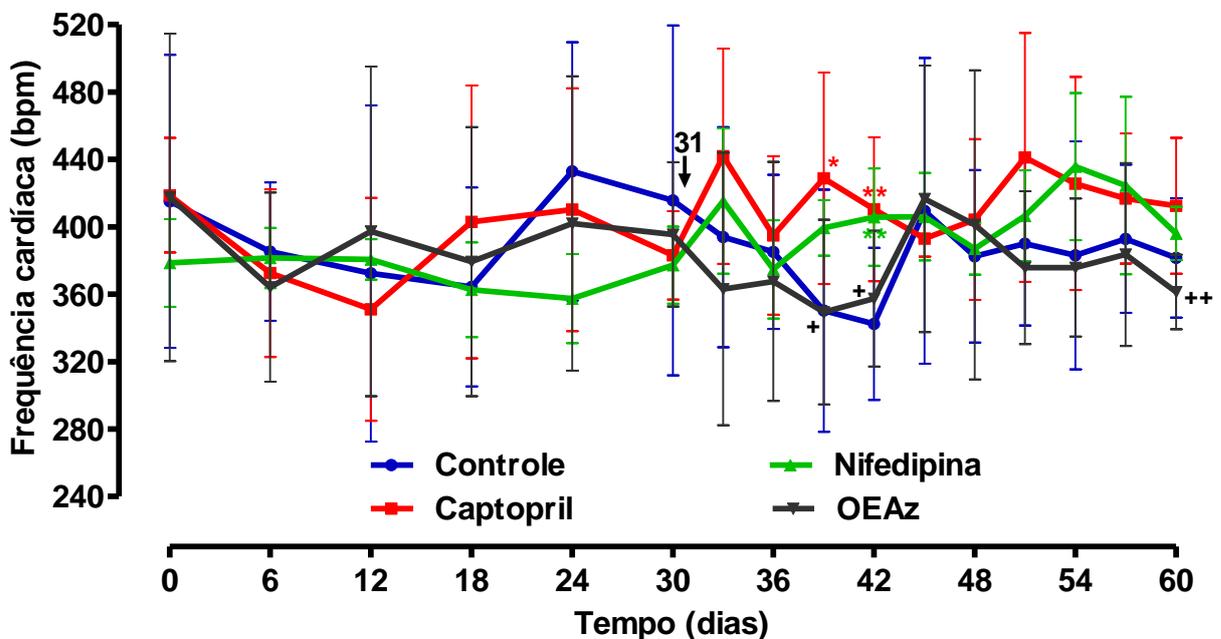


**FIGURA 96** – Progressão temporal da pressão arterial média (PAM) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

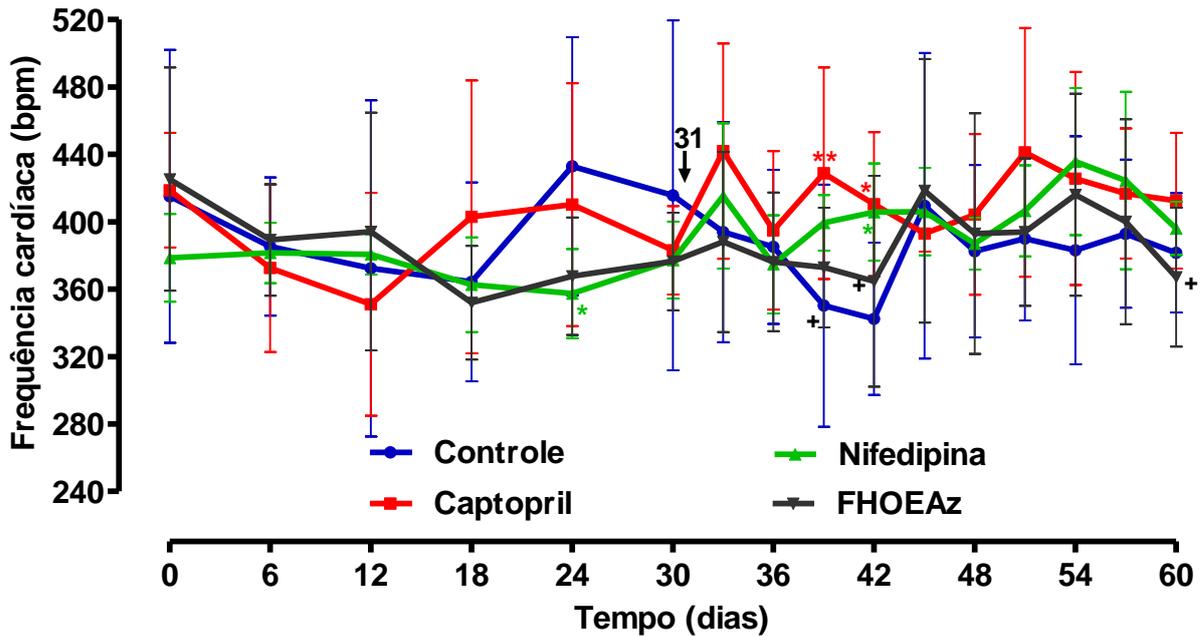
#### 4.2.5 Análise da frequência cardíaca

A frequência cardíaca (FC) foi monitorada nos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de pré-tratamento, correspondendo aos primeiros 30 dias, e a fase de tratamento (31<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dia). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os grupos em cada tempo. A seta na Figura a seguir marca o início dos tratamentos, correspondendo ao 31<sup>o</sup> dia do experimento.

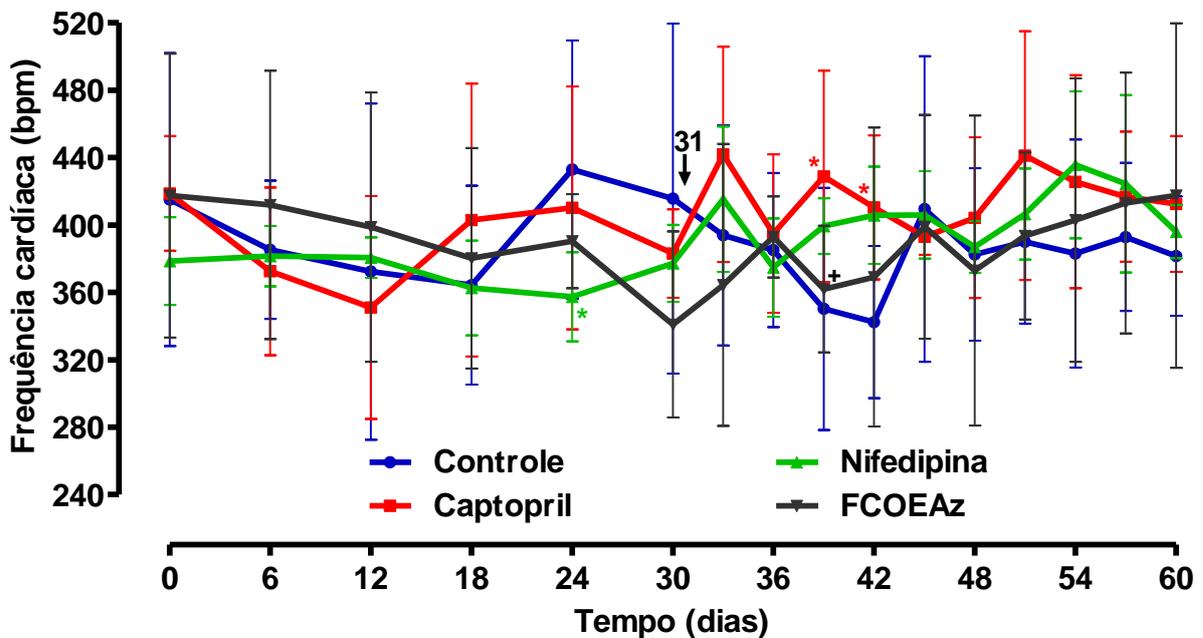
Analisando o comportamento temporal da FC nos grupos tratados com OEAz, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz, Captopril, Nifedipina e controle, observou-se que houve pouca interferência no padrão de FC, o que foi constatado através das alterações pontuais em todos os tratamentos, os quais são representados, respectivamente, nas Figuras 97, 98, 99, 100 e 101.



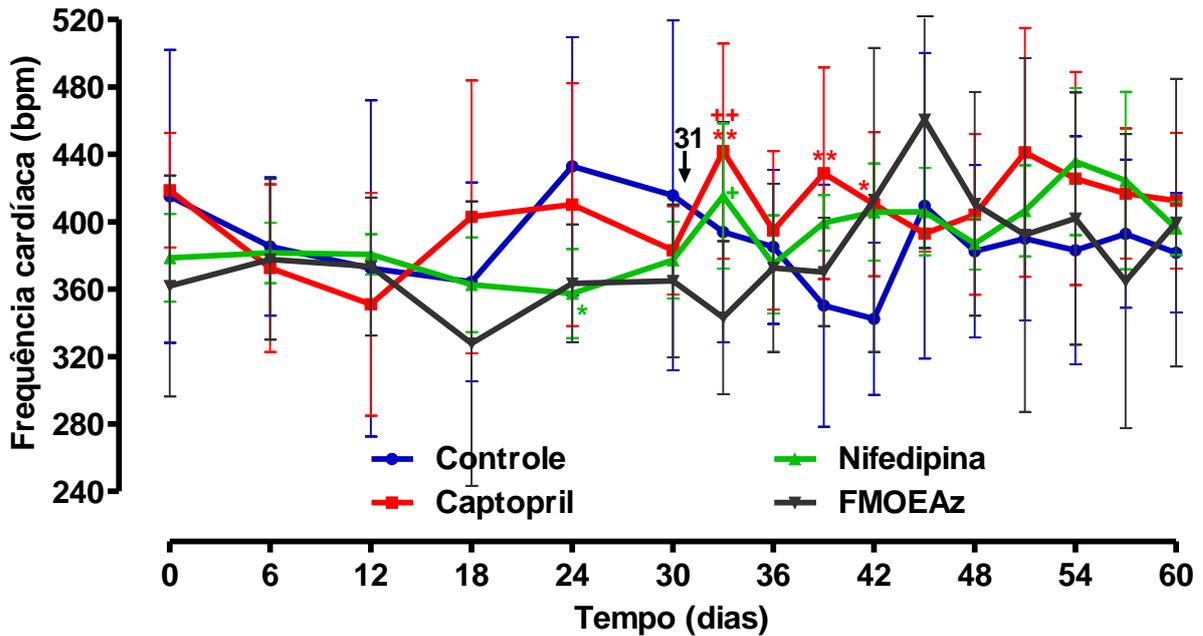
**FIGURA 97** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos EOAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01 em relação ao Controle; +P < 0,05; ++P < 0,01 em relação ao Captopril.



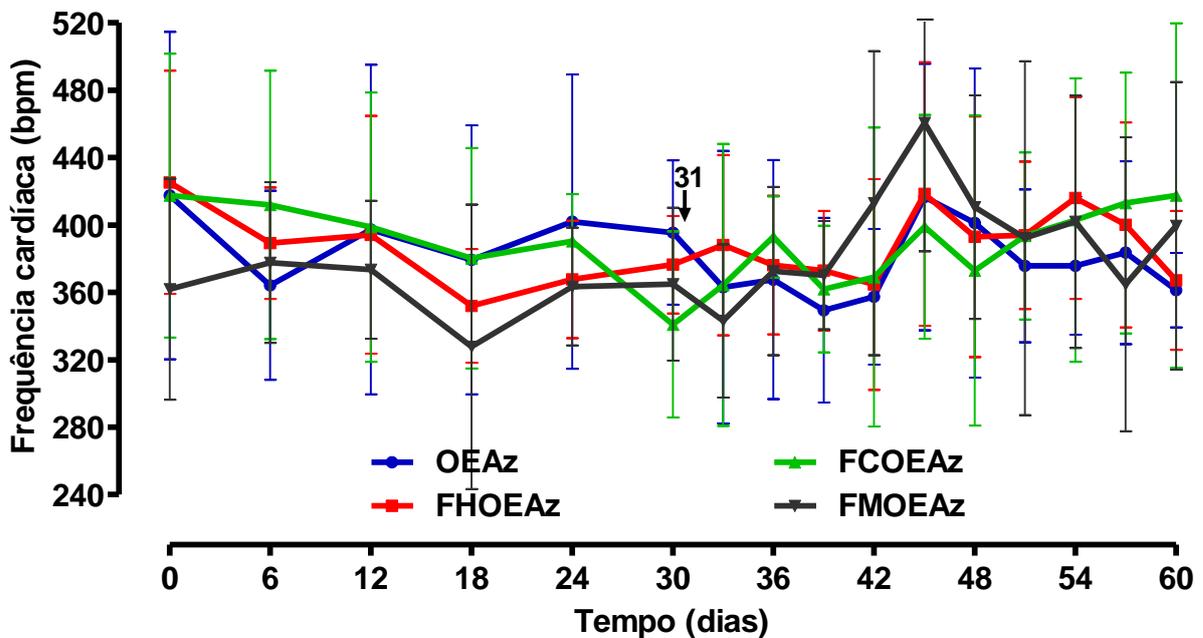
**FIGURA 98** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FHOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01 em relação ao Controle; +P < 0,05 em relação ao Captopril.



**FIGURA 99** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FCOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01 em relação ao Controle; +P < 0,05 em relação ao Captopril.



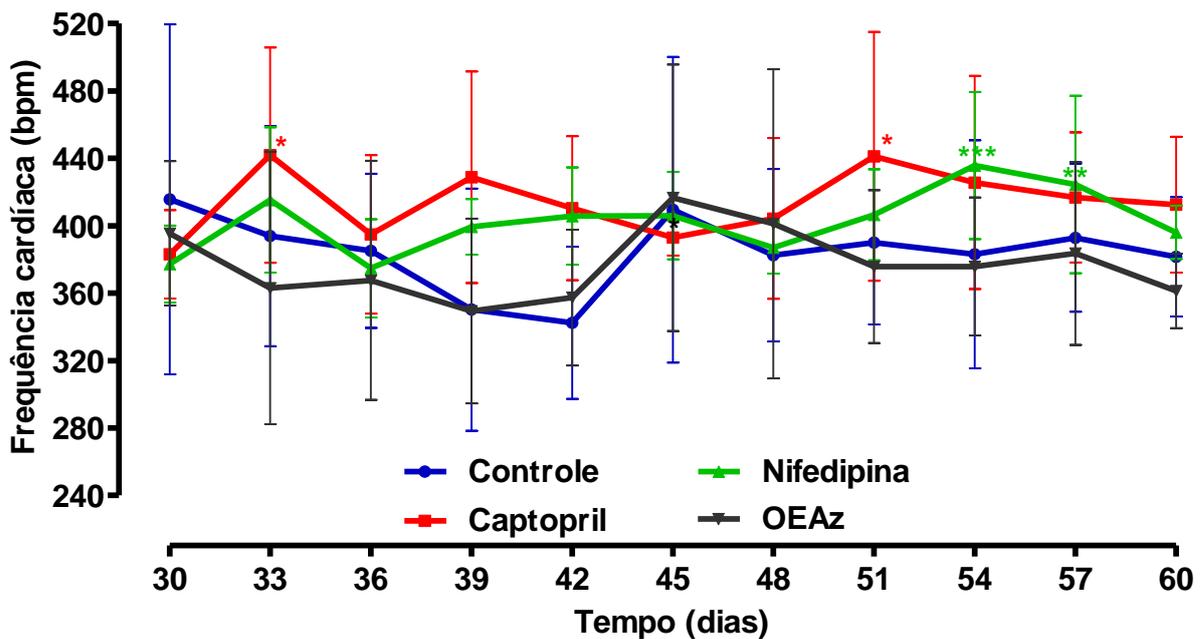
**FIGURA 100** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais dos grupos Controle e FMOEAz, 10 ratos do grupo Nifedipina e 11 animais do grupo Captopril. \*P < 0,05 em relação ao Controle; +P < 0,05; ++P < 0,01 em relação à FMOEAz.



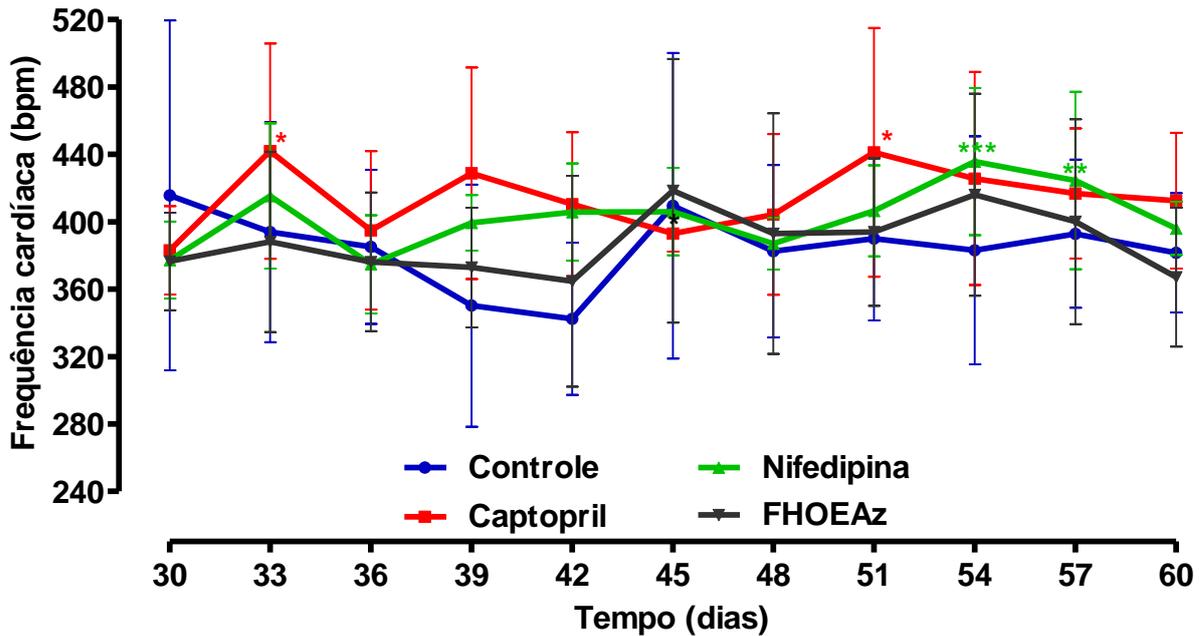
**FIGURA 101** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) nos grupos OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz e 9 ratos do grupo FHOEAz. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Foi realizada a análise do comportamento temporal da frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle (água destilada), Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento (31º ao 60º dias), em relação ao basal (30º dia). A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, foi usada para comparar os diversos tempos estudados com o valor basal da PAM, mensurado no dia 30.

