



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

LUZIANE GOMES DA SILVA

**ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA QUITOSANA SULFATADA EM
RATOS NORMOTENSOS**

FORTALEZA

2022

LUZIANE GOMES DA SILVA

ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA QUITOSANA SULFATADA EM
RATOS NORMOTENSOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós -
Graduação em Ciências Cardiovasculares do
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Área de Concentração: Farmacologia
Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra
Siqueira

Fortaleza

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

S581e Silva, Luziane Gomes da.
Estudo dos efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada em ratos normotensos / Luziane Gomes da Silva. – 2022.
55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra Siqueira.

1. Quitosana Sulfatada. 2. Sistema Nervoso Autônomo. 3. Efeitos Cardiovasculares. I. Título.

CDD 616.1

LUZIANE GOMES DA SILVA

ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA QUITOSANA SULFATADA EM
RATOS NORMOTENSOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós -
Graduação em Ciências Cardiovasculares do
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.
Área de Concentração: Farmacologia
Cardiovascular.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra Siqueira (Presidente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Diego Barbosa de Queiroz
Universidade de Pernambuco (UPE)

A minha mãe, Marluce Alberto Gomes (*in memoriam*).

A minha avó, Antônia Alberto Gomes (*in memoriam*).

Ao meu avô, Edgar Braz da Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por sua presença misericordiosa em minha vida, por ser meu alicerce e minha fortaleza.

Agradeço a minha mãe, Marluce, que em vida e em morte me ensinou que nada e ninguém podem limitar meus sonhos, que deis de sempre me ensinou a ser forte e corajosa.

Aos meus avós maternos, Antônia e Edgar, que na simplicidade me ensinaram a valorizar cada pequena conquista e a valorizar acima de tudo quem eu sou.

Aos meus irmãos, Juliana e Eduardo, que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis e que me acolheram mesmo nas diferenças.

Aos meus familiares, em especial ao meu Pai, Cesar, e Tia materna, Francisca, que, apesar de nossas diferenças, sempre respeitaram a minha forma de ver a vida e me apoiaram em minhas decisões.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram a não desistir dos meus sonhos.

Aos meus professores que passaram em minha vida e me ensinaram a valorizar a educação. Em especial a minha eterna Professora e Orientadora da graduação, Juliana Madeira, que muito me ensinou e enxergou em mim um potencial que até então eu desconhecia. Minha eterna gratidão.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFC) e do Programa de Pós – Graduação em Ciências Cardiovasculares (PPGCardio), em especial ao Édipo que sempre esteve ao meu lado durante esses anos de mestrado e que sempre me apoio e ajudou nos experimentos. Agradeço pelas contribuições, conhecimento compartilhado e por todos os momentos de descontração que foram de extrema importância para o continuamento desta pesquisa.

Ao Professor Rodrigo Silveira Vieira, a aluna Sandy Danielle Lucindo Gomes e ao Departamento de Engenharia Química da UFC pelo fornecimento da quitosana sulfatada, o meu obrigada.

Ao meu Orientador Dr. Rodrigo por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me deu em me orientar. Pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, colaborando no desenvolvimento das pesquisas.

Ao meu amigo Gustavo Amarante, que tanto me ajudou a entender o universo da estatística, minha eterna gratidão.

Aos Professores Richard, Armênio e Cláudia que aceitaram o convite para fazerem parte da minha banca de qualificação e aos Professores Rodrigo (Orientador), Camila e Diego que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa. O meu muito obrigada por todas as contribuições, foi de grande valia para o aperfeiçoamento do meu estudo.

A UFC, a todos os funcionários e laboratórios do Centro de Biomedicina da UFC, por terem me dado a chance e todos os instrumentos que me possibilitaram chegar ao final desse ciclo.

A CAPES, pelo incentivo à pesquisa e suporte financeiro que me ofereceu durante o meu mestrado.

Tenho os meus ideais o meu modo de pensar e os meus planos, embora ainda me falte a capacidade de traduzir tudo isto em palavras. -
O Diário de Anne Frank

RESUMO

Os polímeros naturais de modo geral são de fácil obtenção, seguros, não-tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e são encontrados em abundância na natureza. A quitosana é um polissacarídeo derivado N-desacetilado da quitina, encontrado em componentes de exoesqueletos de crustáceos e insetos, bem como em algumas paredes celulares de bactérias e fungos. A introdução de grupos sulfato (SO_4^{2-}) na cadeia de quitosana pode reduzir a sua propriedade trombogênica, uma vez que essa modificação a torna com carga superficial negativa, o que causa a repulsão eletrostática de proteínas do sangue carregadas negativamente. A quitosana sulfatada é um tipo de polissacarídeo semelhante a heparina e seu maior grau de sulfatação comparado a outros polissacarídeos sulfatados naturais promove um grande interesse em seu estudo e aplicabilidade. O desenvolvimento de novos biomateriais utilizando a quitosana como matéria prima impulsiona o campo de pesquisa e torna-o atraente para a indústria farmacêutica. O que tem sido corroborado pelo aumento de números de estudos e publicações científicas nos últimos anos tendo como base a interação da quitosana com o sistema biológico. Entretanto, ainda não existem dados referentes aos efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada administrada por via sistêmica. O projeto proposto tem como objetivo geral estudar os efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada em ratos normotensos. No presente estudo avaliou-se os efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada, utilizando abordagens *in vivo* para avaliar a PAM e a FC em ratos normotensos e abordagem *in vitro* em anéis de artéria aorta torácica de ratos. Como principais resultados foi observado que a quitosana sulfatada induziu uma bradicardia e hipotensão nas doses administradas em ratos normotensos anestesiados. O efeito da quitosana foi apresentada em duas fases. A primeira fase, denominada P1, corresponde a fase de resposta rápida. E a segunda fase, denominada aqui como P2, é a fase de recuperação para o valor inicial, ou próximo, a injeção de quitosana sulfatada. As duas fases do efeito da quitosana foram vistas tanto com o nervo vago intacto como após a vagotomia bilateral. Com relação a frequência cardíaca, a quitosana induziu uma leve taquicardia após o tratamento com o L-NAME e na pressão arterial média a quitosana dobrou sua resposta hipotensora, se comparados com ratos normotensos. E nos estudos *in vitro* a quitosana induziu vasodilatação em anéis de aorta, não dependendo da integridade da camada endotelial para induzir relaxamento. Em preparações teciduais mantidas sob o tônus basal a quitosana sulfatada não apresenta resposta significativa, ou seja, não apresenta nenhum tipo de efeito vascular.

Palavras-chave: Quitosana Sulfatada. Sistema Nervoso Autônomo. Efeitos Cardiovasculares.

ABSTRACT

STUDY OF CARDIOVASCULAR EFFECTS OF SULPHATED CHITOSAN IN NORMOTENSE RATS

Natural polymers are generally easy to obtain, safe, non-toxic, biocompatible, biodegradable and found in abundance in nature. Chitosan is an N-deacetylated polysaccharide derived from chitin, found in exoskeleton components of crustaceans and insects, as well as in some cell walls of bacteria and fungi. The introduction of sulfate groups (SO₄²⁻) in the chitosan chain can reduce its thrombogenic property, since this modification makes it with a negative surface charge, which causes the electrostatic repulsion of negatively charged blood proteins. Sulfated chitosan is a kind of heparin-like polysaccharide and its higher degree of sulfated compared to other natural sulfated polysaccharides promotes great interest in its study and applicability. The development of new biomaterials using chitosan as a raw material boosts the research field and makes it attractive to the pharmaceutical industry. This has been corroborated by the increase in the number of studies and scientific publications in recent years based on the interaction of chitosan with the biological system. However, there are still no data regarding the cardiovascular effects of sulfated chitosan administered systemically. The proposed project aims to study the cardiovascular effects of sulfated chitosan in normotensive rats. In the present study, the cardiovascular effects of sulfated chitosan were evaluated, using in vivo approaches to assess MAP and HR in normotensive rats and an in vitro approach in rats' thoracic aorta artery rings. As main results, it was observed that sulfated chitosan induced bradycardia and hypotension at the doses administered in anesthetized normotensive rats. The effect of chitosan was presented in two phases. The first phase, called P1, corresponds to the rapid response phase. And the second phase, named here as P2, is the recovery phase for the initial value, or close to it, the injection of sulfated chitosan. The two phases of chitosan effect were seen both with the vagus nerve intact and after bilateral vagotomy. With regard to heart rate, chitosan induced a mild tachycardia after treatment with L-NAME and in mean arterial pressure chitosan doubled its hypotensive response compared to normotensive rats. And in in vitro studies, chitosan induced vasodilation in aortic rings, not depending on the integrity of the endothelial layer to induce relaxation. In tissue preparations maintained under basal tonus, sulfated chitosan does not show a significant response, that is, it does not show any type of vascular effect.