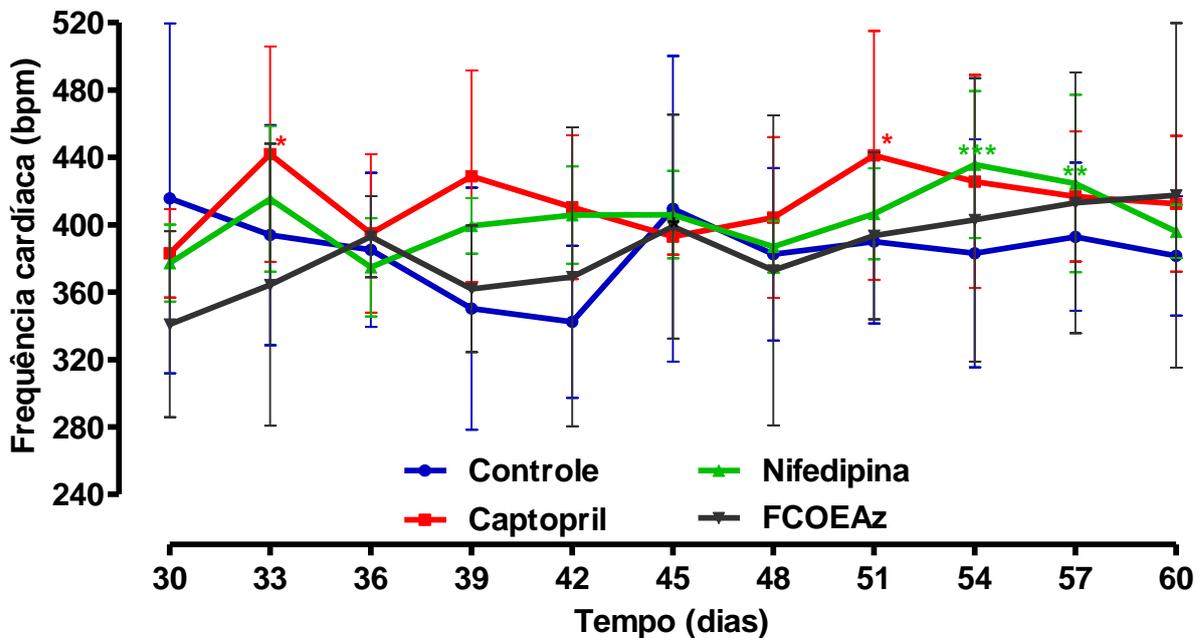
Observou-se que o tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz, Captopril, Nifedipina e controle tiveram pouca interferência no padrão da FC, o que foi constatado através das alterações pontuais em todos os tratamentos, os quais são apresentados na forma de gráficos nas Figuras 102, 103, 104 e 105.



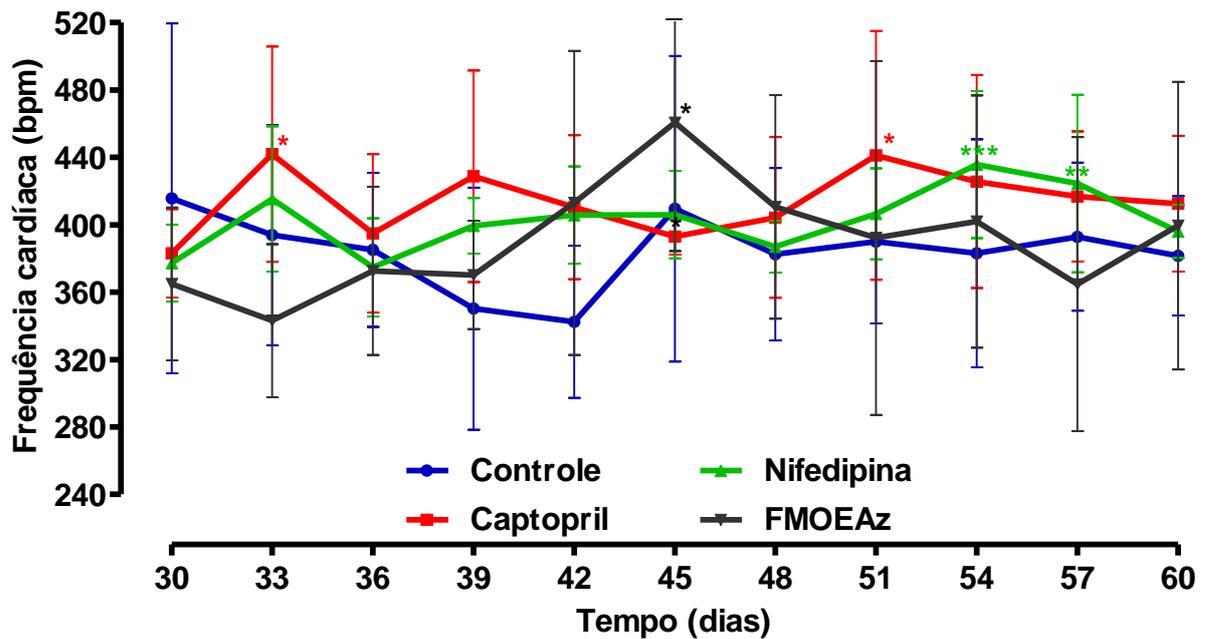
**FIGURA 102** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e OEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos OEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.



**FIGURA 103** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FHOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FHOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.



**FIGURA 104** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FCOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FCOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

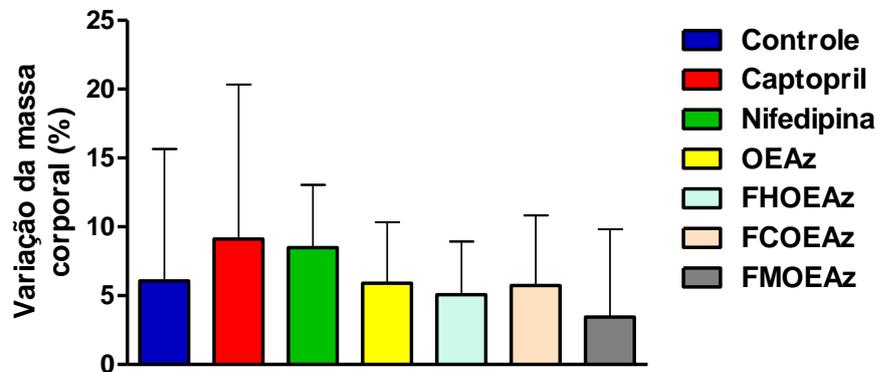


**FIGURA 105** – Progressão temporal da frequência cardíaca (FC) durante a fase de tratamento observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina e FMOEAz. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8, 9, 10 e 11 animais dos grupos FMOEAz, Controle, Nifedipina e Captopril, respectivamente. \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao dia 30 (basal) no mesmo grupo.

#### 4.2.6 Análise da variação do peso dos ratos

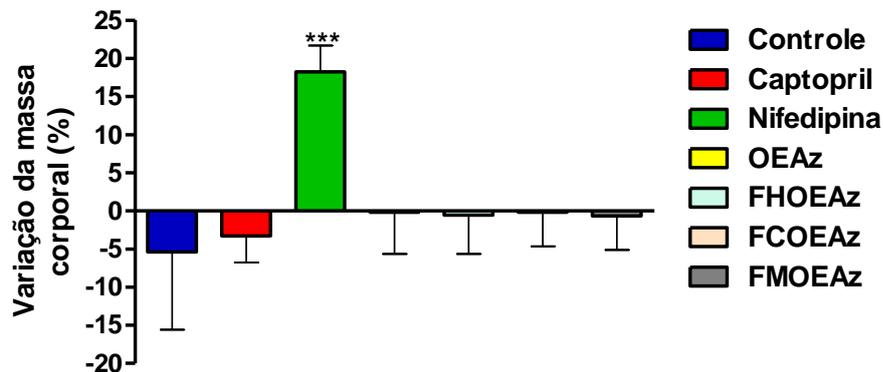
O peso dos animais dos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz foi verificado semanalmente. A partir disso, foi analisada a variação da massa corporal, em termos percentuais, observada nos grupos durante a fase de indução da HAS (0 a 30° dia) (Figura 106) e fase de tratamento da HAS (31 a 60° dias) (Figura 107), tomando-se como valores basais aqueles mensurados no dia 0 do experimento. A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, foi usada para comparar os sete grupos. Os gráficos referentes a estas análises são apresentados a seguir:

Na fase de indução da HAS (0 a 30° dia) não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento, visto que os animais de todos os grupos tiveram ganho ponderal de peso (Figura 106).



**FIGURA 106** – Variação da massa corporal, em termos percentuais, observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de indução da HAS (0 a 30 dias), tomando-se como valores basais aqueles mensurados no dia 0 do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz, 9 ratos dos grupos Controle e FHOEAz, 10 animais do grupo Nifedipina e 11 ratos do grupo Captopril. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento.

Na fase de tratamento da HAS (31° a 60° dias) o grupo Nifedipina teve variação da massa corporal significativamente maior ( $P < 0,001$ ) que a verificada nos demais grupos. De fato, no grupo Nifedipina houve um ganho ponderal, enquanto nos demais grupos houve perda de peso (Figura 107).



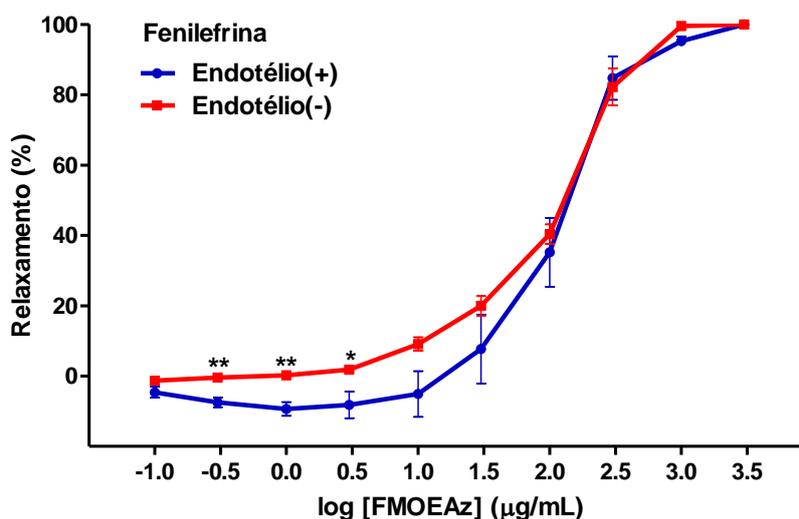
**FIGURA 107** – Variação da massa corporal, em termos percentuais, observada nos grupos Controle, Captopril, Nifedipina, OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de tratamento da HAS (31 a 60 dias), tomando-se como valores basais aqueles mensurados no dia 30 do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 8 animais dos grupos OEAz, FCOEAz e FMOEAz, 9 ratos dos grupos Controle e FHOEAz, 10 animais do grupo Nifedipina e 11 ratos do grupo Captopril. Constatou-se que a variação da massa corporal observada no grupo Nifedipina foi significativamente maior ( $***P < 0,001$ ) que a verificada nos demais grupos.

### 4.3 Caracterização do possível mecanismo de ação da FMOEAz

Os experimentos *in vitro* iniciais e os *in vivo* concluíram que a FMOEAz foi a substância com menor  $CE_{50}$  e melhor perfil farmacológico. Devido a estes achados ela foi estudada quanto ao seu possível mecanismo de ação vasodilatador.

#### 4.3.1 Efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro e não íntegro pré-contraídas com Fenilefrina

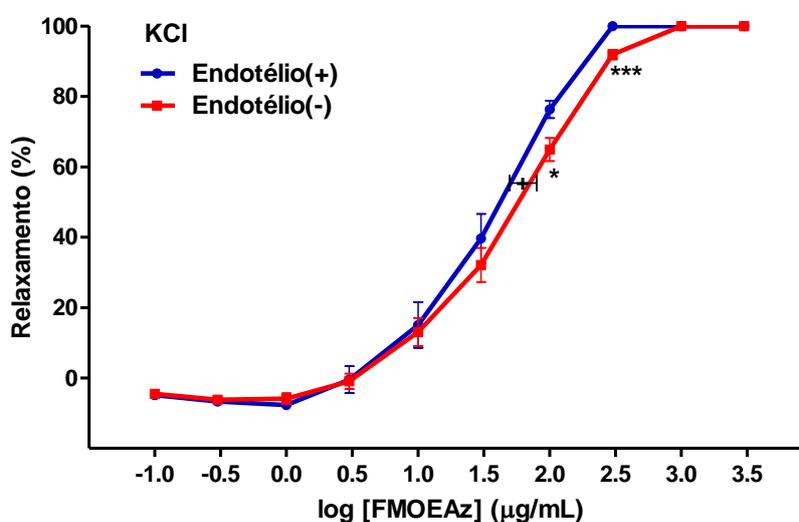
A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente às preparações com Endotélio(+) foi igual a 133,84 (IC95%: 91,23 a 196,36), enquanto a relativa às desprovidas de Endotélio(-) foi igual a 130,50 (IC95%: 107,54 a 158,36), não sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,9018$ ). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre as preparações com e sem endotélio foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 0,3 ( $P = 0,0022$ ), 1,0 ( $P = 0,0011$ ) e 3,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $P = 0,0297$ ) (Figura 108).



**FIGURA 108** – Efeito vasodilatador induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações com endotélio íntegro (Endotélio(+)) e desprovidas de endotélio (Endotélio(-)). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.  $CE_{50}$ : Endotélio(+): 133,84 (IC95%: 91,23 a 196,36); Endotélio(-): 130,50 (IC95%: 107,54 a 158,36), não sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,9018$ ). Considerando o efeito vasodilatador foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações: 0,3 (\*\* $P = 0,0022$ ), 1,0 (\*\* $P = 0,0011$ ) e 3,0  $\mu\text{g/mL}$  (\* $P = 0,0297$ ).

#### 4.3.2 Efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro e não íntegro pré-contraídas com KCl

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente à preparação com Endotélio(+) foi igual a 37,39 (IC95%: 29,75 a 46,99) enquanto a relativa à desprovida de Endotélio(-) foi igual a 53,03 (IC95%: 44,67 a 62,97), sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0136$ ). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre as preparações com e sem endotélio íntegro foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 100,0 ( $P = 0,0195$ ) e 300,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $P = 0,0001$ ) (Figura 109).

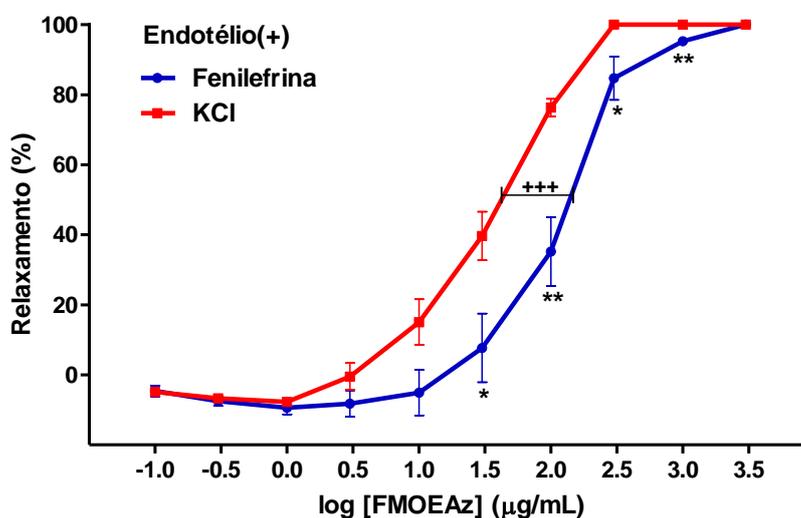


**FIGURA 109** – Efeito vasodilatador induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato pré-contraídos com KCl (80 mmol/L) em preparações com endotélio íntegro (Endotélio(+)) e desprovidas de endotélio (Endotélio(-)). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.  $CE_{50}$ : Endotélio(+): 37,39 (IC95%: 29,75 a 46,99); Endotélio(-): 53,03 (IC95%: 44,67 a 62,97), sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $+P = 0,0136$ ). Considerando o efeito vasodilatador, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações: 100,0 ( $*P = 0,0195$ ) e 300,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $***P = 0,0001$ ).

### 4.3.3 Comparação do efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídas com Fenilefrina ou KCl

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente à Fenilefrina (133,84; IC95%: 91,23 a 196,36) foi significativamente maior ( $P < 0,0001$ ) que a relativa ao KCl (37,39; IC95%: 29,75 a 46,99), denotando que a potência vasodilatadora foi maior nas preparações pré-contraídas com KCl, porém sem alterar o efeito máximo que foi semelhante; ou ainda, que nas preparações pré-contraídas com KCl, o efeito vasodilatador da FMOEAz ocorreu mais precocemente.

Considerando a atividade vasodilatadora, comparações entre as preparações pré-contraídas com Fenilefrina e KCl foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 30,0 ( $P = 0,0237$ ), 100,0 ( $P = 0,0023$ ), 300,0 ( $P = 0,0330$ ) e 1000,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $P = 0,0038$ ) (Figura 110).

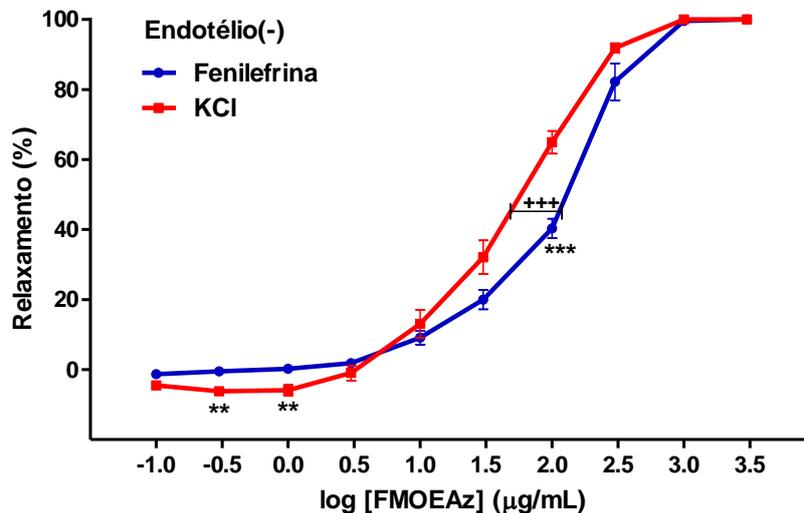


**FIGURA 110** – Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou KCl (80  $\text{mmol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A  $CE_{50}$  da Fenilefrina (133,84; IC95%: 91,23 a 196,36) foi significativamente maior ( $+++P < 0,0001$ ) que a relativa ao KCl (37,39; IC95%: 29,75 a 46,99). Considerando a atividade vasodilatadora foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações: 30,0 ( $*P = 0,0237$ ), 100,0 ( $**P = 0,0023$ ), 300,0 ( $*P = 0,0330$ ) e 1000,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $**P = 0,0038$ ).

#### 4.3.4 Comparação do efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato desprovidas de endotélio pré-contraídas com Fenilefrina ou KCl

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente à Fenilefrina (130,50; IC95%: 107,54 a 158,36) foi significativamente maior ( $P < 0,0001$ ) que a relativa ao KCl (53,03; IC95%: 44,67 a 62,97), denotando que a potência vasodilatadora foi maior nas preparações pré-contraídas com KCl, sem alterar, todavia, a eficácia; ou ainda, que nas preparações pré-contraídas com KCl, o efeito vasodilatador da FMOEAz ocorreu mais precocemente.

Considerando a atividade vasodilatadora, comparações entre as preparações pré-contraídas com Fenilefrina e KCl foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 0,3 ( $P = 0,0034$ ), 1,0 ( $P = 0,0054$ ) e 100,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $P = 0,0002$ ) (Figura 111).

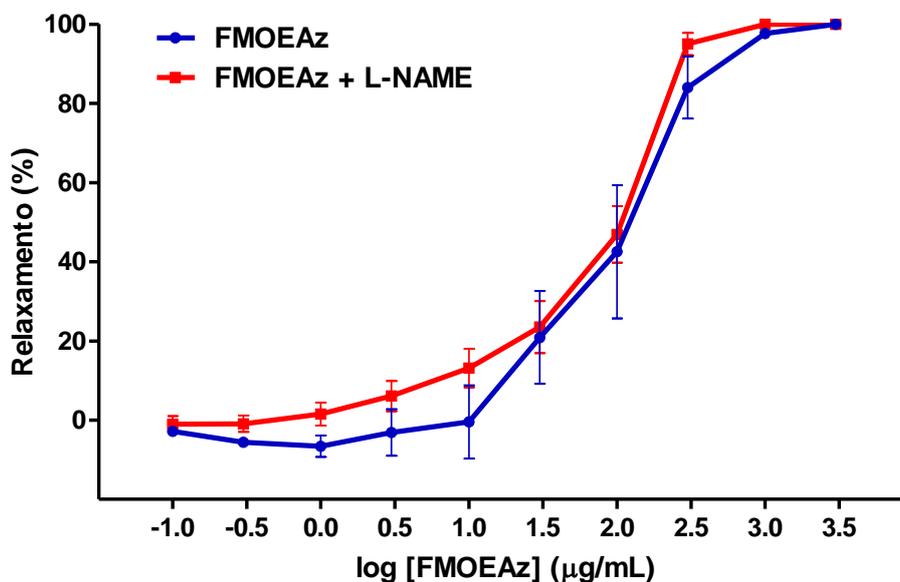


**FIGURA 111** – Curvas concentração-efeito relativas ao relaxamento induzido pela FMOEAz em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou KCl (80  $\text{mmol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A  $CE_{50}$  da Fenilefrina (130,50; IC95%: 107,54 a 158,36) foi significativamente maior ( $+++P < 0,0001$ ) que a do KCl (53,03; IC95%: 44,67 a 62,97). Considerando a atividade vasodilatadora, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 0,3 ( $**P = 0,0034$ ), 1,0 ( $**P = 0,0054$ ) e 100,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $***P = 0,0002$ ).

#### 4.3.5 Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito relaxante da FMOEAz

Em diferentes preparações de aorta de rato (N = 6), foi utilizado o N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride (L-NAME), um análogo sintético da arginina, que compete com ela ocasionando a inibição da síntese do óxido nítrico. A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da EC<sub>50</sub> e os intervalos de confiança de 95% (IC95%).

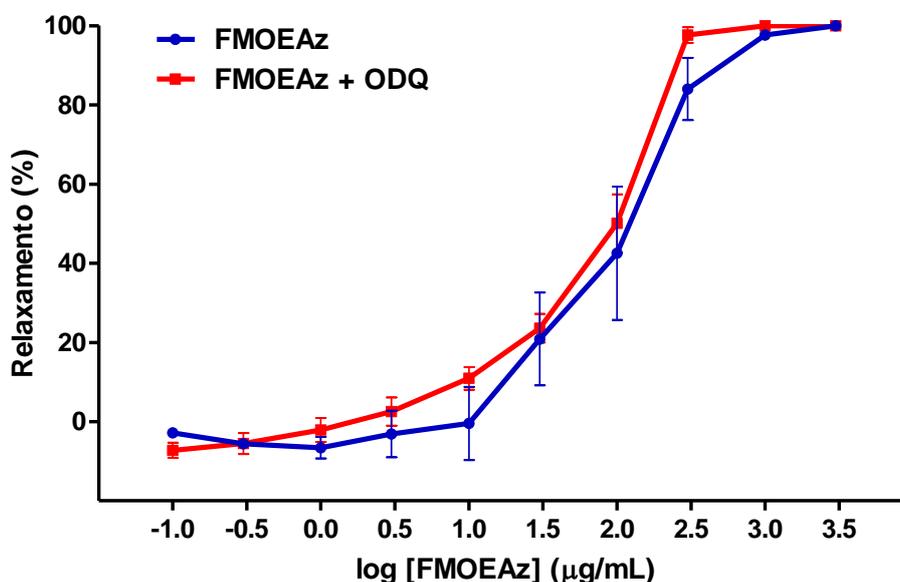
A CE<sub>50</sub> referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a relativa a FMOEAz + L-NAME (97,45; IC95%: 70,69 a 134,30), não sendo constatada diferença estatisticamente significativa (P = 0,7154). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + L-NAME foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações. Assim, a presença de tal inibidor não interfere no relaxamento proporcionado pela FMOEAz (Figura 112).



**FIGURA 112** – Efeito da N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride (L-NAME) (100 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A CE<sub>50</sub> da FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a da FMOEAz + L-NAME (97,45; IC95%: 70,69 a 134,30), não sendo constatada diferença estatisticamente significativa (P = 0,7154). Considerando o efeito vasodilatador, não houve diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.6 Avaliação da contribuição da Guanilato Ciclase Solúvel (GCs) para o efeito relaxante da FMOEAz

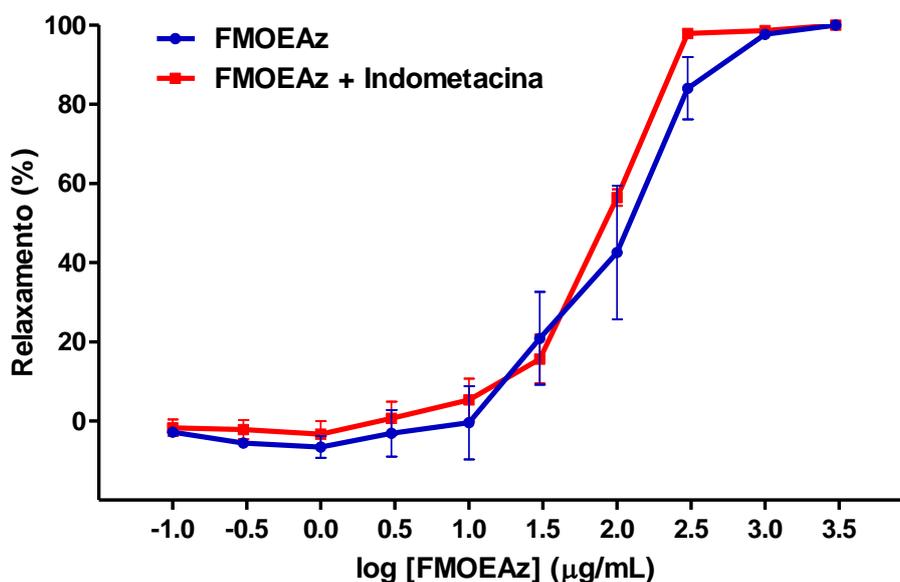
A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a relativa a FMOEAz + ODQ (80,94; IC95%: 61,57 a 106,40), não sendo verificada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,3036$ ). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + ODQ foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações. Dessa forma, a presença de tal inibidor não interferiu no relaxamento proporcionado pela FMOEAz (Figura 113).



**FIGURA 113** – Efeito do 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (10 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a relativa a FMOEAz + ODQ (80,94; IC95%: 61,57 a 106,40), não sendo verificada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,3036$ ). Considerando o efeito vasodilatador, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.7 Avaliação da participação de prostanóides endógenos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz

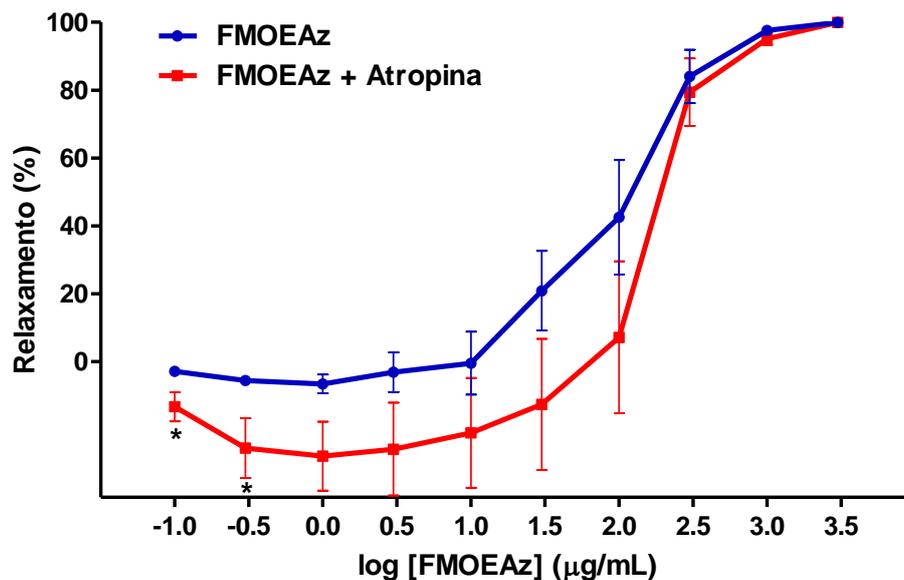
A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,3840$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Indometacina (85,32; IC95%: 64,63 a 112,64). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + Indometacina foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações. Concluiu-se que a presença de tal inibidor não interfere no relaxamento proporcionado pela FMOEAz (Figura 114).



**FIGURA 114** – Efeito da Indometacina (10 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,3840$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Indometacina (85,32; IC95%: 64,63 a 112,64). Considerando o efeito vasodilatador, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.8 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $EC_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). A  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a relativa a FMOEAz + Atropina (189,87; IC95%: 88,42 a 407,74), não sendo verificada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,2123$ ). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + Atropina foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 0,1 ( $P = 0,0394$ ) e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  ( $P = 0,0492$ ). Entretanto, os grupos tiveram efeito final semelhante (Figura 115).

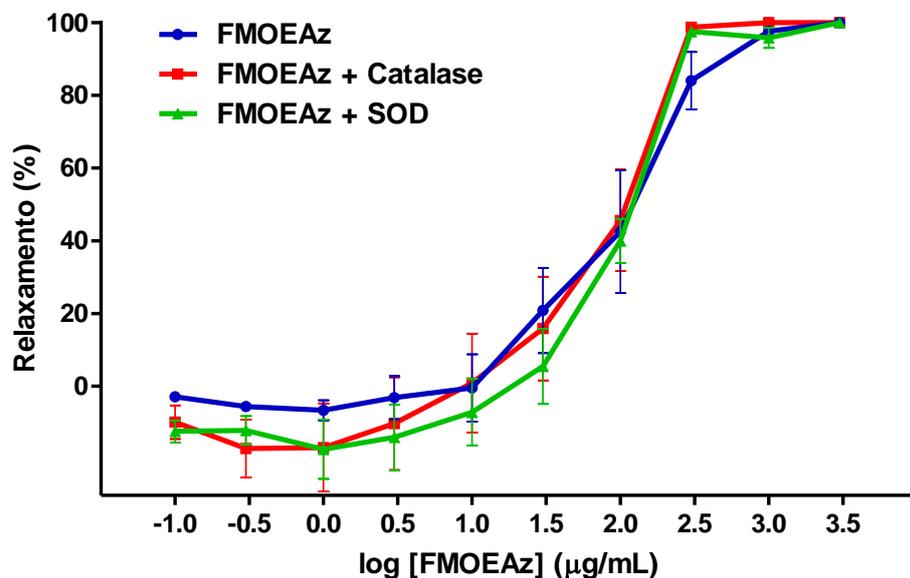


**FIGURA 115** – Efeito da Atropina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A  $CE_{50}$  da FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) foi comparada com a da FMOEAz + Atropina (189,87; IC95%: 88,42 a 407,74), não sendo verificada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,2123$ ). Considerando o efeito vasodilatador, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes nas seguintes concentrações: 0,1 ( $*P = 0,0394$ ) e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  ( $*P = 0,0492$ ).

#### 4.3.9 Avaliação da inibição de espécies reativas do oxigênio para o efeito relaxante da FMOEAz

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$ , assim como os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), para a FMOEAz, FMOEAz + Catalase e FMOEAz + SOD, os quais foram, respectivamente: 108,63 (IC95%: 63,58 a 185,61); 81,02 (IC95%: 43,86 a 149,65), 100,33 (IC95%: 65,36 a 154,01).

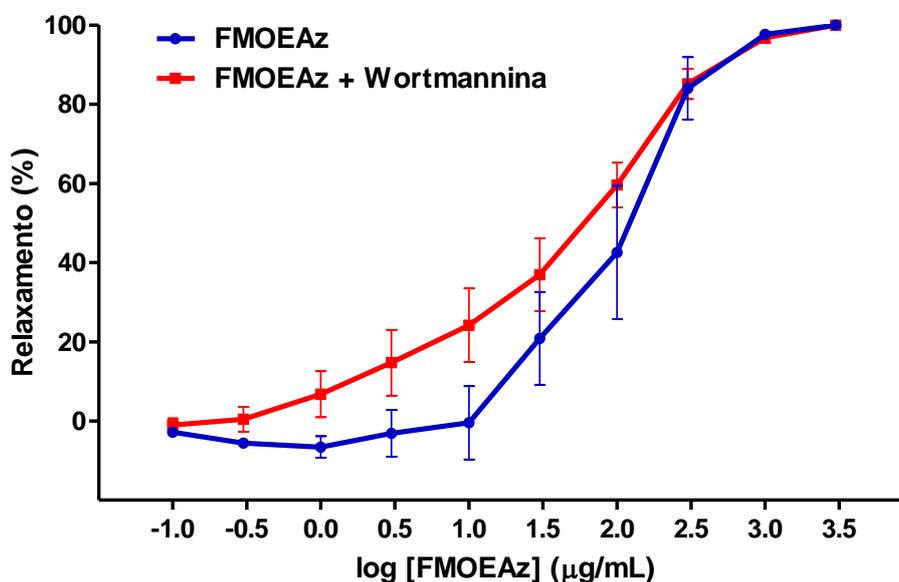
Comparando-se os valores da  $CE_{50}$  das três preparações, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,6906$ ). Comparações entre a  $CE_{50}$  da FMOEAz e aquelas relativas a cada um dos demais tratamentos também não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes. A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi usada para comparar a intensidade do relaxamento induzido pelos três tratamentos, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações. Portanto, a inibição de espécies reativas de oxigênio não interfere no efeito vasodilatador da FMOEAz (Figura 116).



**FIGURA 116** – Efeito da Catalase (500 U/ml) e SOD (300 U/ml) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.  $CE_{50}$  para FMOEAz, FMOEAz + Catalase e FMOEAz + SOD foram, respectivamente: 108,63 (IC95%: 63,58 a 185,61); 81,02 (IC95%: 43,86 a 149,65) e 100,33 (IC95%: 65,36 a 154,01), não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,6906$ ). Comparações entre a  $CE_{50}$  da FMOEAz e aquelas relativas a cada um dos tratamentos também não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes. Quanto ao relaxamento, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.10 Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasodilatador da FMOEAz

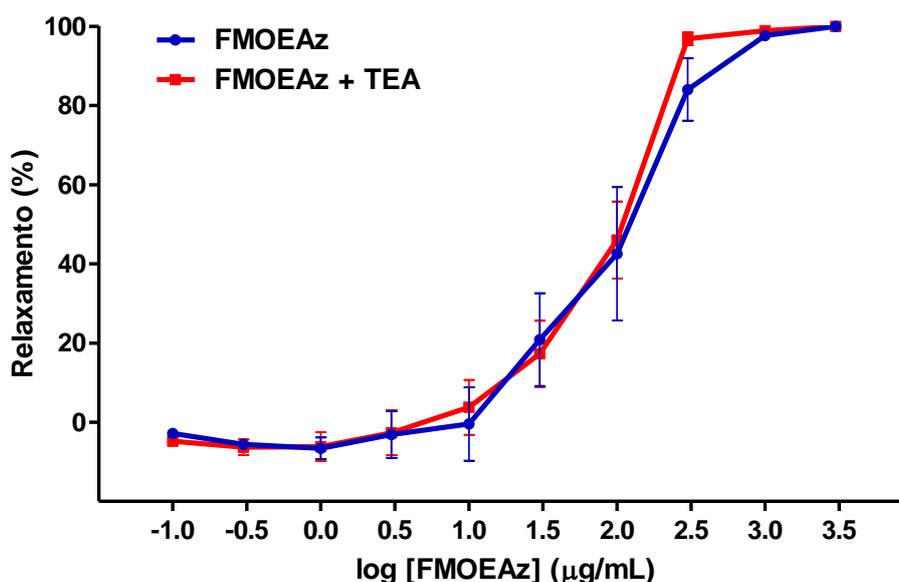
A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,1165$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Wortmannina (60,65; IC95%: 38,38 a 95,85). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + Wortmannina foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações. Dessa forma, a Wortmannina, um inibidor do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que está envolvido em numerosos processos celulares, dentre eles, a via de sinalização PI3K/Akt que envolve a fosforilação da óxido nítrico sintase, ativando a enzima e promovendo vasodilatação, não está envolvida na resposta vasodilatadora da FMOEAz (Figura 117).