Keywords: Sulfated Chitosan. Autonomic Nervous System. Cardiovascular Effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da quitosana	13
Figura 2 - Efeito bifásico da quitosana sulfatada na frequência cardíaca	30
Figura 3 – Gráfico referente a resposta da quitosana sulfatada na frequência cardíaca em ratos anestesiados	31
Figura 4 – Efeito bifásico da quitosana sulfatada na PAM	32
Figura 5 – Gráfico referente a resposta da quitosana sulfatada na pressão arterial média em ratos anestesiados	32
Figura 6 - Comparação da resposta bifásica da frequência cardíaca antes e após vagotomia bilateral	34
Figura 7 - Efeito da quitosana sulfatada na frequência cardíaca antes e após a realização bivagotomia	34
Figura 8 - Comparação da resposta bifásica da pressão arterial média antes e após vagotomia bilateral	35
Figura 9 - Efeito da quitosana sulfatada na pressão arterial média antes e após a realização vagotomia bilateral	35
Figura 10 - Comparação entre o efeito da quitosana sulfatada sobre a frequência cardíaca antes e após o tratamento com L_NAME	37
Figura 11 - Efeito da quitosana sulfatada sobre a frequência cardíaca antes e após o tratamento com L_NAME	37
Figura 12 - Comparação entre o efeito da quitosana sulfatada sobre a pressão arterial média antes e após o tratamento com L_NAME.	38
Figura 13 - Efeito da quitosana sulfatada sobre a pressão arterial média antes e após o tratamento com L_NAME	38
Figura 14 – Avaliação dos efeitos da quitosana sulfatada (1 – 1000 µg/mL) sobre o tônus basal de aorta de ratos	40
Figura 15 – Efeito vasculares da quitosana sulfatada (1 – 1000 µg/mL) em aorta isolada de rato pré-contraída com KCl (60 mM)	41
Figura 16 – Curvas concentração-efeito para quitosana sulfatada (1 – 1000 µg/mL) na reversão da contração induzida pela Fen (1 µM) em anéis de aorta isolada de rato	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos	33
Tabela 2: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos antes e após bivaotomia.....	36
Tabela 3: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos antes e após tratamento com L-NAME.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância
ATP - Adenosina trifosfato
CE₅₀ - Concentração efetiva capaz de produzir 50% do efeito máximo
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAG - Diacilglicerol
E.P.M - Erro padrão da média
EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF - Fator de relaxamento derivado do endotélio
FC - Frequência cardíaca
IP₃ - Trifosfato de inositol
KCl - Cloreto de potássio
L-NAME - L-nitro-arginina-metil-ester
MLC - Cadeia leve de miosina
MLCK - Cinase da cadeia leve de miosina
MLCP - Fosfatase da cadeia leve de miosina
NO - Óxido nítrico
PAM – Pressão arterial média
PGH₂ - Prostaglandina H₂
PKC - Proteína cinase C
PLC - Fosfolipase C
PS - Polissacarídeos sulfatados
QS - Quitosana sulfatada
ROC - Canal para cálcio operado por receptor
RS - Retículo sarcoplasmático
SNA - Sistema nervoso autônomo
SNC - Sistema nervoso central
SNE - Sistema nervoso entérico
SNP - Sistema nervoso parassimpático
SNS - Sistema nervoso simpático
SOC - Canal para cálcio operado por estoque
VE - Ventrículo esquerdo
VOC - Canal para cálcio operado por voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Quitosana	13
1.2 Quitosana e Medicina	15
1.1 Sistema Nervoso Autônomo	18
1.2 Músculo Liso	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Aspectos Normativos Éticos	25
4.2 Animais	25
4.3 Procedimentos de Sulfatação Quitosana	25
4.4 Procedimentos Experimentais “in vivo”	26
4.4.1 Instrumentação para o registro da pressão arterial sistêmica e da frequência cardíaca	26
4.4.2 Procedimentos experimentais em ratos anestesiados	26
4.5 Procedimentos experimentais “in vitro”	27
4.5.1 Preparações isoladas de vasos sanguíneos para estudo de contratilidade	27
4.5.2 Protocolos experimentais em preparações vasculares isoladas	28
4.6 Soluções e Drogas	29
4.7 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfata em ratos anestesiados	30
5.2 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfatada em ratos bivagotomizados	33
5.3 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfatada em ratos após tratamento com L-NAME	36
5.4 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada no tônus basal de aorta isolada de rato	39
5.5 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada em contrações induzidas por KCL (60mM) em aorta isolada de ratos	40
5.6 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada em contrações induzidas por Fen (1uP) em aorta isolada de ratos	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	54

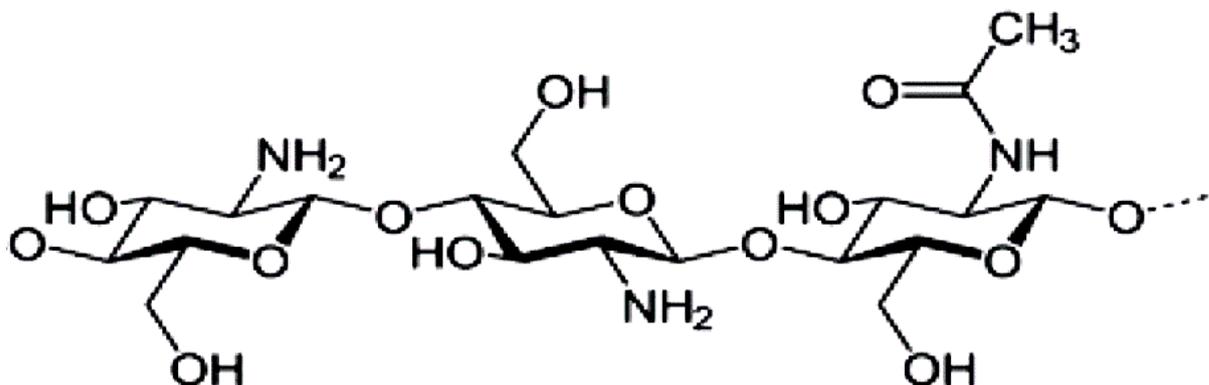
1 INTRODUÇÃO

1.1 Quitosana

Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos que podem ser formados de um tipo único ou de diferentes tipos de monossacarídeos. Os polímeros naturais de modo geral são de fácil obtenção, seguros, não-tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e são encontrados em abundância na natureza. Como por exemplo as carapaças de crustáceos que são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira e sua utilização ou reutilização reduz o seu acúmulo onde são descartados, reduzindo, assim, seu impacto ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2007; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2010).

A quitosana é um polissacarídeo derivado N-desacetilado da quitina, encontrado em componentes de exoesqueletos de crustáceos e insetos, bem como em algumas paredes celulares de bactérias e fungos (Figura 1). Este polímero, possui boas propriedades físico-químicas, é linear e composto de unidades N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose ligados por uma ligação (1,4) - β -glicosídica. Possui em sua cadeia grupos amino (NH_2) e hidroxilas (OH) altamente reativos, o que facilita sua modificação química para as mais diversas aplicações, sem alterar o seu esqueleto fundamental (CHEUNG *et al.*, 2015; LIMA; ABREU, 2020; MORAES *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2018).

Figura 1: Estrutura química da quitosana.



Fonte: Negm *et al.*, 2020.

Essas funcionalidades químicas ao longo das cadeias são de particular interesse, principalmente porque podem ser usadas para dar à quitosana novas propriedades por meio de modificações químicas sem perturbar seu grau de polimerização (CAMPELO *et al.*, 2017; LARANJEIRA; FÁVERO, 2009; NEGM *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2013).

Essas modificações químicas podem melhorar sua solubilidade e produzem muitos tipos de derivados de quitosana. A modificação química é uma técnica poderosa para controlar a interação do polímero com outros componentes, como íons metálicos, compostos orgânicos, dentre outros (NEGM *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2018).

Polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas bioativas onde alguns dos grupos hidroxila dos resíduos de açúcar são substituídos por grupamentos sulfato. A sulfatação é uma modificação utilizada que torna a estrutura dos polissacarídeos com carga superficial negativa, o que facilita sua ação adsorvente através de mecanismo de complexação com íons metálicos que possuem carga superficial positiva (LIMA; ABREU, 2020).