**FIGURA 117** – Efeito da Wortmannina (0,5 µmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,1165$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Wortmannina (60,65; IC95%: 38,38 a 95,85). Considerando o efeito vasodilatador, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.11 Avaliação da participação de canais de potássio não seletivos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz

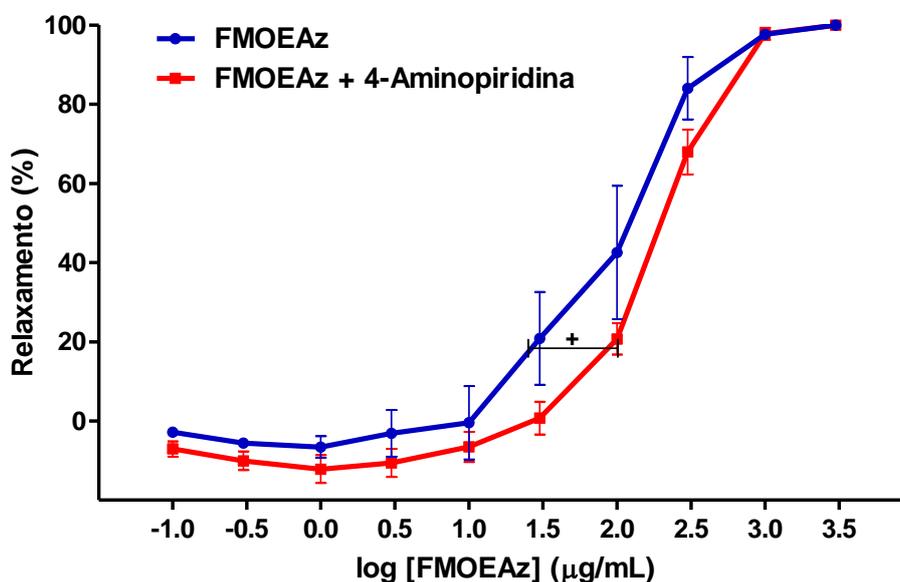
A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,6354$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + TEA (94,07; IC95%: 64,79 a 136,58). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + TEA foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações (Figura 117).



**FIGURA 118** – Efeito do Tetraetilamônio (TEA) (10 mmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,6354$ ) entre a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + TEA (94,07; IC95%: 64,79 a 136,58). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + TEA foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.12 Avaliação da participação de canais de potássio seletivos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz

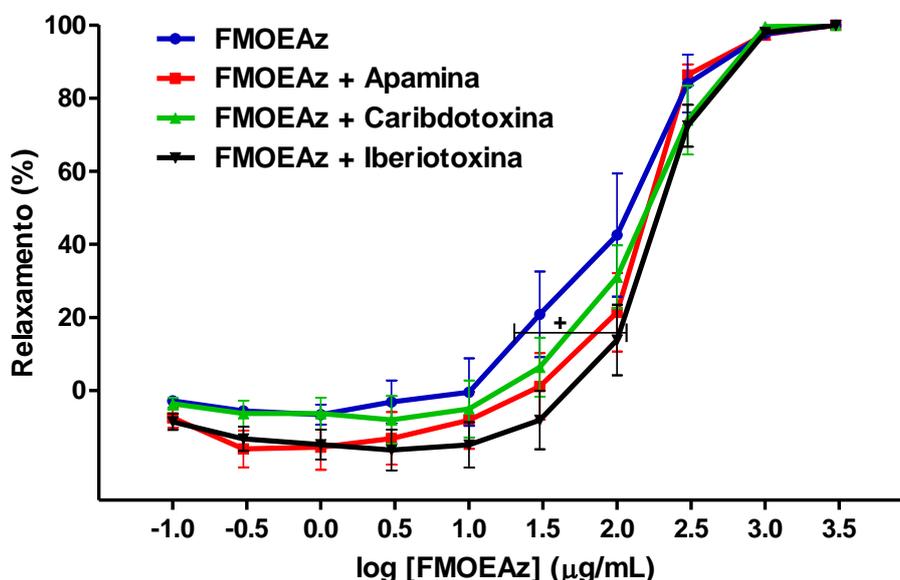
Foi utilizado como bloqueador seletivo dos canais de potássio voltagem-dependente a 4-aminopiridina (1 mmol/L). A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). Verificou-se que a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz + 4-Aminopiridina (214,81; IC95%: 165,87 a 278,18) foi significativamente maior (+P = 0,0148) que a relativa à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61), porém não houve alteração do efeito máximo. Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + 4-Aminopiridina foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações (Figura 119).



**FIGURA 119** – Efeito da 4-Aminopiridina (1 mmol/L) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. A  $CE_{50}$  referente à FMOEAz + 4-Aminopiridina (214,81; IC95%: 165,87 a 278,18) foi significativamente maior (+P = 0,0148) que a relativa à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61), porém não houve alteração do efeito máximo. Considerando o efeito vasodilatador, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

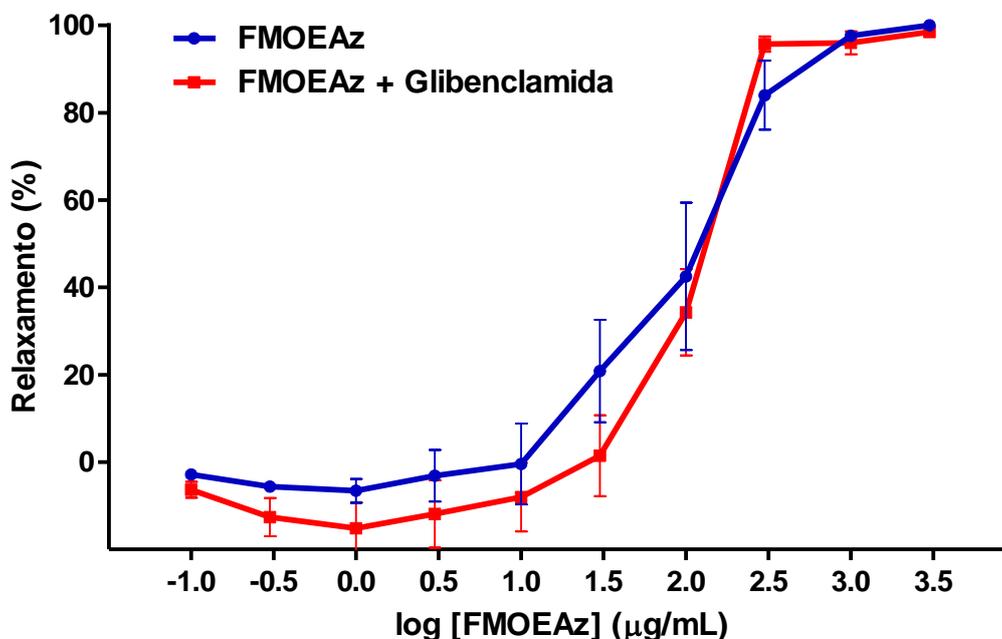
Como bloqueadores seletivos de canais de potássio de baixa, intermediária e alta condutância ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizaram-se, respectivamente, a Apamina (1  $\mu\text{mol/L}$ ), Caribdotoxina (15  $\text{nmol/L}$ ) e Iberiotoxina (30  $\text{nmol/L}$ ).

A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $\text{CE}_{50}$ , assim como os respectivos intervalos de confiança de 95% ( $\text{IC}_{95\%}$ ), para FMOEAz, FMOEAz + Apamina, FMOEAz + Caribdotoxina e FMOEAz + Iberiotoxina, os quais foram, respectivamente, iguais a: 108,63 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 63,58 a 185,61); 157,50 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 101,47 a 244,47), 173,36 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 114,03 a 263,55) e 219,55 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 148,69 a 324,17). Comparando-se a  $\text{CE}_{50}$  da FMOEAz com aquelas relativas a cada um dos demais tratamentos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre FMOEAz e FMOEAz + Iberiotoxina (+P = 0,0209). A análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi usada para comparar a intensidade do relaxamento induzido pelos quatro tratamentos, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações (Figura 120).



**FIGURA 120** – Efeito da Apamina (1  $\mu\text{mol/L}$ ), Caribdotoxina (15  $\text{nmol/L}$ ) e Iberiotoxina (30  $\text{nmol/L}$ ) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contráídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. As  $\text{CE}_{50}$  e intervalos de confiança de 95% ( $\text{IC}_{95\%}$ ), para FMOEAz, FMOEAz + Apamina, FMOEAz + Caribdotoxina e FMOEAz + Iberiotoxina foram, respectivamente: 108,63 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 63,58 a 185,61); 157,50 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 101,47 a 244,47), 173,36 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 114,03 a 263,55) e 219,55 ( $\text{IC}_{95\%}$ : 148,69 a 324,17). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre a  $\text{CE}_{50}$  da FMOEAz e FMOEAz + Iberiotoxina (+P = 0,0209). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das concentrações.

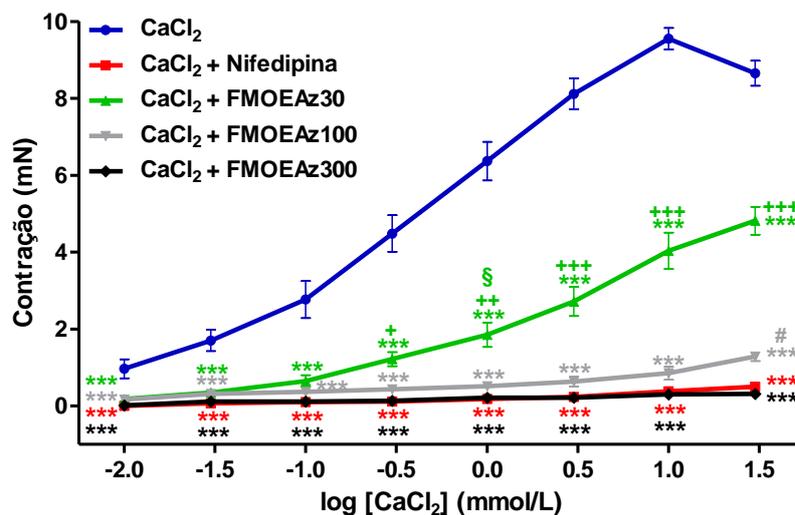
Como bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de ATP, a Glibenclamida (10  $\mu\text{mol/L}$ ). A análise de regressão não linear foi usada para calcular os valores da  $\text{CE}_{50}$  e os intervalos de confiança de 95% (IC95%). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,7749$ ) entre a  $\text{CE}_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Glibenclamida (118,89; IC95%: 76,61 a 184,45). Considerando o efeito vasodilatador, comparações entre FMOEAz e FMOEAz + Glibenclamida foram realizadas mediante o uso do teste  $t$  para variáveis não emparelhadas, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações (Figura 121).



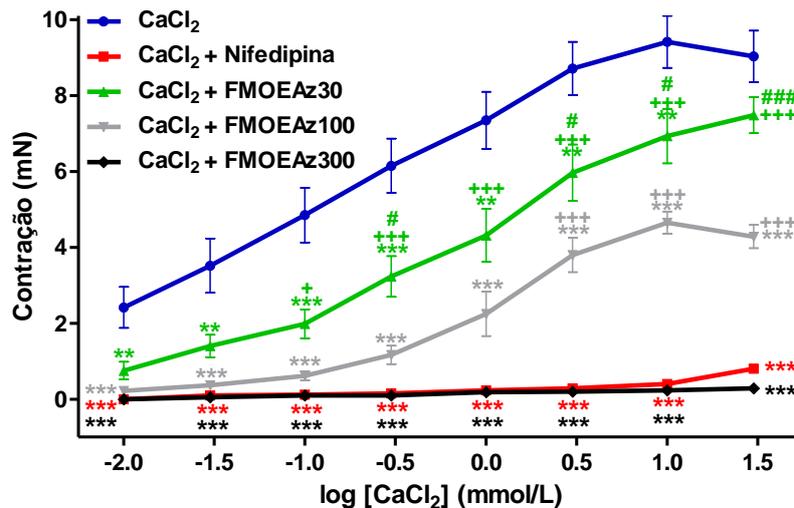
**FIGURA 121** – Efeito da Glibenclamida (10  $\mu\text{mol/L}$ ) na resposta vasodilatadora induzida pela FMOEAz em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,7749$ ) entre a  $\text{CE}_{50}$  referente à FMOEAz (108,63; IC95%: 63,58 a 185,61) e a relativa a FMOEAz + Glibenclamida (118,89; IC95%: 76,61 a 184,45). Considerando o efeito vasodilatador, não foi constatada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações.

#### 4.3.13 Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de $K^+$

O efeito da FMOEAz na contração induzida por  $CaCl_2$  em anéis de aorta de rato foi verificado em endotélio intacto (Figura 122) e em preparações desprovidas de endotélio (Figura 123). As curvas concentração-efeito foram determinadas em solução sem cálcio, sendo a resposta contrátil dependente do influxo extracelular de cálcio induzido por KCl. As curvas foram construídas na ausência ( $CaCl_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com Nifedipina ou FMOEAz. Comparações entre as intensidades das respostas contráteis observadas nas quatro preparações foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Constatou-se que quanto maior a dose de FMOEAz, menor é a contração proporcionada por  $CaCl_2$ , um efeito que chega a ser semelhante ao proporcionado pela Nifedipina. Ademais, observou-se também que o  $CaCl_2$  na concentração de 30 mmol/L, às vezes, ocasiona uma leve redução do efeito contrátil, e que o endotélio vascular não interfere nos achados deste experimento (Ver Figuras 122 e 123).



**FIGURA 122** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por  $CaCl_2$  em anéis de aorta de rato com endotélio intacto. Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  foram determinadas em solução de Krebs sem cálcio contendo KCl (60 mmol/L). As curvas foram construídas na ausência ( $CaCl_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com Nifedipina (100  $\mu$ mol/L) ou FMOEAz (30, 100 e 300  $\mu$ g/mL). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*\*P < 0,001 versus  $CaCl_2$ ; +P < 0,05; ++P < 0,01 versus  $CaCl_2$ +Nifedipina e  $CaCl_2$ +FMOEAz300; +++P < 0,001 em relação a  $CaCl_2$ +Nifedipina,  $CaCl_2$ +FMOEAz100 e  $CaCl_2$ +FMOEAz300; §P < 0,05 versus  $CaCl_2$ +FMOEAz300; #P < 0,05 em relação a  $CaCl_2$ +FMOEAz100.

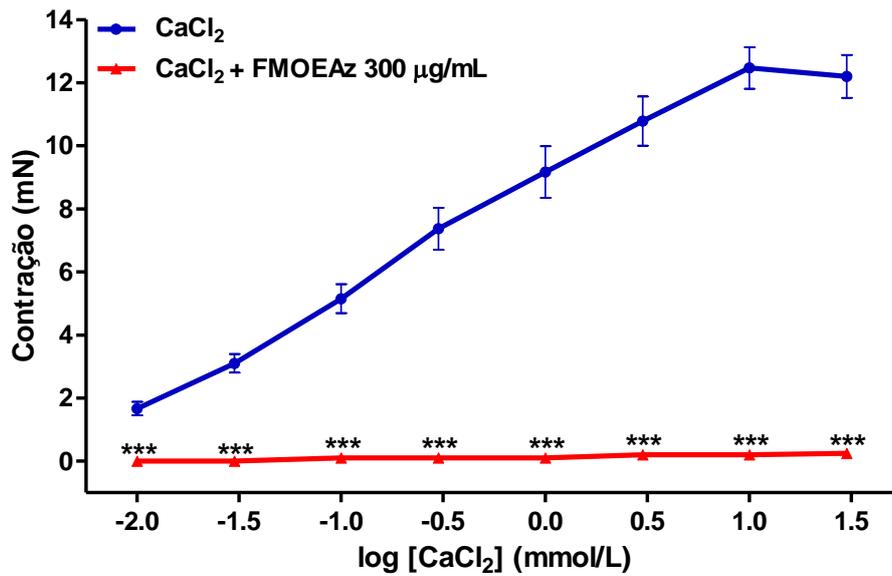


**FIGURA 123** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio. Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> foram determinadas em solução de Krebs sem cálcio contendo KCl (60 mmol/L). As curvas foram construídas na ausência (CaCl<sub>2</sub>) ou após 30 minutos de incubação com Nifedipina (100 µmol/L) ou FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 *versus* CaCl<sub>2</sub>; +P < 0,05; +++P < 0,001 em relação a CaCl<sub>2</sub>+Nifedipina e CaCl<sub>2</sub>+FMOEAz300; #P < 0,05; ###P < 0,001 *versus* CaCl<sub>2</sub>+FMOEAz100.

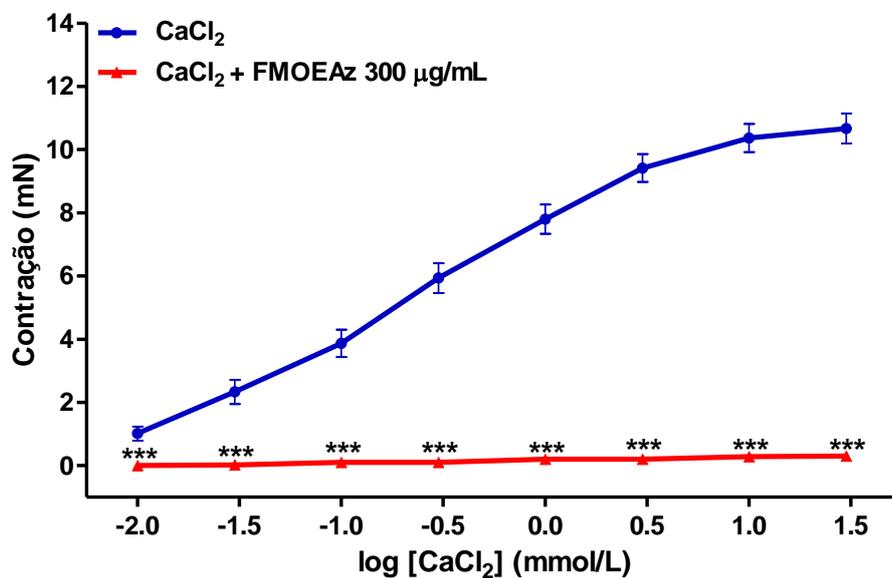
#### 4.3.14 Efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K<sup>+</sup> ou Fenilefrina após depleção do Ca<sup>2+</sup> intracelular

O efeito da FMOEAz na contração induzida por CaCl<sub>2</sub> em solução de Krebs sem cálcio contendo alta concentração de K<sup>+</sup> ou Fenilefrina foi avaliado após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. A resposta contrátil foi, então, desencadeada pelo influxo extracelular de cálcio induzido pelo KCl (60 mmol/L) ou Fenilefrina (1 µmol/L). As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato com endotélio intacto e desprovidas de endotélio na ausência (CaCl<sub>2</sub>) ou após 30 minutos de incubação com a FMOEAz (300 µg/mL). Comparações entre as intensidades das respostas contráteis observadas nas duas preparações foram feitas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas.

Constatou-se que a FMOEAz inibe a contração por CaCl<sub>2</sub> estimulada por alta concentração de K<sup>+</sup>, sem interferência do endotélio vascular (Figuras 124 e 125).

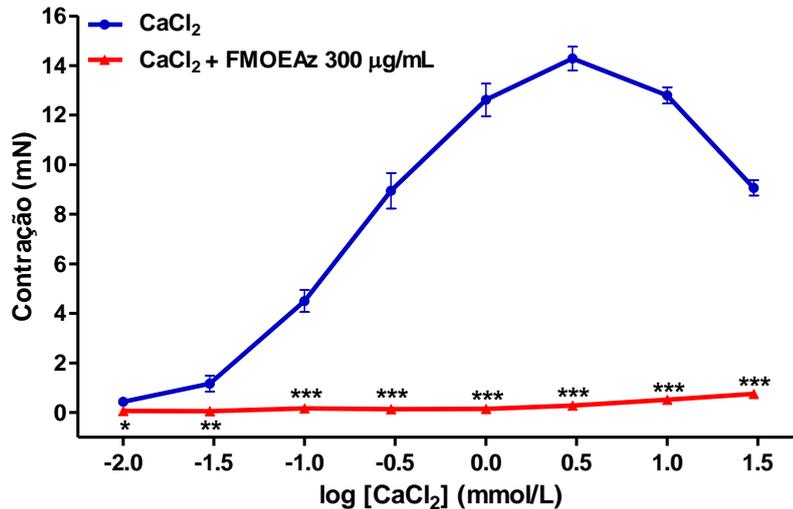


**FIGURA 124** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por CaCl<sub>2</sub> em solução sem cálcio contendo KCl (60 mmol/L), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato com endotélio intacto na ausência (CaCl<sub>2</sub>) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 µg/mL). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*\*P < 0,001 em relação a CaCl<sub>2</sub>.

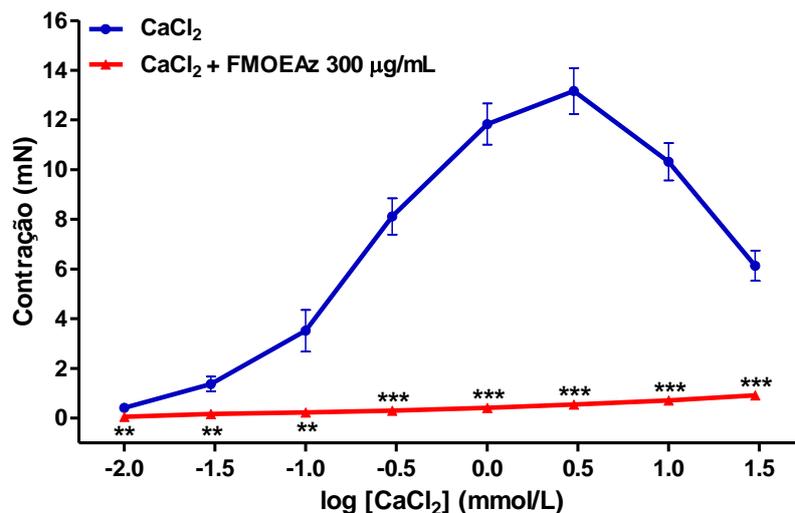


**FIGURA 125** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por CaCl<sub>2</sub> em solução sem cálcio contendo KCl (60 mmol/L), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio na ausência (CaCl<sub>2</sub>) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz (300 µg/mL). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*\*P < 0,001 em relação a CaCl<sub>2</sub>.

Constatou-se que a FMOEAz também inibe a contração por  $\text{CaCl}_2$  estimulada pela Fenilefrina, sem interferência do endotélio vascular. Além disso, o  $\text{CaCl}_2$  nas concentrações de 10 e 30 mmol/L ocasiona leve redução do efeito contrátil (Figuras 126 e 127).



**FIGURA 126** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  em solução sem cálcio contendo Fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato com endotélio intacto na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz ( $300 \mu\text{g/mL}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \* $P = 0,0199$ ; \*\* $P = 0,0059$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação a  $\text{CaCl}_2$ .



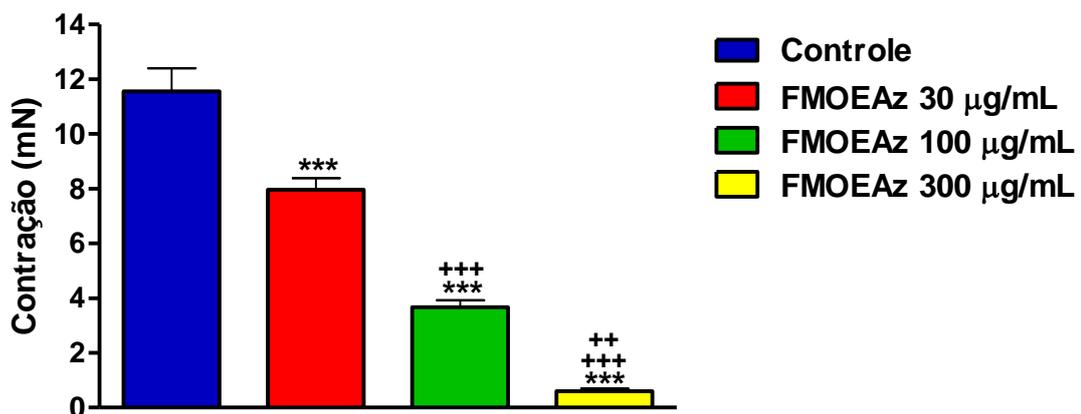
**FIGURA 127** – Efeito da FMOEAz na contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  em solução sem cálcio contendo Fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. As curvas concentração-efeito foram determinadas em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio na ausência ( $\text{CaCl}_2$ ) ou após 30 minutos de incubação com FMOEAz ( $300 \mu\text{g/mL}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\* $P < 0,003$ ; \*\*\* $P < 0,001$  em relação a  $\text{CaCl}_2$ .

#### 4.3.15 Efeito do pré-tratamento com FMOEAz na contração induzida por Fenilefrina ou Cafeína na ausência de cálcio extracelular

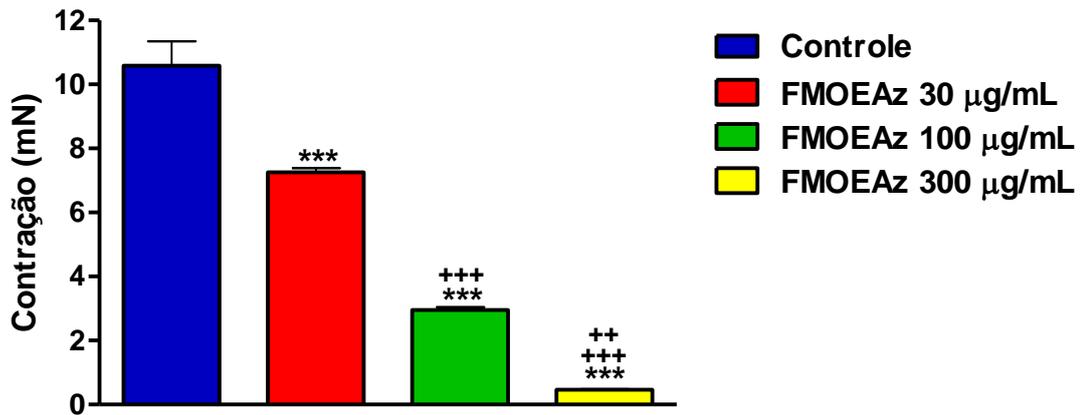
Analisou-se o efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Fenilefrina ou Cafeína em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro e desprovidos de endotélio em solução de Krebs sem cálcio. As preparações foram incubadas com o veículo (Controle) ou FMOEAz (30, 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 30 minutos antes da adição da Fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) ou Cafeína (30  $\text{mmol}/\text{L}$ ).

Comparações entre as intensidades das respostas contráteis observadas nas preparações foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey.

Constatou-se que a FMOEAz interfere na contração com Fenilefrina de forma dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração de FMOEAz, menor a resposta contrátil proporcionada pela Fenilefrina. Ademais, a presença ou ausência de endotélio vascular funcionante, não interfere nesse processo (Figuras 128 e 129).

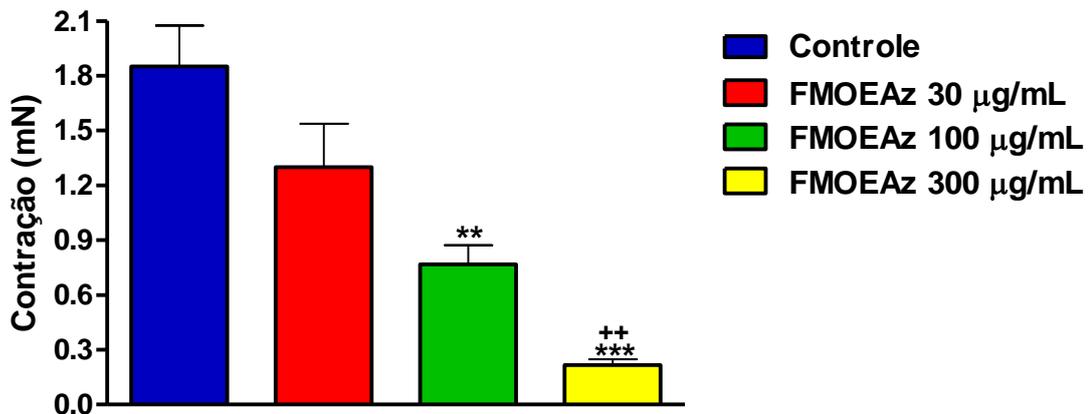


**FIGURA 128** – Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio intacto em solução de Krebs sem cálcio. As preparações foram incubadas com o veículo (Controle) ou FMOEAz (30, 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 30 minutos antes da adição da fenilefrina (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*\*P < 0,001 *versus* Controle; ++P < 0,01 em relação à FMOEAz 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; +++P < 0,001 *versus* FMOEAz 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

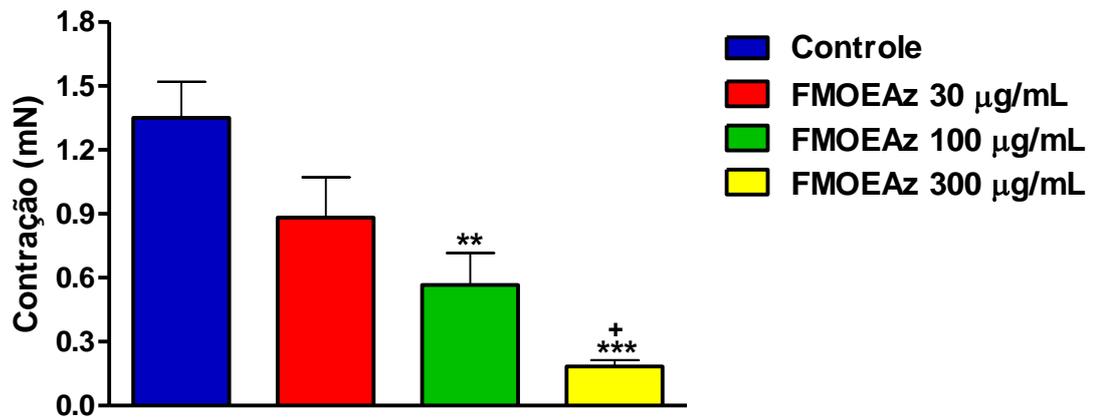


**FIGURA 129** – Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Fenilefrina em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio em solução de Krebs sem cálcio. As preparações foram incubadas com o veículo (Controle) ou FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL) durante 30 minutos antes da adição da fenilefrina (1 µmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*\*P < 0,001 *versus* Controle; ++P < 0,01 em relação à FMOEAz 100 µg/mL; +++P < 0,001 *versus* FMOEAz 30 µg/mL.

A FMOEAz também interferiu na contração com Cafeína de forma dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração de FMOEAz, menor a resposta contrátil proporcionada pela Cafeína. Ademais, a presença ou ausência de endotélio vascular funcional também não interferiu nesse processo. Os gráficos dessas análises são mostrados nas Figuras 130 e 131, a seguir.



**FIGURA 130** – Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Cafeína em anéis de aorta de rato com endotélio intacto em solução de Krebs sem cálcio. As preparações foram incubadas com o veículo (Controle) ou FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL) durante 30 minutos antes da adição da Cafeína (30 mmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 *versus* Controle; ++P < 0,01 em relação à FMOEAz 30 µg/mL.



**FIGURA 131** – Efeito da FMOEAz na resposta contrátil induzida pela Cafeína em anéis de aorta de rato desprovidos de endotélio em solução sem cálcio. As preparações foram incubadas com o veículo (Controle) ou FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL) durante 30 minutos antes da adição da cafeína (30 mmol/L). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos. \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 em relação ao Controle; +P < 0,05 *versus* FMOEAz 30 µg/mL.

Na página a seguir está representado no Quadro 6 uma síntese dos achados referentes aos experimentos para caracterização do possível mecanismo de ação da FMOEAz.

Fármaco/procedimento	CE <sub>50</sub>	Efeito vasodilatador
Pré-contracção com Fenilefrina X endotélio íntegro/ endotélio desnudo	Não houve diferença	Endotélio desnudo > Endotélio íntegro (0,3, 1 e 3 µg/mL de FMOEAz)
Pré-contracção com KCl X endotélio íntegro/ endotélio desnudo	Endotélio íntegro < Endotélio desnudo	Endotélio íntegro > Endotélio desnudo (100 e 300 µg/mL de FMOEAz)
Comparação Fenilefrina X KCl (endotélio íntegro)	KCl < Fenilefrina	KCl > Fenilefrina (30, 100, 300 e 1000 µg/mL de FMOEAz)
Comparação Fenilefrina X KCl (endotélio desnudo)	KCl < Fenilefrina	KCl > Fenilefrina (0,3, 1, 100 µg/mL de FMOEAz)
L-NAME	Não houve diferença	Não houve diferença
ODQ	Não houve diferença	Não houve diferença
Indometacina	Não houve diferença	Não houve diferença
Atropina	Não houve diferença	FMOEAz > FMOEAz + Atropina (0,1 e 0,3 µg/mL de FMOEAz)
Catalase	Não houve diferença	Não houve diferença
SOD	Não houve diferença	Não houve diferença
Wortmannina	Não houve diferença	Não houve diferença
TEA	Não houve diferença	Não houve diferença
4-Aminopiridina	FMOEAz < FMOEAz + 4-Aminoperidina	Não houve diferença
Apamina	Não houve diferença	Não houve diferença
Caribdotoxina	Não houve diferença	Não houve diferença
Iberiotoxina	FMOEAz < FMOEAz + Iberiotoxina	Não houve diferença
Glibenclamida	Não houve diferença	Não houve diferença
Pré-tratamento com FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL) na contracção induzida por Ca <sup>2+</sup> em [K <sup>+</sup> ]	-	FMOEAz inibe contracção por Ca <sup>2+</sup> de forma dependente da [ ]; endotélio não interfere no processo
Pré-tratamento com FMOEAz (300 µg/mL) na contracção induzida por Ca <sup>2+</sup> na presença de [K <sup>+</sup> ] ou Fenilefrina	-	FMOEAz 300 µg/mL inibe contracção por Ca <sup>2+</sup> ; endotélio não interfere no processo
Pré-tratamento com FMOEAz (30, 100 e 300 µg/mL) na contracção induzida por Cafeína ou Fenilefrina	-	Inibe contracção por Cafeína e Fenilefrina de forma dependente da [ ]; endotélio não interfere no processo

**QUADRO 6** – Síntese dos resultados obtidos nos experimentos para identificação do possível mecanismo de ação da FMOEAz.



---

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram estudados os efeitos vasculares do óleo essencial da *Alpina zerumbet* (OEAz) e suas frações hexânica (FHOEAz), clorofórmica (FCOEAz) e metanólica (FMOEAz). A *Alpina zerumbet* vem sendo amplamente utilizada pela população da região Nordeste nas formas de chás e infusões, principalmente, para tratar estados de ansiedade e hipertensão. Quanto ao óleo essencial desta planta, inúmeros trabalhos científicos já estudaram suas propriedades farmacológicas, as quais vão além de ações sobre o sistema cardiovascular.

Os óleos essenciais são uma mistura de constituintes, em que os componentes apresentam-se em diferentes concentrações. Em geral, um deles é o majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES; SPITZER, 1999). Nesta pesquisa, não se utilizou componentes isolados, visto que o interesse maior é utilizar o conhecimento aqui obtido para posterior realização de estudos com seres humanos que utilizem o fitoterápico, e não substâncias isoladas.

Postula-se que o fato dos fitoterápicos serem constituídos de uma mistura de componentes, fornece vantagem terapêutica, pois estas substâncias podem combinar-se entre si de maneira aditiva ou sinérgica, resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido na forma pura. Ademais, na avaliação dos fitoterápicos não é necessária purificação para se identificar ou mesmo isolar os constituintes químicos. A análise do(s) ingrediente(s) farmacologicamente ativo(s) pode ser alcançada a partir da análise de um ou mais ingrediente(s) supostamente responsável(is) pela atividade da planta, por meio da análise de um composto que se apresenta com um teor considerável em relação à composição total ou, ainda, pelo perfil cromatográfico dos ingredientes totais (BRASIL, 2008).

Acerca da investigação da ocorrência natural de agentes com ação no sistema cardiovascular, principalmente, os que reduzem a pressão arterial, pesquisas afirmam que esta é uma área em expansão, com potencial para o

descobrimiento de moléculas que podem ser utilizadas na formulação de novos fármacos anti-hipertensivos (MAHMOOD *et al.*, 2010; TIRAPELLI *et al.*, 2010). Neste contexto, a bioprospecção de substâncias ou princípios ativos derivados de espécies vegetais, associado a estudos pré-clínicos, representa a etapa inicial desse processo.

Todas as substâncias testadas neste estudo tiveram seus constituintes químicos determinados. O OEAz foi obtido por meio da técnica de destilação de arraste por vapor d'água, a qual geralmente é utilizada para se obter óleos essenciais a partir de folhas. A partir do óleo essencial foram obtidas as frações (FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz) através da técnica de desadsorção seletiva, também conhecida como coluna filtrante. Posteriormente, as substâncias foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), para análise dos constituintes. Obteve-se que o OEAz, tem como componentes majoritários o 1,8-cineol (24,61%) e o terpinen-4-ol (25,70%). A FHOEAz apresenta em maior quantidade o sabineno (16,69%), o *p*-cimeno (31,46%) e o  $\gamma$ -terpineno (19,02%). A FCOEAz teve como componentes majoritários o 1,8-cineol (58,92%) e o terpinen-4-ol (35,53%) e a FMOEAz apresentou em maior quantidade o 1,8-cineol (27,81%) e o terpinen-4-ol (57,35%). Todos os componentes majoritários do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz citados se tratam de monoterpenos.

Diante disso, deve-se considerar que as plantas podem produzir substâncias na forma de metabólitos primários, que incluem os aminoácidos, açúcares, ácidos nucleicos e lipídios, dentre outros, que são compostos fundamentais para diversos processos celulares. Vegetais, micro-organismos, e em menor escala, os animais, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor (ZWENGER; BASU, 2008).