A introdução de grupos sulfato (SO_4^{2-}) na cadeia de quitosana pode reduzir a sua propriedade trombogênica, uma vez que essa modificação a torna com carga superficial negativa, o que causa a repulsão eletrostática de proteínas do sangue carregadas negativamente. Ilustrando mecanismo biomolecular de atividade anticoagulante, antiviral e com baixa toxicidade (MORAES *et al.*, 2016; NEGM *et al.*, 2020; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2010).

A quitosana sulfatada é um tipo de polissacarídeo semelhante a heparina e seu maior grau de sulfatação comparado a outros polissacarídeos sulfatados naturais promove um grande interesse em seu estudo e aplicabilidade. É de baixa citotoxicidade e tem sido aplicada como anticoagulante sanguíneo eficaz (CAO *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2018). A atividade anticoagulante da quitosana sulfatada é produzida pela interação de grupos sulfato e segmentos peptídicos carregados positivamente. Estudos mostram que os grupos N -acetil melhoram a atividade anticoagulante (NEGM *et al.*, 2020; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2010).

A quitosana surge como uma candidata altamente promissora devido à sua versatilidade e utilização, conferindo excelentes condições de aplicabilidade variada na indústria de tecidos, indústria de alimentos, biotecnologia, agricultura e liberação de fármacos e biossensores para diagnósticos clínicos (AZEVEDO *et al.*, 2007; CAMPELO *et al.*, 2017; LARANJEIRA; FÁVERO, 2009; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2010).

Nos últimos anos houve um aumento do número de estudos e publicações científicas utilizando a quitosana, com ênfase em suas possíveis modificações estruturais, abrindo uma gama discussão sobre vários aspectos das aplicações biológicas e biomédicas deste biopolímero (CHEUNG *et al.*, 2015; LARANJEIRA; FÁVERO, 2009).

A quitosana tem sido investigada para sistemas de liberação de drogas devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, boa solubilidade em um valor de pH próximo da faixa

fisiológica e a presença de grupos amino ao longo da cadeia de quitosana que podem ser usados para posterior funcionalização (KANG *et al.*, 2014).

Uma das características principais da quitosana é que ela não induz inflamação nem provoca a resposta imune do organismo e suas soluções possuem propriedades bactericidas e bacteriológicas. A carga positiva na cadeia polimérica irá aderir às superfícies bacterianas, promovendo mudanças na permeabilidade da parede da membrana que bloqueia o crescimento microbiano (ZHAO *et al.*, 2018).

Estudos mostram que a quitosana pode acelerar a taxa de cicatrização de feridas através de interações entre plaquetas e grupos amino na quitosana. Possui várias características, como quimioatração, ativação de macrófagos e neutrófilos, aceleração do tecido de granulação e reepitelização. E suas propriedades hemostáticas têm sido utilizadas na cicatrização de feridas (ZHAO *et al.*, 2018).

A quitosana confere também uma outra característica interessante como a baixa alergenicidade, permitindo que ela seja utilizada em diversas aplicações. Além disso, a quitosana é relatada como tendo outras propriedades biológicas, como antitumoral, atividade antimicrobiana, antiviral e antioxidante (CHEUNG *et al.*, 2015; NEGM *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2013).

1.2 Quitosana Sulfatada e estudos promissores

No estudo de Kobata *et al.* (2020) demonstrou que a quitosana, polímero bioabsorvível, impregnado com ciprofloxacina é eficaz na prevenção da infecção em ratos com fratura exposta após contaminação com *Staphylococcus aureus*, quando a concentração de ciprofloxacina é superior a 25%.

Em seus estudos Piasecka-Zelga *et al.* (2018) mostraram que a menor resposta imune e o maior grau de fibroplasia foram observados para a tela de celulose bacteriana modificada com quitosana após um e três meses após o implante. Os estudos toxicológicos classificaram a tela celulose bacteriana modificada com quitosana testada como pouco irritante, sem sinais de sensibilização ou reações alérgicas observadas durante os estudos. Indicando que a tela de celulose bacteriana modificada com quitosana não irrita, não sensibiliza e não causa hipersensibilidade no local do implante e, portanto, apresenta baixo risco de provocar tais reações em humanos.

Santos *et al.* (2022) avaliaram experimentalmente os efeitos hemostáticos de duas substâncias orgânicas, uma membrana de quitosana e uma esponja de colágeno revestida com

trombina e fibrinogênio humano, no selamento de orifícios de agulhas 7-0 nas artérias femorais de ratos. E como resultados obtiveram reações inflamatórias menos exacerbadas nos animais que receberam membranas de quitosana ou esponja de colágeno. A membrana de quitosana apresentou capacidade hemostática semelhante à esponja de colágeno. E como a quitosana é fácil de encontrar na natureza, tem efeito positivo na promoção da hemostasia e não traz reações locais consideráveis, pode ser utilizada como selante em cirurgia cardiovascular.

Estudo sugere que a adição de coxins à base de quitosana no topo de dispositivos de compressão rotatório pode ser uma estratégia eficaz e segura para a hemostasia do local de punção após o acesso da artéria radial (KANG *et al.*, 2017).

Minto *et al.* (2020) analisaram a regeneração óssea obtida da aplicação do hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato em falha óssea experimentalmente induzida no rádio de coelhos. E após analisar a densidade mineral óssea, a radiopacidade e as características histopatológicas de animais tratados com gel à base de quitosana associado ao glicerol fosfato, puderam ser observados maior resposta e reparo ósseo, comprovando sua eficácia e utilidade na consolidação de defeitos ósseos críticos. Assim, é possível afirmar que o hidrogel de quitosana constitui biomaterial de características desejáveis, promovendo consolidação óssea mais rápida e eficiente, sem causar reações adversas.

Em avaliação do processo de cicatrização do tendão calcâneo utilizando-se a quitosana, em dois momentos, 60 e 90 dias, por meio de análises clínico-cirúrgica e histológica, pode-se concluir que a quitosana é um biopolímero com potencial para utilização em reparos tendíneos, por favorecer o processo de cicatrização tecidual sem complicações para o paciente (SANTANA *et al.*, 2014).

Estudo mostrou que o curativo de fibra de quitosana apresentou propriedades hemostáticas superiores ao curativo cirúrgico regular tipo gaze. O curativo de fibra de quitosana reduziu o tempo de hemostasia e efetivamente mitigou a perda e a absorção de sangue em um modelo animal de hemorragia da artéria femoral e em pacientes com feridas cirúrgicas (WANG *et al.*, 2019).

Wang *et al.* (2021) em seus estudos revelaram propriedades pró-coagulantes e antimicrobianas superiores do curativo de quitosana em comparação com o curativo cirúrgico regular do tipo gaze em pacientes com feridas cirúrgicas. Sugerindo que o curativo de quitosana não apenas atua como um antimicrobiano e pró-coagulante eficaz, mas também promove o reparo da ferida, fornecendo microbiota benéfica.

A quitosana tem um efeito hemostático e uma atividade antibiótica. No estudo de Chong *et al.* (2020) identificaram que uso de tampões de quitosana pode reduzir hemorragia,

corrimento vaginal, dor abdominal e comprometimento da vida diária após excisão eletro cirúrgica. Além disso, o tampão de quitosana pode ajudar a melhorar a cicatrização de feridas.

A relevância e a aplicação da quitosana no campo da cirurgia de nervos periféricos são enormes e podem ser separadas principalmente entre o suporte da regeneração axonal dando orientação mecânica e estabilidade (como tubo de quitosana, enchimento interno ou protetor de sutura epineural) ou sendo usado como sistema de liberação de drogas (BOECKER *et al.*, 2019).

A entrega eficaz de nanopartículas de quitosana modificadas com ácido valpróico à medula espinhal lesionada diminuiu o volume da cavidade da lesão e melhorou a recuperação da função. A administração de nanopartículas de quitosana modificadas com ácido valpróico pode melhorar a recuperação da lesão neuronal, suprimir os astrócitos reativos e a inflamação e melhorar a ruptura da barreira da medula espinhal sanguínea após a lesão medular em ratos (WANG *et al.*, 2020).

Huang *et al.* (2021) projetaram nanopartículas de conjugado de quitosana-bilirrubina e avaliaram as habilidades anti-inflamatórias e antioxidantes em células epiteliais gástricas. Nos dados *in vitro* mostraram que as nanopartículas desse conjugado protegem as células epiteliais gástricas contra lesões oxidativas/inflamatórias. E nos estudo *in vivo* demonstraram que as nanopartículas desse conjugado se acumularam permanentemente no estômago e exerceram poderosos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios contra a úlcera gástrica.

No estudo de Mohammadi, Alihosseini, Hosseini (2020), um monofilamento de náilon foi revestido pelo ácido hialurônico e quitosana com diferentes concentrações usando técnica de revestimento em bicamada. A atividade antibacteriana e a liberação controlada do náilon revestido indicaram como um náilon revestido por quitosana e ácido hialurônico é um material promissor para uso como sutura.

O desenvolvimento de novos biomateriais utilizando a quitosana como matéria prima impulsiona o campo de pesquisa e torna-o atraente para a indústria farmacêutica. O que tem sido corroborado pelo aumento de números de estudos e publicações científicas nos últimos anos tendo como base a interação da quitosana com o sistema biológico. Entretanto, ainda não existem dados referentes aos efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada administrada por via sistêmica.

1.3 Sistema Nervoso Autônomo

O sistema nervoso central (SNC) é composto pelo encéfalo e pela medula espinal. E o sistema nervoso periférico então é composto de neurônios que estão fora do cérebro e da medula espinal. O sistema nervoso periférico dividido em vias eferentes e vias aferentes. A divisão eferente é subdividida em sistema autônomo e sistema somático. A via eferente envia informações do SNC para o sistema nervoso periférico e a via aferente envia informações do sistema nervoso periférico para o SNC (WHALEN, 2016).

O sistema nervoso autônomo (SNA) fornece influência modulatória em vários sistemas orgânicos. Regula as funções corporais para manter a homeostase e coordena a resposta aguda à ameaça ou perigo (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020). Ele integra as atividades fisiológicas involuntárias dos órgãos viscerais que são vitais para a sobrevivência. Em particular, o SNA controla a frequência cardíaca (FC), pressão arterial (PA), respiração, contração e secreção gastrointestinal e homeostase de eletrólitos e fluidos (CHENG; WANG; CHEN, 2019). Desempenha um papel crítico na regulação da função cardiovascular, fornecendo feedback instantâneo para a homeostase (BIAGGIONI, 2017).

O SNA é composto de três divisões anatômicas principais: a simpática, a parassimpática e o sistema nervoso entérico (SNE). O sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP) estabelecem um vínculo entre o SNC e os órgãos periféricos. Juntamente com os sistemas endócrino e imunológico, ajusta o ambiente interno do organismo para responder às mudanças no ambiente externo (WU *et al.*, 2019).

O SNE compreende os plexos nervosos intrínsecos do trato gastrointestinal, que estão intimamente interconectados com os sistemas simpático e parassimpático (RANG; DALE; RITTER, 2016). O SNS e o SNP são anatomicamente e funcionalmente distintos e utilizam diferentes conjuntos de sistemas de neurotransmissores (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020).

A via eferente autônoma consiste em dois neurônios dispostos em série, enquanto, no sistema motor somático, um único neurônio motor conecta o sistema nervoso central à fibra muscular esquelética. Os dois neurônios da via autônoma são os pré-ganglionar e pós-ganglionar. No SNS, as sinapses estão localizadas em gânglios autônomos, que se localizam fora do sistema nervoso central e contêm as terminações nervosas das fibras pré-ganglionares e os corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares. Nas vias parassimpáticas, as células pós-ganglionares são encontradas principalmente nos órgãos-alvo, e gânglios parassimpáticos isolados são encontrados apenas na cabeça e no pescoço (RANG; DALE; RITTER, 2016).

A sinalização química entre as células pode ocorrer através de hormônios, produzidos pelas células endócrinas e secretados na corrente sanguínea. Sendo distribuída pelo organismo exercendo efeitos em células alvo. A sinalização química também pode ocorrer através de mediadores locais, que são substâncias químicas secretadas pelas células e agem localmente. São destruídas ou removidas rapidamente e não entram na corrente sanguínea (WHALEN, 2016)

A transmissão é iniciada pelo potencial de ação, no terminal nervoso, ocorrendo uma despolarização, aumento de entrada de cálcio no meio intracelular. Esse influxo de cálcio intracelular promove a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica ocorrendo a liberação de neurotransmissores difundindo-se pela fenda sináptica entre os neurônios, combinando-se com receptores específicos na célula pós-sináptica, na célula alvo (WHALEN, 2016).

Os principais sinalizadores químicos do SNA são acetilcolina e a norepinefrina e epinefrina. Quando a transmissão é mediada pelo neurônio colinérgico o sinalizador ativado é acetilcolina. Quando a transmissão é mediada pelo neurônio adrenérgico os sinalizadores ativados são norepinefrina e a epinefrina (WHALEN, 2016).

O SNS tem um papel primário na regulação autonômica da vasculatura, inervando artérias, veias e micro vasos (CHENG; WANG; CHEN, 2019). A ativação das fibras nervosas simpáticas desencadeia a liberação de 3 neurotransmissores principais – norepinefrina, adenosina trifosfato (ATP) e neuropeptídeo Y – todos os quais têm um papel na mediação da vasoconstrição. Norepinefrina e ATP são liberados juntos para produzir vasoconstrição adrenérgica e purinérgica rápida como resultado da contração das células do músculo liso vascular. O neuropeptídeo Y é liberado juntamente com norepinefrina e ATP em resposta à ativação simpática moderada a intensa, produzindo vasoconstrição lenta e sustentada. O neuropeptídeo Y também pode potencializar a vasoconstrição em resposta à norepinefrina (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020).

Após a ativação, os eferentes pré-ganglionares liberam acetilcolina que se liga aos receptores nicotínicos nos eferentes pós-ganglionares; por sua vez, os eferentes pós-ganglionares, que são adrenérgicos, liberam norepinefrina nas sinapses que possuem receptores β -adrenérgicos. Os resultados são aumentos da FC, força de contração ventricular, taxa de relaxamento e velocidade de condução dos nódulos sinoatrial e atrioventricular, todos fundamentais para a resposta de luta ou fuga (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020).

O controle parassimpático do coração é mediado por longas fibras nervosas eferentes pré-ganglionares que se originam do nervo vago e fazem sinapse perto dos nódulos

sinoatrial e atrioventricular. As fibras nervosas cardíacas simpáticas originam-se da região torácica superior da medula espinhal. São fibras nervosas eferentes pré-ganglionares curtas que entram nas cadeias paravertebrais dos gânglios e fazem sinapse com eferentes simpáticos pós-ganglionares mais longos que se estendem aos nódulos sinoatrial e atrioventricular no coração (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020).

A ativação das fibras nervosas parassimpáticas libera acetilcolina, que, por sua vez, ativa os receptores muscarínicos nos nódulos sinoatrial e atrioventricular. Os resultados são diminuições na FC, força de contração ventricular, taxa de relaxamento e velocidade de condução dos nódulos sinoatrial e atrioventricular, que são todos característicos da resposta de repouso e digestão (KHEMANI; MEHDIRAD, 2020).

As fibras eferentes pós-ganglionares inervam os nódulos sinoatrial e atrioventricular, bem como o miocárdio atrial e ventricular. As fibras aferentes fazem sinapse centralmente ou nos barorreceptores, modulando a atividade do SNP e do SNS. O aumento da atividade do nervo vago está associado a uma frequência cardíaca mais baixa e um período refratário diminuído nos átrios e um período refratário aumentado no ventrículo esquerdo (VE) (BILSEN *et al.*, 2017; GARAMENDIA *et al.*, 2017).

1.4 Músculo Liso

A resposta do músculo liso à estimulação do nervo simpático/parassimpático é um dos principais contribuintes para a manutenção do tônus cardiovascular. As células musculares lisas se contraem em resposta a sinais elétricos, hormonais ou por sinais químicos locais e exibem a capacidade de permanecerem contraídas por períodos extensos, em níveis baixos de consumo de energia, o que é importante para funções como a manutenção do tônus vascular (CAHILL; REDMOND, 2016).