A todo esse conjunto metabólico costuma-se definir como *metabolismo secundário*, cujos produtos, embora não essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Os metabólitos secundários atuam na defesa contra herbívoros e

micro-organismos, na proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou dispersores de sementes. Outra característica dos vegetais em relação ao metabolismo secundário é a elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto a sua diversidade numa mesma espécie, as quais podem ser utilizadas com finalidades salutares (SIMÕES; SPITZER, 1999; ZWENGER; BASU, 2008).

Ao que se refere aos óleos voláteis, à grande maioria é constituída de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo que esses últimos preponderam. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Outros terpenoides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES; SPITZER, 1999). Uma unidade isopreno (isoprenil) ligada a uma segunda unidade igual é a definição característica de um moterpeno (C10). Enquanto os sesquiterpenos possuem três unidades isopreno (C15). Os diterpenos (C20) e os triterpenos (C30) possuem 4 e 6 unidades, respectivamente (SIMÕES & SPITZER, 1999; ZWENGER; BASU, 2008).

### **5.1 Estudo *in vitro* preliminar ou inicial: Análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina**

Na avaliação *in vitro* inicial do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, constatou-se que essas substâncias promovem o relaxamento de preparações de aorta de rato com endotélio íntegro pré-contraídas com Fenilefrina, de maneira dose-dependente, de forma que na concentração mais alta (3000 µg/ml) houve relaxamento total dos anéis de aorta com qualquer uma das substâncias testadas.

Foi observada a existência de efeito bifásico, o que equivale a uma leve vasoconstrição, induzida principalmente pela FHOEAz, nas doses de 10, 30 e 100 µg/mL. No entanto, em doses altas não foi constatado efeito bifásico, mas sim vasodilatação significativa em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com Fenilefrina. Por meio da análise à literatura pertinente constatamos

que não há estudos prévios com o OEAz que relatem a ocorrência do efeito bifásico. Em relação às frações, não há estudos que observem este aspecto, visto que esta é a primeira pesquisa que temos conhecimento a utilizar as frações hexânica, clorofórmica e metanólica do OEAz.

De forma geral, o efeito bifásico tem sido identificado em outros estudos com fitoterápicos, mais precisamente, em pesquisas que avaliaram a atividade vasodilatadora de substâncias naturais extraídas de plantas. Tal como neste estudo, o efeito de leve vasoconstrição também ocorreu com a utilização de baixas concentrações das substâncias testadas. Em relação a esse efeito, os autores referiram que é devido a um aumento transitório do influxo de  $Ca^{2+}$  proveniente do meio extracelular (CHIWORORO; OJEWOLE, 2008; ZHANG *et al.*, 2010).

Foram então obtidas curvas de concentração-efeito ou de dose-resposta do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz. De forma geral, essas curvas permitem a estimativa da resposta máxima passível de ser produzida por uma substância ( $E_{max}$ ), bem como a concentração ou dose necessária para produzir 50% da resposta máxima ( $CE_{50}$ ), constituindo dois parâmetros úteis para comparar as potências de substâncias diferentes que produzem efeitos qualitativamente semelhantes (RANG *et al.*, 2007).

Na análise do efeito relaxante do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina, concluiu-se que a FMOEAz foi a substância com menor  $CE_{50}$  (150,45  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta fração tem como componentes majoritários o 1,8-cineol (27,81%) e o terpinen-4-ol (57,35%), nestas proporções. A segunda substância com menor  $CE_{50}$  foi a FCOEAz (300,34  $\mu\text{g/ml}$ ), onde os componentes majoritários foram o 1,8-cineol (58,92%) e o terpinen-4-ol (35,53%). Vale ressaltar que esta fração contém 1,8-cineol em maior quantidade que o terpinen-4-ol, ao contrário do que ocorre na FMOEAz.

Já a  $CE_{50}$  referente ao OEAz foi de 378,01  $\mu\text{g/ml}$ , constatando-se pela análise fitoquímica dois componentes majoritários, a saber: 1,8-cineol (24,61%) e o terpinen-4-ol (25,70%), em proporções menores que as observadas na FMOEAz e na FCOEAz. No que se refere a FHOEAz, apesar de também ter apresentado atividade vasodilatadora, foi a substância com efeito bifásico mais pronunciado e

maior  $CE_{50}$  (581,59  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta tem como componentes majoritários o sabineno (16,69%), o *p*-cimeno (31,46%) e o  $\gamma$ -terpineno (19,02%), não contendo, portanto, como componentes majoritários o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol.

Na análise cromatográfica da maioria dos óleos essenciais derivados da *Alpinia zerumbet* utilizados em outros estudos, o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol foram os componentes mais abundantes (LAHLOU *et al.*, 2002a; LAHLOU *et al.*, 2002b; LAHLOU *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2009; BARCELOS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011). Além disso, estudos prévios têm mostrando que o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* tem atividade vasodilatadora *in vitro* e hipotensora *in vivo*, e que esta ação se deve aos seus maiores constituintes, o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol, que quando avaliados como substância pura, ambos apresentaram atividade vasodilatadora e hipotensora (LAHLOU *et al.*, 2002a; LAHLOU *et al.*, 2002b; LAHLOU *et al.*, 2003).

Considerando os achados da literatura e devido ao fato da FMOEAz possuir a menor  $CE_{50}$ , e ter como constituintes majoritários o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol, inferimos que provavelmente seu efeito vasodilatador se deve a presença destes constituintes, mais precisamente devido ao terpinen-4-ol, visto que a FCOEAz teve a segunda menor  $CE_{50}$  e possuía mais 1,8-cineol que o terpinen-4-ol.

## **5.2 Estudo *in vivo*: Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico e tratamento com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz**

Quanto aos dados referentes à pressão arterial indireta, neste estudo foi utilizado a pletismografia de cauda, um método usado para mensurar pressão arterial sistólica (PAS) em roedores. As vantagens desse método é que pode ser utilizado facilmente em muitos animais, permite acompanhar a pressão arterial por longos períodos de tempo, além de ser um método validado e amplamente aceito para experimentos desse tipo (IRVINE, WHITE, CHAN, 1997; RINALDI; FRITZ, 2008). Apesar do parâmetro analisado de forma mais precisa ser a PAS, a PAD, PAM e FC também podem ser obtidas. Outros estudos com substâncias

provenientes de plantas também realizaram as análises de todos os parâmetros obtidos por meio deste método (VERGARA-GALICIA *et al.*, 2008; RINALDI; FRITZ, 2008). Dessa forma, além da PAS foram obtidos outros parâmetros, como pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Os animais foram submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição da síntese de óxido nítrico, o que ocorreu por meio da administração do L-NAME. Este modelo de hipertensão é amplamente aceito e validado (Ribeiro *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1992; FAZAN JR.; SILVA; SALGADO, 2001; RANG *et al.*, 2007). Neste estudo, constatou-se que a PAS do grupo tratado com L-NAME teve aumento estatisticamente significativo quando comparado ao tempo basal (dia 0) e em relação ao grupo controle, tratado com água potável. Ademais, não houve grandes mudanças na frequência cardíaca e na massa corporal dos animais tratados com L-NAME.

A PAS, PAD, PAM e FC foram monitoradas nos grupos controle negativo (água destilada), controles positivos (Captopril e Nifedipina), OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz durante a fase de indução da hipertensão arterial, correspondendo aos primeiros 30 dias, e a fase de tratamento (31<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dias). Os resultados deste estudo mostraram que uma única administração por gavagem do OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, bem como do Captopril e Nifedipina, foi capaz de reduzir significativamente a pressão arterial de ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico, quando comparado ao controle tratado com água destilada.

A avaliação temporal da pressão arterial sistólica, diastólica e média por pletismografia de cauda constatou que a atividade hipotensora nos grupos tratados com Captopril e Nifedipina foi significativamente maior que nos grupos tratados com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz em todos os dias avaliados, entretanto, o OEAz e suas frações tiveram efeito superior ao controle negativo. Todavia, quando comparadas as quatro terapias (OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz) observou-se que não houve grandes diferenças entre elas no se refere ao efeito sobre a pressão arterial sistólica, diastólica e média, apesar de que a FMOEAz proporcionou redução da pressão arterial com valores mais estatisticamente significantes que as demais.

A análise da área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS) em função do tempo (30° ao 60° dias), uma medida do efeito global dos tratamentos, demonstrou que as áreas sobre a curva dos grupos Nifedipina e Captopril foram menores que a dos grupos tratados com OEAZ, FCOEAz e FMOEAz, que por sua vez, foram menores que o controle negativo. Assim como não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.

Em relação à taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) que representa a velocidade do efeito hipotensor proporcionado por um determinado tratamento, compreendendo o período do 30° ao 60° dias, constatou-se que a taxa de redução da PAS foi significativamente maior nos grupos Captopril, Nifedipina, OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz quando comparado ao controle negativo. Ademais, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com OEAZ, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz.

Considerando a taxa de redução da pressão arterial sistólica (PAS) no período entre o 30° e 36° dias de tratamento, podendo-se denominar como um efeito mais agudo dos tratamentos, obteve-se que a FMOEAz apresentou melhor efeito quando comparado com o controle negativo e os controles positivos.

Analisando o comportamento temporal da frequência cardíaca nos grupos tratados com OEAZ, FHOEAz, FCOEAz, FMOEAz, Captopril, Nifedipina e controle, observou-se que houve pouca interferência no padrão da frequência cardíaca, o que foi constatado através de algumas alterações pontuais em todos os tratamentos.

De forma geral, os experimentos aqui realizados mostraram o efeito hipotensor que também foi observado em outras pesquisas pré-clínicas que avaliaram o óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. No estudo de Lahlou *et al.* (2003) constatou-se o efeito anti-hipertensivo do OEAZ em ratos hipertensos pelo modelo DOCA-Sal, em que os animais uninefrectomizados são tratados cronicamente com acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e NaCl a 1% na água de beber. Em outro estudo que realizou tratamento crônico por 30 dias com o OEAZ em ratos Wistar-Kyoto, também se observou redução da pressão arterial média (BARCELOS *et al.*, 2010). Foi constatado que a hipotensão em ratos acontece de forma independente

da presença operacional do sistema nervoso simpático, sugerindo que o OEAz é um agente vasodilatador direto (LAHLOU *et al.* 2002a; LAHLOU *et al.*, 2002b). Ademais, um estudo que analisou outra substância fitoterápica *in vivo*, o extrato metanólico da *Laelia autumnalis*, constatou por meio da pletismografia de cauda que houve redução estatisticamente significativa da PAS, PAD e PAM (VERGARA-GALICIA *et al.*, 2008).

Em relação ao peso dos animais, na fase de indução da HAS (0 a 30° dia) não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento. Já na fase de tratamento da HAS (31 a 60° dias) constatou-se que a variação da massa corporal observada no grupo Nifedipina foi significativamente maior que a verificada nos demais grupos. Numa análise posterior, observou-se que este achado provavelmente ocorreu devido ao valor do peso dos animais do grupo Nifedipina no início do estudo, o qual foi por acaso inferior ao peso dos animais nos demais grupos de tratamento.

Para finalizar, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz, no entanto, a FMOEAz apesar de não ter sido estatisticamente diferente dos demais tratamentos, mostrou um efeito hipotensor mais satisfatório quando comparado com a pressão arterial do pré-tratamento.

### **5.3 Caracterização do possível mecanismo de ação da substância com menor CE<sub>50</sub> no estudo *in vitro* inicial e perfil farmacológico mais satisfatório no estudo *in vivo*: FMOEAz**

Depois da avaliação inicial das substâncias testadas *in vitro* e *in vivo*, constatou-se que a fração metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (FMOEAz) foi a substância com menor CE<sub>50</sub> (concentração ou dose necessária para produzir 50% da resposta máxima) nos experimentos *in vitro* e efeito hipotensor mais satisfatório quando comparado com a pressão arterial do pré-tratamento *in vivo*. A partir desses achados, a FMOEAz foi submetida a estudos de reatividade vascular

para identificação do possível mecanismo de ação do efeito vasodilatador, por meio da aplicação de protocolos específicos.

O efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato com endotélio íntegro e não íntegro pré-contraídas com Fenilefrina, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à  $CE_{50}$ , porém, as preparações desprovidas de endotélio mostraram vasodilatação significativa nas concentrações de 0,3, 1,0 e 3,0  $\mu\text{g/mL}$  de FMOEAz, apresentando assim, uma redução do efeito bifásico proporcionado pela FMOEAz nas doses iniciais.

Já nas preparações de aorta de rato pré-contraídas com KCl, a  $CE_{50}$  das preparações com endotélio foi menor que às desprovidas de endotélio, assim como foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao efeito vasodilatador, que foi maior nas preparações com endotélio nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$  de FMOEAz.

De forma sucinta, em relação à presença ou ausência do endotélio vascular íntegro, apesar de apresentar alguma interferência pontual em alguns experimentos, observou-se que ele não interfere no efeito máximo final proporcionado pela FMOEAz, e portanto, não parece estar envolvido em seu mecanismo de ação relaxante. Nesse contexto, ressalta-se o mecanismo distinto de contração proporcionado pela Fenilefrina e KCl, bem como o fato de que o endotélio tem um importante papel no controle do tônus vascular, através da secreção de fatores relaxantes e contráteis (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010). As células endoteliais respondem aos estímulos químicos e físicos, produzindo substâncias vasodilatadoras potentes como bradicinina, prostaciclina e óxido nítrico (HOE *et al.*, 2011).

A Fenilefrina é um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, que age sobre um receptor acoplado à proteína G, que ativa a Fosfolipase C, com consequente produção de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros. O retículo sarcoplasmático das células tem receptores de  $IP_3$  que medeia a liberação de  $Ca^{2+}$  que gera o processo de contração. Assim, a contração induzida por Fenilefrina é mediada por um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  através de um receptor acoplado à proteína G (HIRATA *et al.*, 1998, RANG *et al.*, 2007). Em relação ao KCl,

altas concentrações de potássio induzem contração no músculo liso que é mediada por despolarização da membrana celular e um aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio dos canais operados por voltagem (GODFRAIND; KABA, 1969; SOMLYO; SOMLYO, 1994; HIPÓLITO *et al.*, 2009). Dessa forma, as contrações induzidas por Fenilefrina e KCl têm mecanismos de ação distintos.

Quando comparado o efeito relaxante da FMOEAz em preparações de aorta de rato pré-contraídas com Fenilefrina ou KCl, considerando-se o endotélio íntegro e não íntegro, constatou-se que em ambas as preparações a  $\text{EC}_{50}$  referente à Fenilefrina foi significativamente maior que à relativa ao KCl. Assim, a potência vasodilatadora da FMOEAz foi maior nas preparações pré-contraídas com KCl, devendo-se destacar que o efeito final foi o mesmo para os dois tratamentos.

A FMOEAz inibe a contração induzida por KCl e Fenilefrina em aorta isolada de rato, sugerindo-se que a FMOEAz bloqueia o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da interferência nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltagem e canais operados por receptor, respectivamente. Contudo, é interessante notar que a ação inibitória proporcionada pela FMOEAz é maior na contração induzida por KCl que na contração induzida por Fenilefrina. Assim como também foi observado que a FMOEAz é mais potente em relaxar anéis aórticos pré-contraídos com KCl que com Fenilefrina. Achados semelhantes foram observados em outros estudos com diterpenos de ocorrência natural (HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Ademais, sugere-se que a redução da pressão arterial ocasionada pela FMOEAz e outros derivados do OEAz que foi observada no estudo *in vivo*, pode ser explicada pelo relaxamento vascular constatado no estudo *in vitro*.

Constatou-se que a inibição do óxido nítrico pela utilização do L-NAME não interferiu no efeito relaxante da FMOEAz, discordando do estudo realizado por Pinto *et al.* (2009), onde a ação vasodilatadora do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* foi totalmente atribuída à presença do endotélio vascular funcional, assim como o efeito relaxante foi quase totalmente abolido pela inibição da óxido nítrico sintase pelo L-NAME.

O óxido nítrico ativa a guanilato-ciclase, que age sobre o GTP convertendo-o em GMPc, sendo importante nos vasos de resistência em virtude da

liberação contínua, produzindo um tônus vasodilatador e contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial. Além disso, inibe a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, a adesão leucocitária, a agregação plaquetária, entre outras ações. O efeito do GMPc é inibido pelas fosfodiesterases (RANG *et al.*, 2007; MIZUNO; JACOB; MASON, 2010). A inibição da Guanilato Ciclase Solúvel pode ser conseguida pela utilização do ODQ (HIPÓLITO *et al.*, 2009), que nesse estudo também não interferiu no efeito relaxante da FMOEAz. Dessa forma, o mecanismo de ação da FMOEAz provavelmente não interfere na via do óxido nítrico-GMPc.

Produtos vasodilatadores derivados da ciclooxygenase de origem não endotelial têm sido descritos por induzir relaxamento endotélio independente (HIPÓLITO *et al.*, 2009). Neste estudo, ao se utilizar a Indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxygenase, não foi observada alteração no relaxamento induzido pela FMOEAz, o que também foi um achado do estudo do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* realizado por de Pinto *et al.* (2009). A participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante da FMOEAz também foi avaliada, através da utilização da Atropina, um antagonista muscarínico, constatando-se que a presença de tal inibidor não altera a resposta vasodilatadora da FMOEAz, que parece não envolver os receptores muscarínicos.

O uso de substâncias antioxidativas também não interferiu no relaxamento proporcionado pela FMOEAz. Sabe-se que a produção excessiva de óxido nítrico pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão através da formação aumentada de espécies reativas de oxigênio. A concentração de óxido nítrico depende da atividade da óxido nítrico sintase, bem como a produção de superóxido ( $O_2^-$ ). Sob condições normais, a taxa de formação de  $O_2^-$  é balanceada por remoção enzimática por várias dismutases, como a superóxido dismutase. Contudo, uma alteração entre processos pró-oxidantes e antioxidantes pode gerar estresse oxidativo (WONGSAWATKUL *et al.*, 2008; MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

A inibição do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pela Wortmannina não interferiu na resposta vasodilatadora da FMOEAz. Já é conhecido que a óxido nítrico sintase endotelial leva a produção de óxido nítrico nas células endoteliais através da

oxidação NADPH-dependente da L-arginina, apresentando um importante papel na vasodilatação (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010; WANG *et al.*, 2010). Ademais, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Akt (uma proteínaquinase que fosforila a óxido nítrico sintase, tornando-a mais sensível à  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina) também são importantes reguladores da ativação da óxido nítrico sintase (WANG *et al.*, 2010).