O processo de contração das células musculares lisas é regulado principalmente pelo receptor alfa e beta adrenérgico e pela ativação mecânica (estiramento) das proteínas contráteis miosina e actina. Uma mudança no potencial de membrana, provocada pelo disparo de potenciais de ação ou pela ativação de canais iônicos dependentes de estiramento na membrana plasmática, também pode desencadear a contração (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

Agonistas ligam-se a receptores específicos para ativar a contração no músculo liso. Subsequente a esta ligação, a resposta prototípica da célula é aumentar a atividade da fosfolipase C via acoplamento através de uma proteína G. A fosfolipase C produz dois potentes

segundos mensageiros da membrana lipídica fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato: diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). O IP₃ liga-se a receptores específicos no retículo sarcoplasmático, causando liberação de cálcio ativador (Ca²⁺). DG juntamente com Ca²⁺ ativa a proteína quinase, que fosforila proteínas alvo específicas. Na maioria dos músculos lisos, a proteína quinase tem efeitos promotores de contração, como a fosforilação de canais de Ca²⁺ ou outras proteínas que regulam o ciclo das pontes cruzadas (SOMLYO *et al.*, 1999).

O ativador Ca²⁺ liga-se à calmodulina, levando à ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLC quinase). Essa quinase fosforila a cadeia leve da miosina e, em conjunto com a actina, ocorre a ciclagem de pontes cruzadas, iniciando o encurtamento da célula muscular lisa. No entanto, a elevação da concentração de Ca²⁺ dentro da célula é transitória, e a resposta contrátil é mantida por um mecanismo de sensibilização ao Ca²⁺ provocado pela inibição da atividade da miosina fosfatase pela Rho quinase. O mecanismo de sensibilização é iniciado ao mesmo tempo em que a fosfolipase C é ativada e envolve a ativação da pequena proteína de ligação ao GTP RhoA. Após a ativação, a RhoA aumenta a atividade da Rho quinase, levando à inibição da miosina fosfatase. Isso promove o estado contrátil, pois a cadeia leve da miosina não pode ser desfosforilada (WEBB, 2003).

O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente disso, o processo de relaxamento requer uma concentração intracelular de Ca²⁺ diminuída e uma atividade de fosfatase MLC aumentada. O retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática contêm Ca,Mg-ATPase que removem Ca²⁺ do citosol. Os trocadores de Na⁺ /Ca²⁺ também estão localizados na membrana plasmática e auxiliam na diminuição do Ca²⁺ intracelular. Durante o relaxamento, os canais de Ca²⁺ operados por receptor e voltagem na membrana plasmática se fecham, resultando em uma redução de Ca²⁺ entrada na célula (WEBB, 2003).

Canais de Ca²⁺ operados por receptor e operados por voltagem localizados na membrana plasmática são importantes no influxo de Ca⁺ e na contração do músculo liso. A inibição desses canais pode provocar relaxamento. Antagonistas de canal, como diidropiridina, fenilalquilaminas e benzotiazepinas, ligam-se a receptores distintos na proteína do canal e inibem a entrada de Ca²⁺ no músculo (WEBB, 2003).

O endotélio contribui de várias maneiras para a homeostase vascular. o endotélio, seja por meio de mediadores químicos transferidos, como NO e PGI₂, e (ou) acoplamento elétrico de baixa resistência através de junções comunicantes mioendoteliais, modula a

vasodilatação mediada por fluxo, bem como influenciando a atividade mitogênica, agregação plaquetária e adesão de neutrófilos (TRIGGLE *et al.*, 2012).

O endotélio pode evocar relaxamentos do músculo liso vascular subjacente, liberando substâncias vasodilatadoras. O fator relaxante derivado do endotélio mais bem caracterizado é o óxido nítrico (NO) que ativa a guanilil ciclase solúvel nas células do músculo liso vascular, com a produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) iniciando o relaxamento. As células endoteliais também evocam a hiperpolarização da membrana celular do músculo liso vascular, hiperpolarizações dependentes do endotélio (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A quitosana é um polímero que tem grande potencial de aplicação na área médica, especialmente em virtude de sua característica de biocompatibilidade. Nesse contexto, a quitosana sulfatada com característica hidrossolúvel apresenta grande potencial para revestimento de biofilme de dispositivos médicos como os stents intracoronários, por sua ação anticoagulante. Entretanto, ainda não existem dados referentes aos efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada administrada por via sistêmica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O projeto proposto tem como objetivo geral estudar os efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada (QS) em ratos normotensos.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos da administração intravenosa (i.v.) da QS sobre a PAM e a FC em ratos anestesiados intactos.
- Estudar os efeitos da administração intravenosa (i.v.) da QS sobre a PAM e a FC em ratos bivagotomizados.
- Estudar os efeitos da QS em preparações vasculares isoladas de aorta de ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos normativos éticos

Todos os protocolos experimentais realizados no presente estudo com utilização de animais de laboratório foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob número 6074050421 e seguiram as recomendações do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar (com peso entre 300 e 400g e idade entre 12 e 20 semanas), provenientes do Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos de 6 por gaiola, e mantidos durante uma semana no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimação. Aos animais foram fornecidas água e ração ad libitum. Cada série de experimentos foi realizada em 4 a 6 animais por grupo, e em 5 a 6 segmentos de tecidos isolados.

4.3 Procedimento de sulfatação da quitosana

Foi preparada uma solução de 2% (p/v) de quitosana em uma solução de 10% (v/v) de ácido acético. Inicialmente, 2 g de quitosana foram dispersas em 90 mL de água MilliQ sob agitação mecânica por 2 horas. Após a hidratação da quitosana, 10 mL de ácido acético foram adicionados e mantidos sob agitação por 24h a fim de se obter um polímero solubilizado. Logo em seguida, NaOH 2M foi utilizado para precipitar a quitosana e obter um gel de quitosana. Utilizando um papel de filtro, o gel foi lavado com água MilliQ para atingir o pH neutro. O gel de quitosana foi então submetido a trocas de solventes. Foram preparadas misturas de 20, 40, 60, 80 e 100% de metanol e N.N-Dimetilformamida (DMF). Finalizando com uma solução de 100% de DMF.

Em um banho de gelo, foi colocado um balão de 3 bocas. No balão, foi adicionado DMF previamente resfriado (0-4 °C). Em seguida, foram gotejados 6 mL de ácido clorossulfônico sob leve agitação. Seguindo com agitação até o complexo sulfatante atingir a temperatura de 35-40 °C. O gel de quitosana (previamente impregnado com DMF e triturado)

foi adicionado ao balão. A agitação permaneceu durante as 5 horas de reação. A solução amarelo-clara obtida foi reagida com NaOH 10 M até atingir o pH 12 e formar sólidos em suspensão. Os sólidos foram filtrados e lavados com metanol 6 vezes e secos a temperatura ambiente.

O sólido obtido foi disperso em 100 mL de água destilada para uma diálise em membranas (12000-16000g/mol) contra água destilada por 48h com duas trocas de água por dia. Após a diálise, a solução foi transferida para tubos falcon e congelada com nitrogênio líquido. Então foi realizada uma liofilização para a obtenção da quitosana sulfatada (CARREÓN *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2019).

A substância Quitosana Sulfata foi fornecida pelo Professor Rodrigo Silveira Vieira e sua aluna Sandy Danielle Lucindo Gomes através do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

4.4 Procedimentos experimentais “in vivo”

4.4.1 Instrumentação para o registro da pressão arterial sistêmica e da frequência cardíaca

Animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.) para permitir o implante cirúrgico de cateteres de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria e na veia femoral. O cateter aórtico foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P23 DI), previamente calibrado em mmHg, acoplado a um sistema de aquisição de dados Power Lab - ADInstruments™ para a medida das pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD). A PAM de base foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD) / 3]$ (em mmHg) diretamente pelo software Labchart.

4.4.2 Procedimentos experimentais em ratos anestesiados

Animais previamente instrumentados com cateteres, foram novamente anestesiados com quetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.) e foi realizada uma traqueostomia que permitiu a conexão dos animais a uma bomba ventilatória para adequar as demandas respiratórias. Em seguida, foram isolados os nervos vagos bilateralmente em nível cervical. Nessas condições experimentais foram realizadas três séries de experimentos:

Série 1. Relação dose-efeito após administração intravenosa da QS em animais anestesiados intactos (n=7). Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares na vigência da anestesia, a QS foi administrada por via endovenosa para construção de uma curva dose-efeito (1, 5, 10 e 20 mg/kg).

Série 2. Relação dose-efeito após administração intravenosa de quitosana sulfatada em animais anestesiados intactos antes e após tratamento prévio com L-NAME (n=5). Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares na vigência da anestesia, a quitosana sulfatada foi administrada na dose de 20 mg/kg e após o período de recuperação o animal foi tratado com L-NAME, na dose de 20 mg/kg. Após vinte minutos de ação do L-NAME a quitosana foi novamente administrada na dose de 20 mg/kg.

Série 3. Relação dose-efeito após administração intravenosa da QS em animais anestesiados bivagotomizados (n=5). Com o objetivo de estudar o papel do nervo vago na mediação dos efeitos cardiovasculares da QS, após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares em animais anestesiados. Os nervos vagos foram seccionados bilateralmente e foi registrado um novo período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de 20 minutos, posteriormente a quitosana foi administrada na dose de 20 mg/kg.

4.5 Procedimentos experimentais "in vitro"

4.5.1 Preparações isoladas de vasos sanguíneos para estudo de contratilidade

Após a realização dos experimentos in vivo de registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados (quetamina/xilazina, 90/10 mg/kg, i.p. respectivamente) e a artéria aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e imergida em meio contendo solução Krebs-Henseleit normal modificada (NaCl 136mM, KCl 5mM, MgCl₂ 0,98mM, NaH₂PO₄ 0,36mM, NaHCO₃ 11,9mM, CaCl₂ 2mM e Glicose 5,5mM). A artéria aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e cortada em segmentos no formato de anéis. Seguindo a apropriada dissecação, os segmentos da artéria aorta foi seccionados em formato de anéis cilíndricos dispostos horizontalmente em um miógrafo (610M-DMT, Aarhus, Dinamarca). Dois fios de tungstênio (40 µm) cuidadosamente inseridos na luz dos segmentos arteriais: um dos fios foi fixado ao micrômetro para o ajuste de tensão através do processo de normalização, e o outro conectado ao transdutor de força para mensuração isométrica de força (em mN). As

preparações isoladas de anéis de artéria aorta foram incubados com solução nutritora de Krebs-Henseleit (37°C; pH 7,4; aerada com 95% O₂/5% CO₂) por um período de 30 minutos. Após o período de estabilização a tensão passiva dos anéis de aorta foi ajustada em 1gF, ao passo que cada anel isolado da artéria foi submetido ao procedimento de normalização para estabelecimento da tensão passiva ideal (MULVANY; HALPERN, 1977) e após esse procedimento foi respeitada mais uma etapa de estabilização de 30 minutos.

A integridade do endotélio das preparações vasculares (aorta) foi avaliada após a adição de acetilcolina (ACh; 1 µM) em anéis previamente contraídos com fenilefrina (FEN; 0,1 µM). Um efeito relaxante induzido pela ACh igual ou superior a 80% foi admitido como indicativo de integridade do endotélio.

4.5.2 Protocolos experimentais em preparações vasculares isoladas

Série 1. Curva concentração-efeito para a QS em preparações isoladas de aorta pré-contraídas com KCl pelo mecanismo eletromecânico. (n=3; 3 anéis vasculares por animal). Essa série experimental foi realizada para avaliar a potência vasodilatadora após exposição aguda de preparações vasculares de artéria aorta a concentrações crescentes (1 a 1000 µM) da QS. Preparações vasculares isoladas de aorta foram expostas ao KCl (60 mM) para induzir uma contração sustentada através do mecanismo eletromecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Após o estabelecimento de uma fase estável (componente tônico) na pré-contração induzida por KCl, a QS foi adicionada de maneira cumulativa.

Série 2. Curva concentração-efeito para a QS em preparações isoladas de aorta pré-contraídas com FEN pelo mecanismo farmacomecânico. (n=3; 3 anéis vasculares por animal). Essa série experimental foi realizada para avaliar a potência vasodilatadora após exposição aguda de preparações vasculares de artéria aorta a concentrações crescentes (1 a 1000 µM) da QS. Preparações vasculares isoladas de aorta foram expostas à fenilefrina (FEN; 1 µM) para induzir uma contração sustentada através do mecanismo farmacomecânico (Somlyo; Somlyo, 1994). Após o estabelecimento de uma fase estável (componente tônico) na pré-contração induzida por FEN (1 µM), a QS foi adicionada de maneira cumulativa.

Série 3. Curva concentração-efeito para a QS em preparações isoladas de aorta sem o endotélio pré-contraídas com FEN. (n=3; 3 anéis vasculares por animal). Essa série experimental foi realizada para avaliar a potência vasodilatadora após exposição aguda de

preparações vasculares de aorta sem endotélio a concentrações crescentes (1 a 1000 μM) da QS. Preparações vasculares isoladas de aorta sem endotélio foram expostas FEN (1 μM), para induzir uma contração sustentada. Após o estabelecimento de uma fase estável (componente tônico) na pré-contração induzida por FEN (1 μM), a QS foi adicionada de maneira cumulativa. *Série 4. Curva concentração-efeito para a QS em preparações isoladas de aorta sem o endotélio pré-contraídas com KCl. (n=3; 3 anéis vasculares por animal).* Essa série experimental foi realizada para avaliar a potência vasodilatadora após exposição aguda de preparações vasculares de aorta sem endotélio a concentrações crescentes (1 a 1000 μM) da QS. Preparações vasculares isoladas de aorta sem endotélio foram expostas KCl (60 mM), para induzir uma contração sustentada. Após o estabelecimento de uma fase estável (componente tônico) na pré-contração induzida por KCl (60 mM), a QS foi adicionada de maneira cumulativa.

4.6 Soluções e Drogas

Foram utilizados reagentes de grau analítico para preparar as soluções estoques e a solução para os experimentos. Todas as drogas utilizadas neste estudo foram adquiridas dos laboratórios Sigma-Aldrich e Tocris Bioscience. Tais drogas foram preparadas em soluções estoques concentradas seguindo as recomendações de diluição do laboratório fornecedor, e adicionalmente diluídas para a concentração necessária para o protocolo experimental.

4.7 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM, n = número de experimentos). Foi realizado primeiramente um teste de normalidade, *Shapiro-Wilk normality test*. Posteriormente foi realizada análise de variância a uma via (ANOVA, $p < 0,05$). Para os resultados pareados ou não-pareados foi utilizado o teste *t de Student*, e para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste *U de Mann-Whitney*. Seguido de pós-testes *Holm-Sidak* ou *Dunnet* (quando os dados não passavam no teste de normalidade).

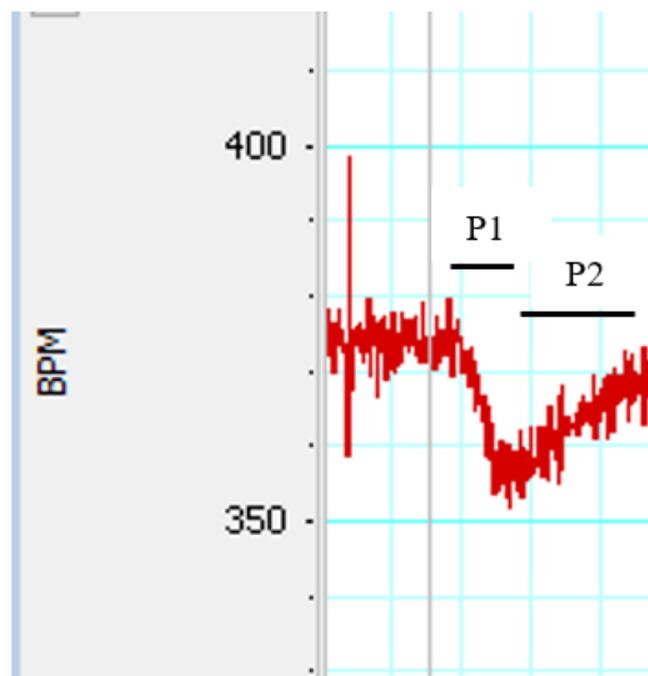
5 RESULTADOS

5.1 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfatada em ratos anestesiados

Em ratos anestesiados com quetamina e xilazina, 90 e 10 mg/kg respectivamente, os valores médios de FC e PAM foram de $235,77 \pm 27,41$ batimentos por minutos e $187,42 \pm 9,30$ mmHg, dados referentes a 7 animais, $n = 7$. A quitosana sulfatada apresentou uma resposta bifásica (Figura 2), uma primeira fase, denominada P1, correspondente a uma queda rápida, resposta direta do efeito cardíaco. Seguida por uma segunda fase, denominada P2, que corresponde a fase de recuperação da queda, que representa o efeito vascular, voltando a valores iguais ou próximos do valor basal.