A participação de canais de potássio não seletivos na resposta de relaxamento vascular da FMOEAz foi avaliada com o uso do Tetraetilamônio, constatando-se a não interferência destes no processo de relaxamento das preparações de artéria aórtica, o que também foi observado no estudo do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* conduzido por Pinto *et al.* (2009), e em outro estudo com um diterpeno denominado pimarane (HIPÓLITO *et al.*, 2009).

Os canais de potássio têm um importante papel na regulação do potencial de repouso da membrana, bem como na contratilidade vascular. O estímulo das células do músculo liso vascular com altas concentrações de potássio ou agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos causam despolarização da membrana e elevação da concentração de cálcio intracelular, resultando em contração e redução do diâmetro do vaso. O cálcio entra via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, ativados por despolarização da membrana e liberação dos estoques intracelulares de cálcio via  $\text{IP}_3$  e por receptor de rianodina (TAMMARO *et al.*, 2004; XUE *et al.*, 2011). A hiperpolarização da membrana, causada pela ativação de canais de potássio, principalmente, devido ao fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, e remoção do cálcio do citoplasma pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) representam os principais fatores relacionados ao relaxamento do vaso (TAMMARO *et al.*, 2004).

Os canais de potássio regulam o tônus do músculo liso vascular por interferir no potencial da membrana celular. Numa célula em repouso típica, a membrana é seletivamente permeável ao potássio. Esta permeabilidade em repouso ocorre devido ao estado aberto dos canais de potássio. Se houver abertura de maior número de canais de  $\text{K}^+$ , a membrana sofre hiperpolarização, e a célula é inibida. Além de afetar a excitabilidade dessa maneira, os canais de  $\text{K}^+$  também desempenham um importante papel ao regular a duração do potencial de ação e o

padrão temporal de disparo de potenciais de ação (RANG *et al.*, 2007; XUE *et al.*, 2011).

Em relação ao bloqueio seletivo de canais de potássio voltagem-dependente com a 4-aminopiridina, verificou-se que a  $CE_{50}$  referente à FMOEAz + 4-aminopiridina foi significativamente maior que a relativa à FMOEAz, embora o efeito máximo final tenha ocorrido nos dois tratamentos. Diante disso, estudos têm demonstrado que a aplicação da 4-aminopiridina causa ou aumenta contrações induzidas por agonistas em artérias de diferentes espécies animais, incluindo humanos (CHEONG *et al.*, 2002; TAMMARO *et al.*, 2004).

Como bloqueadores seletivos de canais de potássio de baixa, intermediária e alta condutância ativados por  $Ca^{2+}$ , utilizaram-se, respectivamente, a Apamina, Caribdotoxina e Iberiotoxina. O tratamento com FMOEAz + Iberiotoxina apresentou  $CE_{50}$  superior à FMOEAz. Nesse contexto, temos que quando os níveis de  $Ca^{2+}$  aumentam depois da liberação das reservas intracelulares, a elevação do  $Ca^{2+}$  é transitória, porque o  $Ca^{2+}$  é recaptado avidamente para as reservas intracelulares. O  $Ca^{2+}$  pode ligar-se e regular diretamente os canais iônicos, como os canais de  $K^+$  de alta condutância ativados por  $Ca^{2+}$ . Além disso, a Iberiotoxina causa contração de artérias safenas humanas (MILESI *et al.*, 1999), aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular e vasoconstrição de artérias cerebrais de ratos adultos (GOLLASCH *et al.*, 1998). Ademais, também inibe a vasodilatação por óxido nítrico e potencializa a contração induzida por Fenilefrina (TAMMARO *et al.*, 2004).

A utilização da Glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de ATP, não alterou a  $CE_{50}$ , nem o efeito vasodilatador da FMOEAz. Ao que se refere aos canais de  $K^+$  dependentes de ATP, o óxido nítrico e o GMPc promovem hiperpolarização e relaxamento das células musculares lisas pela abertura dos canais de  $K^+$  dependentes de ATP (YEH *et al.*, 2005).

Dessa forma, diante dos diversos tipos de bloqueadores de canais de  $K^+$  utilizados, constatou-se que apesar de alguns aumentarem a  $CE_{50}$  (4-aminopiridina e Iberiotoxina), o efeito máximo final da FMOEAz continuou o mesmo, apesar da presença dos inibidores. Assim, pode-se inferir que os canais de  $K^+$  voltagem-dependente e os canais de  $K^+$  de alta condutância ativados por  $Ca^{2+}$ , podem ter

algum tipo de influência no efeito relaxante da FMOEAz, visto que aumentaram a  $CE_{50}$ . No entanto, o fato de não alterar o efeito relaxante final da FMOEAz sugere que os canais de  $K^+$  não estão totalmente envolvidos no mecanismo vasodilatador da FMOEAz.

Foi analisado o efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de  $K^+$ . Este protocolo visou observar se a FMOEAz interferia no influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio operados por voltagem. Como controle positivo utilizou-se a Nifedipina, um antagonista dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, do grupo das diidropiridinas, que é relativamente seletiva para músculo liso (GODFRAIND, 2005; RANG *et al.*, 2007).

Com este experimento constatou-se que a FMOEAz inibe a contração por  $CaCl_2$  estimulada por alta concentração de  $K^+$ , sem interferência do endotélio vascular, um efeito que chega a ser semelhante a ação da Nifedipina, quando considerada a maior dose de FMOEAz utilizada no experimento que foi  $300\mu g/mL$ .

Já é bem estabelecido que altas concentrações de  $K^+$  induzem contração no músculo liso que é mediada por despolarização da membrana celular e aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio operados por voltagem (GODFRAIND; KABA, 1969; SOMLYO; SOMLYO, 1994; HIPÓLITO *et al.*, 2009).

A literatura acerca da reatividade vascular já descreve que a Nifedipina e o Verapamil inibem a contração induzida por Fenilefrina e KCl, bem como o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico (SOMLYO; SOMLYO, 1994; HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011). Estas observações e os achados deste estudo sugerem que a FMOEAz pode atuar sobre os canais de cálcio operados por voltagem, de maneira dependente da dose, agindo como um antagonista do cálcio.

O efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de  $K^+$  ou Fenilefrina após depleção do  $Ca^{2+}$  extracelular e intracelular também foi avaliado, constatando-se que a FMOEAz inibe a contração induzida por  $CaCl_2$  na presença de Fenilefrina e KCl. Dessa forma, parece que a FMOEAz age via canais de cálcio operados por receptor e canais de cálcio operados por voltagem, concordando com achados de artigos que analisaram

substâncias provenientes de plantas (HIPÓLITO *et al.*, 2009; HIPÓLITO *et al.*, 2011; HOE *et al.*, 2011).

Outro protocolo analisou o efeito do pré-tratamento com a FMOEAz na contração induzida por Fenilefrina ou Cafeína na ausência de cálcio extracelular, visando observar a influência da FMOEAz sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do estoques intracelulares sensíveis à Fenilefrina e à Cafeína.

A Fenilefrina age via receptor acoplado à proteína G, mediando a liberação de cálcio dos estoques intracelulares localizados no retículo endoplasmático/sarcoplasmático por intermédio do  $\text{IP}_3$ , que age sobre o receptor de  $\text{IP}_3$ . Este se trata do principal mecanismo pelo qual a ativação dos receptores acoplados à proteína G produz elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (VERGARA-GALICIA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; HOE *et al.*, 2011).

Já a Cafeína age sobre o receptor de rianodina, assim denominado por ter sido identificado pela primeira vez através da ação bloqueadora específica do alcalóide vegetal rianodina (RANG *et al.*, 2007). Este receptor também está localizado do retículo endoplasmático/sarcoplasmático, mediando a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto os receptores de  $\text{IP}_3$  quanto os receptores de rianodina são sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e se abre mais rapidamente se a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  estiver aumentada (RANG *et al.*, 2007; HIPÓLITO *et al.*, 2011).

Os experimentos realizados para este protocolo de estudo constataram que a FMOEAz interfere de forma concentração dependente na contração proporcionada pela Fenilefrina e pela Cafeína. Visto que neste experimento, não havia  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, supõem-se que a FMOEAz pode interferir na contração induzida pelo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O aumento na concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  é o desencadeador da contração do músculo liso, porque leva à formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, um processo que culmina na contração muscular (ARAÚJO; BENDHACK, 2003).

Assim, os experimentos relativos ao cálcio concluíram que a FMOEAz inibe o influxo extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente por atuar sobre os canais de cálcio operados por receptor e canais de cálcio dependentes de voltagem, os quais foram ativados nos experimentos aqui realizados por Fenilefrina e alta concentração

de potássio (KCl). Além disso, a FMOEAz interfere na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares que normalmente respondem à Fenilefrina (via  $\text{IP}_3$ ) e à Cafeína (via receptor de rianodina), concordando com um estudo que analisou uma erva medicinal chinesa denominada *Cinnamomum cassia*, que teve efeito semelhante (XUE *et al.*, 2011) e o estudo da Curcuma longa, da família Zingiberaceae (ADARAMOYE *et al.*, 2009).

Em adição a estes achados, um estudo pré-clínico que analisou o efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* sobre o coração e músculo atrial isolado de rato, constatou que ocorreu efeito inotrópico negativo, e quando analisados os miócitos cardíacos isolados pela técnica de patch-clamp, constatou-se que a ocorrência de bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (SANTOS *et al.*, 2011).

Os experimentos realizados em tecido vascular isolado de rato sugerem que a vasodilatação induzida pela FMOEAz é mediada por uma ação direta dessa substância sobre o músculo liso vascular, uma resposta que, provavelmente, envolve o bloqueio do influxo de cálcio extracelular e interferência nos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Clinicamente, os antagonistas do cálcio são usados para o tratamento da hipertensão, devido sua habilidade de induzir relaxamento do músculo liso.

Baseado nos efeitos vasculares de relaxamento identificados nos experimentos *in vitro* com preparações de aorta de ratos, confirma-se a redução da pressão arterial observada no estudo *in vivo*, bem como a indicação tradicional da *Alpinia zerumbet* para redução da hipertensão arterial.



---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos científicos de plantas utilizadas na medicina popular são primordiais para a identificação de suas atividades farmacológicas e mecanismo de ação, bem como para determinação da toxicidade. Nesse contexto, os estudos pré-clínicos representam o ponto de partida para posterior análise dessas substâncias em seres humanos, através dos estudos de Fase I, II, III e IV. Acompanhando esse percurso, os fitomedicamentos poderão ser indicados de forma específica e utilizados com segurança e eficácia pela população.

Ressalta-se que a biodiversidade do Brasil associada à prática da medicina popular nos permite a realização de estudos em diversas áreas da Farmacologia, o que pode diminuir o custo do medicamento para o consumidor, que às vezes, por falta de recursos não tem acesso aos medicamentos que são indispensáveis para a manutenção de sua saúde.

Comprovamos nesta pesquisa a indicação medicinal popular da *Alpinia zerumbet* para o tratamento de estados hipertensivos. De forma geral, nossos achados mostraram que: o OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz têm atividade vasodilatadora *in vitro*; a FHOEAz tem efeito bifásico acentuado; A FMOEAz tem menor CE<sub>50</sub> que a FCOEAz, OEAz e FHOEAz, respectivamente; o OEAz, FHOEAz, FCOEAz e FMOEAz reduzem a pressão arterial *in vivo* em ratos submetidos ao modelo de hipertensão crônica por inibição do óxido nítrico de maneira superior ao controle negativo (água destilada) e inferior ao controle positivo (Captopril e Nifedipina), de forma que o grupo tratado com FMOEAz apresentou mais pontos estatisticamente significantes quando comparado aos valores da pressão arterial do pré-tratamento; e o mecanismo de ação da FMOEAz, provavelmente, envolve o antagonismo aos canais de cálcio dependentes de voltagem, aos canais de cálcio operados por receptor, interferindo também na liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

Novas perspectivas para estudos relacionados com esta temática e que poderiam comprovar os achados aqui descritos, constam da análise do influxo de cálcio por meio de microscopia de fluorescência e marcadores de cálcio, ou até

mesmo a aplicação de técnicas de patch-clamp para o estudo de canais e mensuração de eventos elétricos das membranas celulares.

Ademais, este estudo representa uma perspectiva futura para o ensaio clínico Fase I das frações ou do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, significando assim, a inserção destes compostos na área da pesquisa clínica com seres humanos, que tem por objetivo a formulação de um fitoterápico para tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Destacamos a necessidade de mais pesquisas sobre esta temática, considerando o atual consumo dos fitomedicamentos no contexto nacional e internacional, bem como a importância de pesquisas na área da farmacologia cardiovascular e tratamento de doenças crônicas, como a hipertensão.



---

**CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

As frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* apresentam atividade vasodilatadora *in vitro* e hipotensora *in vivo* e, o mecanismo de ação da FMOEAz provavelmente, envolve o antagonismo aos canais de cálcio dependentes de voltagem, aos canais de cálcio operados por receptor, interferindo também na liberação de cálcio dos estoques intracelulares.



---

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4 ed. USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

ADARAMOYE, O.A.; ANJOS, R.M.; ALMEIDA, M.M.; VERAS, R.C.; SILVIA, D.F.; OLIVEIRA, F.A.; CAVALCANTE, K.V.; ARAÚJO, I.G.; OLIVEIRA, A.P.; MEDEIROS, I.A. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 457-462, 2009.

AHN, M.Y.; JUNG, Y.E.; JEE, S.D.; KIM, C.S.; LEE, S.H.; MOON, C.H.; CHO, S.I.; LEE, B.M.; RYU, K.S. Anti-hypertensive effect of the Dongchunghacho, *Isaria sinclairii*, in the spontaneously hypertensive rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 4, p. 493-501, 2007.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of vascular tone. **Journal of Anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007.

ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 109-121, 2004.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora, 1993. 341p.

ANOZIE, O.; ROSS, R.; OYEKAN, A.O.; YAKUBU, M.A. Differential modulation of bradykinin-induced relaxation of endothelin-1 and phenylephrine contractions of rat aorta by antioxidants. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 10, p. 1566-1572, 2007.

ANSELM, E.; CHATAIGNEAU, M.; NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINKERTH, V.B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 404-413, 2007.

ARAÚJO, C.B.L.; BENDHACK, L.M. Calcium and anococcygeus smooth muscle contraction. **Currents Topics in Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 143-153, 2003.

ARAÚJO, F.Y.R.; SILVA, M.I.G.; MOURA, B.A.; OLIVEIRA, G.V.; LEAL, L.K.A.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M.O.; SOUSA, F.C.F.; MACÊDO, D.S. Central nervous system effects of the essential oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1521-1527, 2009.

ARAÚJO, P.F.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; FERREIRA, S.C.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antinociceptive effects of the essential oil of on mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6, p. 482-486, 2005.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3.ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620p.

ASSREUY, A.M.; PINTO, N.V.; MOTA, M.R.; MEIRELES, A.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NOBRE, C.B.; SOARES, P.M.; CAVADA, B.S. Vascular smooth muscle relaxation by a lectin from *Pisum Arvense*: evidences of endothelial NOS pathway. **Protein & Peptide Letters**, v.18, n. 11, p. 1107-1111, 2011.

BARRET, S.C.H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 274-84, 2002.

BEZERRA, M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 549-551, 2000.

BARCELOS, F.F; OLIVEIRA, M.L.; GIOVANINNI, N.P.B.; LINS, T.P.; FILOMENO, C.A.; SCHNEIDER, S.Z.; PINTO, V.D.; ENDRINGER, D.C.; ANDRADE, T.U. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B., DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 278-881, 1992.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215-222, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Organizadores: Fabienne Petitinga de Paiva; Vitor Valério Maffili; Ana Carla Sampaio Santos. Salvador, 2005. 28p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos**. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2008. 19p.

CAMPANA, E.M.G.; BRANDÃO, A.A.; POZZAN, R.; FONSECA, F.L.; PIZZI, O.L.; MAGALHÃES, M.E.C.; FREITAS, E.V.; BRANDÃO, A.P. Pressão arterial e perfil antropométrico e metabólico de indivíduos jovens acompanhados por 16 anos e estratificados pelo comportamento da pressão arterial: estudo do Rio de Janeiro. **Adolescência e Saúde**, v. 4, n. 4, p. 49-56, 2007.

CAMPANA, P.R.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. **Phytomedicine**, v. 16, n. 5, p. 456-461, 2009.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W.A., CHANDY, K.G.; GUTMAN, G.A. **The IUPHAR Compendium of voltage-gated ion channels**. Leeds: IUPHAR Media, 2002. 235p.

CESARINO, C.B.; CIPULLO, J.P.; MARTIN, J.F.; CIORLIA, L.A.; GODOY, M.R.; CORDEIRO, J.A.; RODRIGUES, I.C. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 1, p. 29-35, 2008.

CHEN, G.; YE, Y.; LI, L.; YANG, Y.; QIAN, A.; HU, S. Endothelium-independent vasorelaxant effect of dodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 84, p. 81-88. 2009.

CHEONG, A.; QUINN, K.; DEDMAN, A.M.; BEECH, D.J. Activation thresholds of  $K_v$ , BK and  $Cl_{Ca}$  channels in smooth muscle cells in pial precapillary arterioles. **Journal of Vascular Research**, v. 39, p. 122-130, 2002.

CHIWORORO, W.D.H.; OJEWOLE, J.A.O. Biphasic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated vascular smooth muscles. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 6, p. 217-229, 2008.

CONEN, D.; GLYNN, R.J.; RIDKER, P.M.; BURING, J.E.; ALBERT, M.A. Socioeconomic status, blood pressure progression, and incident hypertension in a prospective cohort of female health professionals. **European Heart Journal**, v. 30, n. 11, p. 1378-1384, 2009.

CUNHA, G.H.; FECHINE, F.V.; SANTOS, L.K.X.; PONTES, A.V.; OLIVEIRA, J.C.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.E.A. Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, p. 153-159, 2011.

CURWEN, J.O.; MUSGROVE, H.L.; KENDREW, J.; RICHMOND, G.H.; OGILVIE, D.J.; WEDGE, S.R. Inhibition of vascular endothelial growth factor- $\alpha$  signaling induces hypertension examining the effect of cediranib (recentin; AZD2171) treatment on blood pressure rat and the use of concomitant antihypertensive therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 10, p. 3124-3131, 2008.

ERTEL, E.A.; CAMPBELL, K.P.; HARPOLD, M.M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T.P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R.W. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533-535, 2000.

ESTRADA-SOTO, S.; RIVERA-LEYVA, J.; RAMÍREZ-ESPINOSA, J.J.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; AGUIRRE-CRESPO, F.; HERNÁNDEZ-ABREU, O. Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Valerianaceae) and its mode of action as calcium channel blocker. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 9, p. 1167-1174, 2010.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.