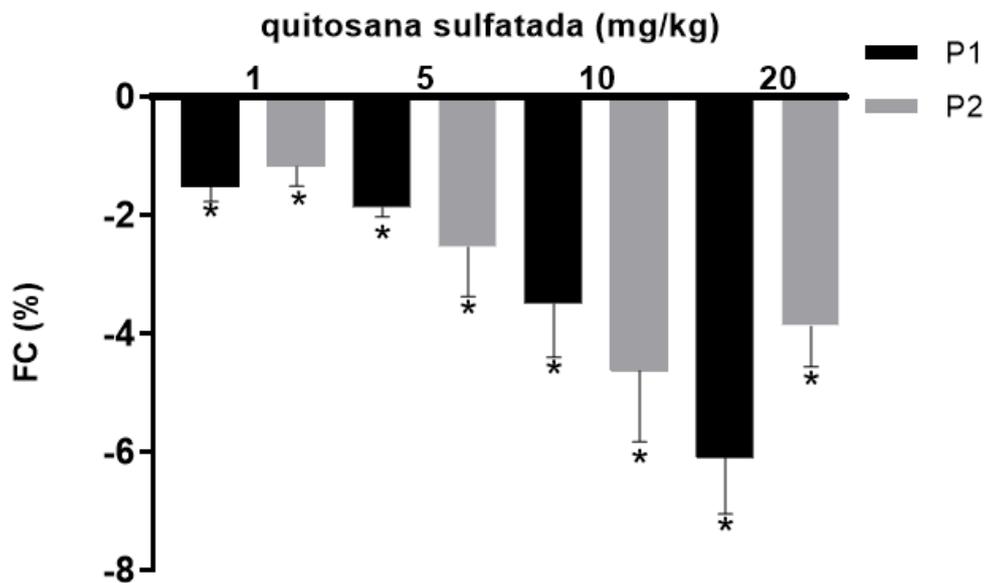
Na dose de 1 mg/kg e 5 mg/kg a quitosana sulfatada provocou uma queda na frequência cardíaca, $1,51 \pm 0,25\%$ em P1 e $1,17 \pm 0,33$ em P2 na dose de 1 mg/kg e na dose de 5 mg/kg a resposta foi de $1,86 \pm 0,16\%$ em P1 e em P2 de $2,53 \pm 0,83\%$. Na dose de 10 mg/kg a resposta em P1 foi de $3,49 \pm 0,90\%$ e em P2 foi de $4,62 \pm 1,20\%$ na FC. E na dose de 20 mg/kg a FC diminuiu em P1 $6,09 \pm 0,95\%$ e em P2 a resposta foi de $3,87 \pm 0,68\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Dunn's multiple comparisons test*), conforme Figura 3.

Figura 2: Efeito bifásico da quitosana sulfatada na frequência cardíaca.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 3: Gráfico referente a resposta da quitosana sulfatada na frequência cardíaca em ratos anestesiados.

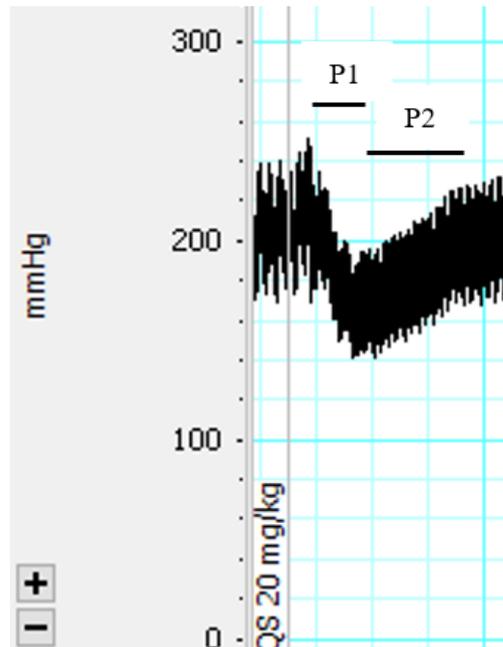


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada (1, 5, 10 e 20 mg/kg) sobre a frequência cardíaca em ratos anestesiados. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que as respostas atingiram valores significativos em relação aos valores basais de FC registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

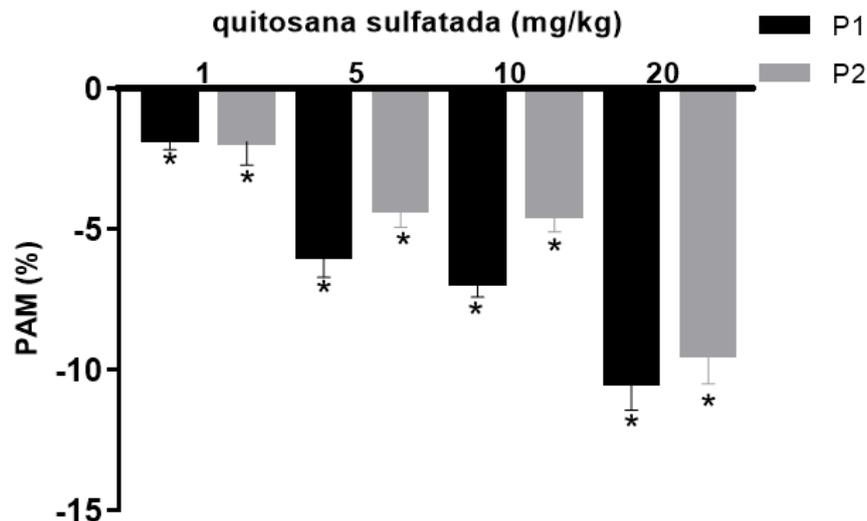
Com relação a PAM a quitosana sulfatada apresentou uma resposta bifásica, conforme Figura 4, e crescente de acordo com o aumento das doses. Na dose de 1 mg/kg a quitosana sulfatada provocou uma queda na PAM, $1,78 \pm 0,37\%$ em P1 e $1,86 \pm 0,83\%$ em P2. Com relação a dose de 5 mg/kg a resposta foi de $5,96 \pm 0,72\%$ em P1 e em P2 de $4,28 \pm 0,64\%$, na dose de 10 mg/kg onde a resposta em P1 foi de $6,89 \pm 0,50\%$ e em P2 foi de $4,46 \pm 0,61\%$. E onde a magnitude da resposta da quitosana sulfatada provocou uma diminuição mais evidente foi na dose de 20 mg/kg, onde a resposta foi em P1 de $10,45 \pm 0,96\%$ e em P2 $9,45 \pm 1,01\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Holm-Sidak's multiple comparisons test*), conforme Figura 5.

Figura 4: Efeito bifásico da quitosana sulfatada na PAM.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 5: Gráfico referente a resposta da quitosana sulfatada na pressão arterial média em ratos anestesiados.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada (1, 5, 10 e 20 mg/kg) sobre PAM em ratos anestesiados. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que os valores atingiram respostas significativas em relação aos valores basais de PAM registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

O tempo de atuação da quitosana sobre a frequência cardíaca e a pressão arterial média está representado na Tabela 1.

Tabela 1: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos.

	P1	P2
1 mg/kg	8,14 ± 2,09	11,31 ± 3,87
5 mg/kg	11,44 ± 1,23	14,56 ± 1,45
10 mg/kg	11,43 ± 0,67	13,11 ± 1,36
20 mg/kg	13,2 ± 1,1	19,34 ± 2,18

Fonte: elaborada pela autora, 2022.

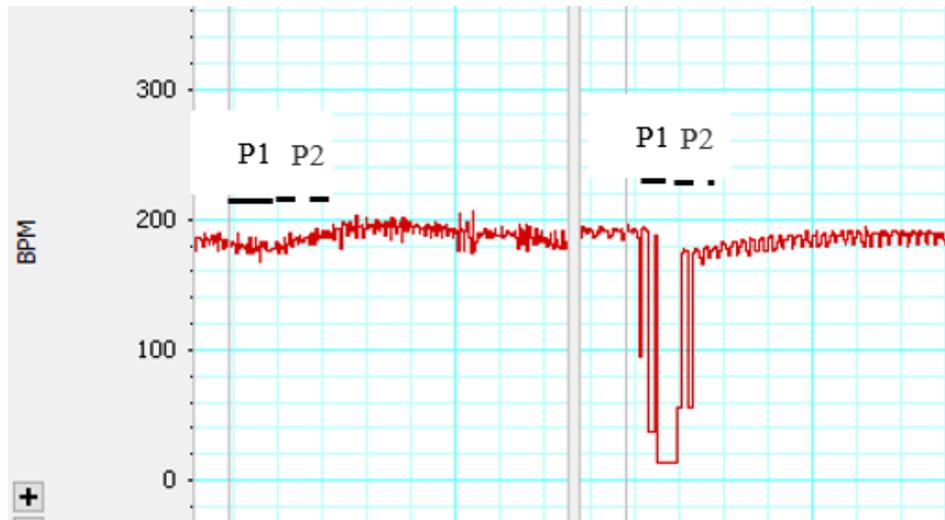
A tabela mostra o tempo em segundos de atuação da quitosana sulfatada ($p < 0,05$, ANOVA e *Holm-Sidak's multiple comparisons test*).

5.2 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfatada em ratos bivagotomizados

Ratos submetidos a vagotomia bilateral com valores basais médios de $160,8 \pm 31,97$ batimentos por minuto e $98,46 \pm 20,41$ mmHg, dados coletados de 5 animais, $n = 5$. A resposta tanto da frequência cardíaca quanto da pressão arterial média apresentaram uma resposta bifásica (Figura 6) após aplicação da quitosana sulfatada na dose de 20 mg/kg.

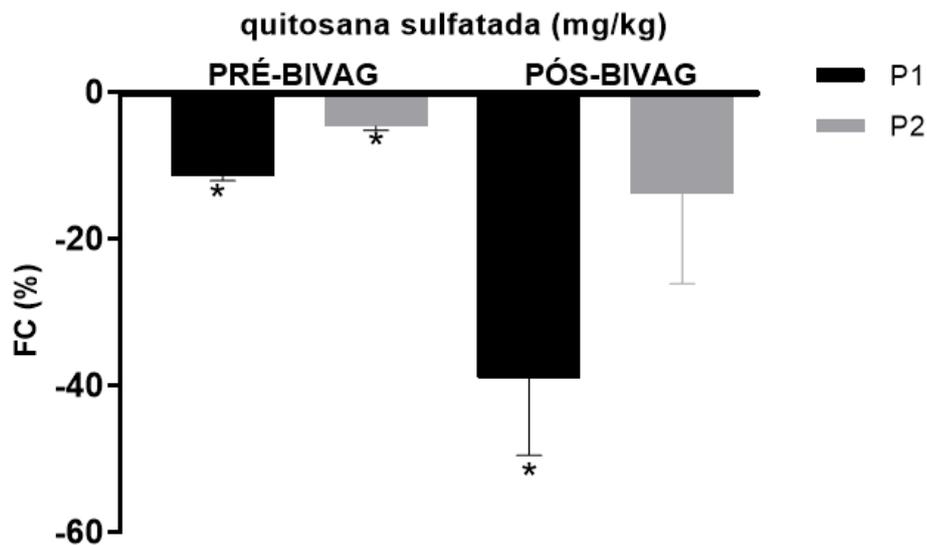
Na frequência cardíaca a resposta em P1 antes da bivagotomia foi uma diminuição de $11,47 \pm 0,61\%$ e após realizar a vagotomia bilateral a resposta foi diminuição de $38,93 \pm 10,61\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Dunn's multiple comparisons test*). E conforme *Unpaired t test* a diferença entre as médias foi de $27,46 \pm 10,63$. Com a relação à resposta de P2, antes da bivagotomia a diminuição foi de $4,64 \pm 0,59\%$ e após a diminuição foi de $13,82 \pm 12,32\%$ ($p < 0,05$, *Mann Whitney test*). Conforme mostrado na Figura 7.

Figura 6: Comparação da resposta bifásica da frequência cardíaca antes e após vagotomia bilateral.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 7: Efeito da quitosana sulfatada na frequência cardíaca antes e após a realização vagotomia bilateral.

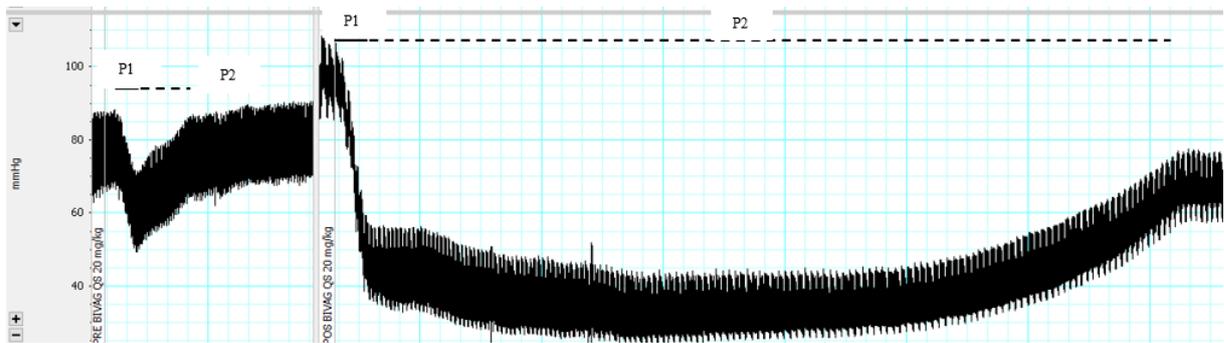


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada, 20 mg/kg, sobre a frequência cardíaca em ratos anestesiados antes e após bivaotomia. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que as respostas atingiram valores significativos em relação aos valores basais de FC registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

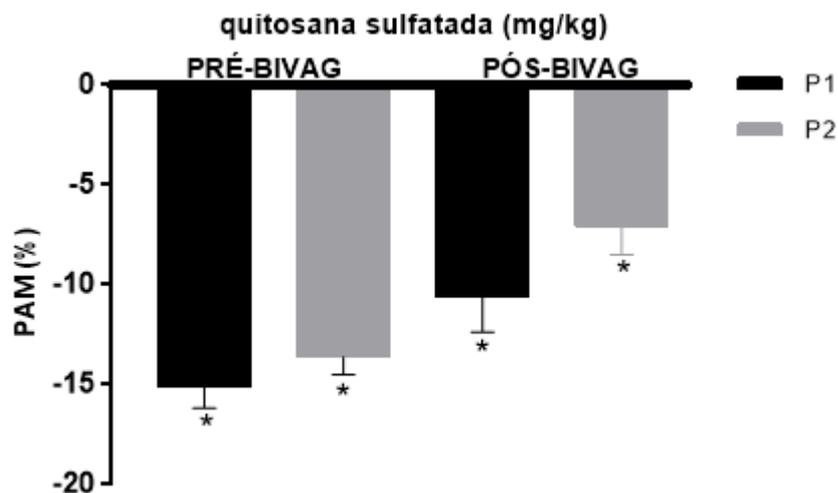
Na pressão arterial média a resposta bifásica é mostrada na Figura 8. A magnitude do efeito da quitosana sulfatada em P1 antes da bivagotomia foi diminuição de $15,12 \pm 1,05\%$ e após realizar a vagotomia bilateral a resposta foi diminuição de $10,65 \pm 1,71\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Holm-Sidak's multiple comparisons test*). Posteriormente foi realizado o *Unpaired t test* onde mostrou uma diferença entre as médias de $4,47 \pm 2,01$. E na resposta de P2, antes da bivagotomia a magnitude foi diminuição de $13,61 \pm 0,87\%$ e após foi diminuição de $7,09 \pm 1,4\%$ e o *Unpaired t test* mostrou uma diferença entre as médias de $6,52 \pm 1,64$. Como ilustrado na Figura 9.

Figura 8: Comparação da resposta bifásica da pressão arterial média antes e após vagotomia bilateral.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 9: Efeito da quitosana sulfatada na pressão arterial média antes e após a realização vagotomia bilateral.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada, 20 mg/kg, sobre a PAM em ratos anestesiados antes e após bivaotomia. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que as respostas atingiram valores significativos em relação aos valores basais da PAM registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

Com relação ao tempo em segundos de atuação da quitosana sulfatada, P1, e de recuperação, P2, é mostrado na tabela 2, onde é possível perceber que o tempo de recuperação é significativamente superior após a vagotomia bilateral.

Tabela 2: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos antes e após bivaotomia.

	P1	P2
<i>Pré - Bivaotomia</i>	$8,9 \pm 1,32$	$17,9 \pm 3,67$
<i>Pós - Bivaotomia</i>	$11,9 \pm 1,64$	$175,8 \pm 90,84$

Fonte: elaborada pela autora, 2022.

A tabela mostra o tempo em segundos de atuação da quitosana sulfatada ($p < 0,05$, ANOVA e *Dunn's multiple comparisons test*).