FAZAN JR, R.; SILVA, V.J.D.; SALGADO, H.C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

FLECKENSTEIN, A.; TRITTHART, H.; FLACKENSTEIN, B.; HERBST, A.; GRUN, G. A new group of competitive divalent Ca antagonists (iproveratril, D 600, prenylamine) with potent inhibitory effects on electromechanical coupling in mammalian myocardium. **European Journal of Physiology**, v. 25, p. 307, 1969.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers**. U.S., 2005. 30p.

FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal of Pharmacology and Toxicological Methods**, v. 58, p. 215-221, 2008.

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

GODFRAIND, T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 360, p. 2259-2272, 2005.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine of the contraction induced by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 35, p. 354-355, 1969.

GOLLASCH, M.; HELLMAN, G.C.; KNOT, H.J.; JAGGAR, J.H.; DAMON, D.H.; BONEV, A.D.; NELSON, M.T. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  sparks as elementary physiological events. **Circulation Research**, v. 83, p. 1104-1114, 1998.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11.ed. USA: Elsevier Saunders: 2006, 1104p.

HE, F.J.; MACGREGOR, G.A. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. **Journal of Human Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 363-384, 2008.

HIPÓLITO, U.V.; ROCHA, J.T.; PALAZZIN, N.B.; RODRIGUES, G.J.; CRESTANI, C.C.; CORRÊA, F.M.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S.R.; BENDHACK, L.M.; RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R. The semi-synthetic kaurane ent-16 $\alpha$ -methoxykauran-19-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, p. 402-410, 2011.

HIPÓLITO, U.V.; RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; BENDHACK, L.M.; COSTA, F.B.; TIRAPELLI, C.R. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3 $\beta$ -ol in the isolated rat aorta. **Cardiovascular Pharmacology**, v. 616, p. 183-191, 2009.

HIRATA, S.; ENOKI, T.; KITAMURA, R.; VINH, V.H.; NAKAMURA, K.; MORI, K. Effects of isoflurane on receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels in rat aortic smooth muscle. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 81, p. 578-583, 1998.

HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. **The Journal of Physiology**, v. 116, p. 449-472, 1952.

HOE, S.; LEE, C.; MOK, S.; KAMARUDDIN, M.Y.; LAM, S. *Gynura procumbens* Merr. decreases blood pressure in rats by vasodilatation via inhibition of calcium channels. **Clinics**, v. 66, n. 1, p. 143-150, 2011.

IRVINE, R.J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 38, p. 157-162, 1997.

KAMADYAAPA, D.R.; GONDWE, M.M.; MOODLEY, K.; OJEWOLE, J.A.; MUSABAYANE, C.T. Cardiovascular effects of *Ekebergia capensis* Sparrm (Meliaceae) ethanolic leaf extract in experimental animal paradigms. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 20, n. 3, p. 162-167, 2009.

KARMAZÍNOVÁ, M.; LACINOVÁ, L. Measurement of Cellular Excitability by Whole Cell Patch Clamp Technique. **Physiological Research**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2010.

KRESS, W.J.; PRINCE, L.M.; WILLIAMS, K.J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 10, p. 1682-1696, 2002.

LAHLOU, M.S.; FIGUEIREDO, A.F.; MAGALHÃES, P.J.; LEAL-CARDOSO, J.H. Cardiovascular effects of 1, 8-cineole, a terpenoide oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 12, p.1125-1131, 2002b.

LAHLOU, M.S.; GALINDO, C.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C.; DUARTE, G.P. 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, 2002a.

LAHLOU, M.S.; INTERAMINENSE, L.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; DUARTE, G.P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main

constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 323-330, 2003.

LARANJA, S.M.; BERGAMASCHI, C.M.; SCHOR, N. Evaluation of three plants with potential diuretic effect. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 38, n.1, p. 13-16, 1992.

LEAL-CARDOSO, J.R.; MOREIRA, M.R.; PINTO DA CRUZ, G.M.; MORAIS, S.M.; LAHLOU, M.S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, p. 549-553, 2003.

LEE, J.; OAK, M.; JUNG, S.H.; PARK, D.H.; AUGER, C.; KIM, K.R.; LEE, S.; SCHINI-KERTH, V.B. An ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* stems causes NO-mediated endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings and prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, n. 6, p. 635-645, 2011.

LIMA-ACCIOLY, P.M.; LAVOR-PORTO, P.R.; CAVALCANTE, F.S.; MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; MORAIS, S.M.; LEAL-CARDOSO, J.H. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 1158-1163, 2006.

LIMA, F.J.B.; BRITO, T.S.; FREIRE, W.B.S.; COSTA, R.C.; LINHARES, M.I.; SOUSA, F.C.F.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J.C. The essential oil of *Eucalyptus tereticornis*, and its constituents  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, potentiate acetylcholine-induced contractions in isolated rat trachea. **Fitoterapia**, v. 81, p. 649-655, 2010.

LIN, L.; PENG, C.; LIANG, Y.; YEH, W.; WANG, H.; YU, T.; PENG, R.Y. *Alpinia zerumbet* potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4435-4443, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. São Paulo: Editora Plantarum, 1995. 35p.

LU, X.; BEAN, J.S.; KASSAB, G.S.; REKHTER, M.D. Protein kinase C inhibition ameliorates functional endothelial insulin resistance and vascular smooth muscle cell hypersensitivity to insulin in diabetic hypertensive rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, n. 48, p. 1-11, 2011.

MACMILLAN, D.; MCCARRON, J.G. Regulation by FK506 and rapamycin of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: the role of FK506 binding proteins and mTOR. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1112-1120, 2009.

MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; LUCÁ, DM; COELHO-DE-SOUZA, L.N.; FROTA, P.T.T.; COSTA, A.M.G.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 169-177, 2008.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267p.

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

MAHMOOD, Z.A.; SUALEH, M.; MAHMOOD, S.B.; KARIM, M.A. Herbal treatment for cardiovascular disease the evidence based therapy. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 119-124, 2010.

MICHEL, T.; HOFFMAN, B.B. Treatment of myocardial ischemia and hypertension. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGrawHill, 2011. cap. 27, p. 745-788.

MILESI, V.; AIELLO, E.A.; REBOLLEDO, A.; GOMES, A.A.; GRASSI DE GENDE, A.O. Role of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells. **Pflügers Archiv – European Journal of Physiology**, v. 437, p. 455-461, 1999.

MIZUNO, Y.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Advances in pharmacology modulation of nitric oxide in hypertension. **Current Cardiology Reports**, v. 12, n. 6, p. 472-480, 2010.

MOORE, B. In Memory of Sidney Ringer [1835-1910]. Some account of the Fundamental Discoveries of the Great Pioneer of the Bio-Chemistry of Crystall-colloids in Living Cells. **Biochemical Journal**, v. 5, p. 6-7, 1911.

MORAES, M.E.A. **Studies of the clinical pharmacology of strontium as an in vitro and in vivo marker for calcium.** 1989. 239 f. Thesis (Doctoral in Pharmacology) – Green College and University Department of Clinical Pharmacology, University of Oxford, Oxford, 1989.

MORÁN, A; DE URBINA A.V.; MARTÍN, M.L.; RODRÍGUEZ-BARBERO, A.; ROMÁN, L.S. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, n. 1, p. 90-96, 2009.

MOTULSKY, H. J. **Analyzing Data with GraphPad Prism.** San Diego: GraphPad Software Inc., 1999. 379 p.

MOTULSKY, H. J. **Prism 4 Statistics Guide – Statistical analyses for laboratory and clinical researches.** San Diego: GraphPad Software Inc., 2003. 148 p.

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) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

OLIVEIRA, C.M.; PEREIRA, A.C.; ANDRADE, M.; SOLER, J.M.; KRIEGER, J.E. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. **BMC Medical Genetics**, v. 9, n. 32, p. 1-8, 2008.

OLOYO, A.K.; SOFOLA, O.A.; NAIR, R.R.; HARIKRISHNAN, V.S.; FERNANDEZ, A.C. Testosterone relaxes abdominal aorta in male Sprague-Dawley rats by opening potassium ( $K^+$ ) channel and blockade of calcium ( $Ca^{2+}$ ) channel. **Pathophysiology**, v. 18, n. 3, p. 247-253, 2011.

PATEL, R.J.; PATEL, P.D.; PATEL, M.M.; PATEL, N.J.; THYAGARAJAN, B. Mechanisms of potentiation of Angiotensin II-induced contractile response of isolated rat aorta by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, n. 3, p.140-143, 2009.

PESCATELLO, L.S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARGUHAR, W.B.; KELLEY, G.A.; RAY, C.A. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 3, p. 533-553, 2004.

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

RAINFORTH, M.V.; SCHNEIDER, R.H.; NIDICH, S.I.; GAYLORD-KING, C.; SALERNO, J.W.; ANDERSON, J.W. Stress reduction programs in patients with elevated blood pressure: a systematic review and meta-analyses. **Current Hypertension Reports**, v. 9, n. 6, p. 520-528, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Pharmacology**. 6. ed. USA: Churchill Livingstone, 2007. 844p.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE-NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, p. 298-303, 1992.

RIBEIRO, T.P. **Estudo da atividade cardiovascular do  $\alpha$ -terpineol em ratos - abordagens *in vivo* e *in vitro***. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

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

RINALDI, G.; FRITZ, M. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 58, p. 215-221, 2008.

RINGER, S. A further contribution regarding the influence of the blood on the contraction of the heart. **Journal Physiology**, v. 4, p. 29-42, 1883.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annual Review of Physiology**, v. 46, p. 455-472, 1984.

SANTOS, B.A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M.S.; MIRANDA, F.M.; CARNEIRO, D.C.; CAVALCANTE, P.H.; CÂNDIDO, E.A.; FILHO, L.X.; CRUZ, J.S.; GONDIM, A.N. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type  $Ca^{2+}$  current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 539-543, 2011.

SATO, A.; SAKUMA, I.; GUTTERMAN, D.D. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 6, p. 2345-2354, 2003.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J.P. Gênero, idade, nível social e fatores de risco cardiovascular: considerações sobre a realidade brasileira. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 3, p. 54-56, 2009.

SENEJOUX, F.; GIRARD, C.; AISA, H.A.; BAKRI, M.; KERRAM, P.; BERTHELOT, A.; BÉVALOT, F.; DEMOUGEOT, C. Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, doi: 10.1016/j.jep.2011.08.012, 2011.

SEOK, Y.M.; CHOI, Y.W.; KIM, G.; KIM, H.Y.; TAKUWA, Y.; KIM, K. Effects of gomisins A on vascular contraction in rat aortic rings. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, p. 45-56, 2011.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, p. 223-239, 1962.

SILVA, B.R. **Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico "Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)" em aorta de ratos.** 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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, 1999. cap. 18, p. 387-416.

SOARES, K.C.N. **Estudo do efeito vasorrelaxante e hipotensor do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. em ratos.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSAO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

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

STILES, P. G. On the rhythmic activity of the oesophagus and the influence upon it of various media. **American Journal of Physiology**, v. 5, p. 338-357, 1901.

STRAZZULO, P.; D'ELIA, L.; KANDALA, N.B.; CAPPUCCHIO, F.P. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. **British Medical Journal**, v. 339, p. 1-9, 2009.

TAMMARO, P.; SMITH, A.L.; HUTCHINGS, S.R.; SMIRNOV, S.V. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, p. 303-317, 2004.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; TOSTES, R.C. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 609-702, 2010.

TOM, E.N.L.; DEMOUGEOT, C.; MTOPI, O.B.; DIMO, T.; DJOMENI, P.D.D.; BILANDA, D.C.; GIRARD, C.; BERTHELOT, A. The aqueous extract of *Terminalia superba* (Combretaceae) prevents glucose-induced hypertension in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 828-833, 2011.

TOMLINSON, P.B. Commelinales – Zingiberales. In: METCALFE, C.R. **Anatomy of the monocotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1969. p. 341-359.

TOMLINSON, P.B. Studies in the systematic anatomy of the Zingiberaceae. **Journal of the Linnean Society**, v. 55, p. 547-592, 1956.

TSIEN, R.W.; TSIEN, R.Y. Calcium channels, stores, and oscillations. **Annual Review of Cell Biology**, n. 6, p. 715-760, 1990.

UMAR, A.; IMAM, G.; YIMIN, W.; KERIM, P.; TOHTI, I.; BERKÉ, B.; MOORE, N. Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in

renovascular hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 33, n. 7, p. 727-730, 2010.

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.

VAN VLIET, V.N.; CHAFE, L.L.; ANTIC, V.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; MONTANI, J.P. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 361-373, 2000.

VERGARA-GALICIA, J.; ORTIZ-ANDRADE, R.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; IBARRA-BARAJAS, M.; GALLARDO-ORTIZ, I.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. **Vascular Pharmacology**, v. 49, p. 26-31, 2008.

WANG, Y.; WANG, S.; WIER, W.G.; ZHANG, Q.; JIANG, H. Exercise improves the dilatation function of mesenteric arteries in postmyocardial infarction rats via a PI3K/Akt/Enos pathway-mediated mechanism. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, v. 299, p. H2097-H2106, 2010.

WONGSAWATKUL, O.; PRACHAYASITTIKUT, S.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; SATAYAVIVAD, J.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUT, V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2724-2744, 2008.

XUE, Y.; SHI, H.; MURAD, F.; BIAN, K. Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta. **Vascular Health and Risk Management**, v. 7, p. 273-280, 2011.

YEH, J.; LIOU, S.; LIANG, J.; LEE, C.; CHIU, C.; LIN, Y.; CHEN, I. Labeledipinedilol-C: A third-generation dihydropyridine-type calcium channel antagonist displaying K<sup>+</sup> channel opening, NO-dependent and adrenergic antagonist activities. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 130-140, 2005.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001, p. 500.

ZHANG, N.; ZOU, H.; JIN, L.; WANG, J.; ZHONG, M.; HUANG, P.; GU, B.; MAO, S.; ZHANG, C.; CHEN, H. Biphasic effects of sodium danshensu on vessel function in isolated rat aorta. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, p. 421-428, 2010.

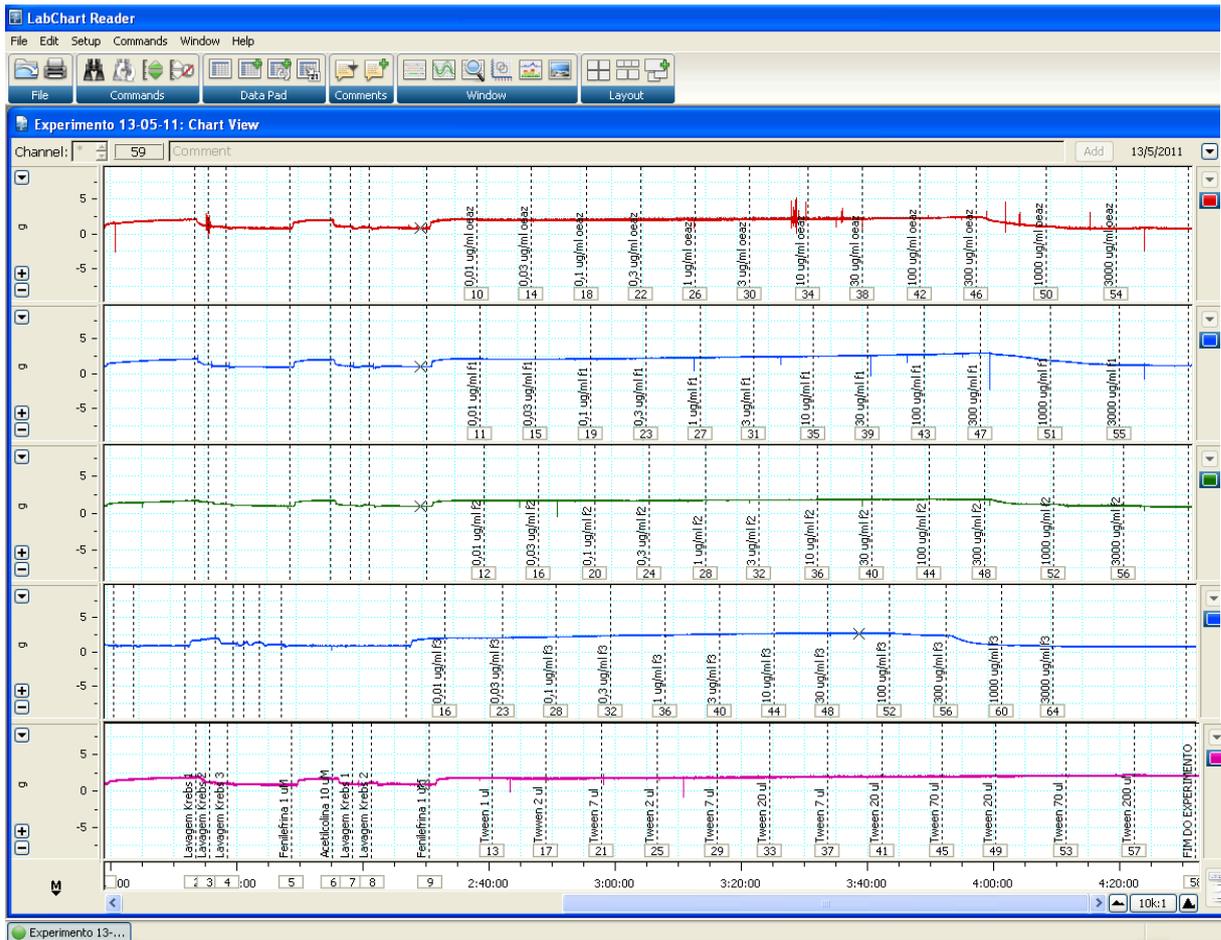
ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.



---

# APÊNDICE

**APÊNDICE A – Exemplo de traçado obtido no experimento de reatividade vascular inicial para análise do efeito vasodilatador do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* e suas frações hexânica, clorofórmica e metanólica**



OEAz: Óleo essencial da *Alpinia zerumbet*

F1: Fração hexânica do OEAz

F2: Fração clorofórmica do OEAz

F2: Fração metanólica do OEAz



---

# ANEXOS

**ANEXO A – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA):****Projeto I**

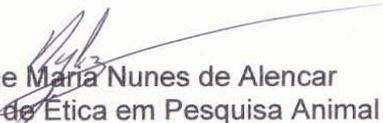
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº55/10, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DA ALPINIA ZERUMBET EM RATOS HIPERTENSOS.”** de responsabilidade de GILMARA HOLANDA DA CUNHA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 13 de setembro de 2010.

  
Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

*Gilmara Holanda de Cunha*

**ANEXO B – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA):  
Projeto II**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 18/2011, sobre o projeto intitulado: **“EFEITO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E METANÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NA REATIVIDADE VASCULAR *in vitro* E NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES *in vivo*”**, de responsabilidade de Gilmara Holanda da Cunha, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 30 de agosto de 2011.

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA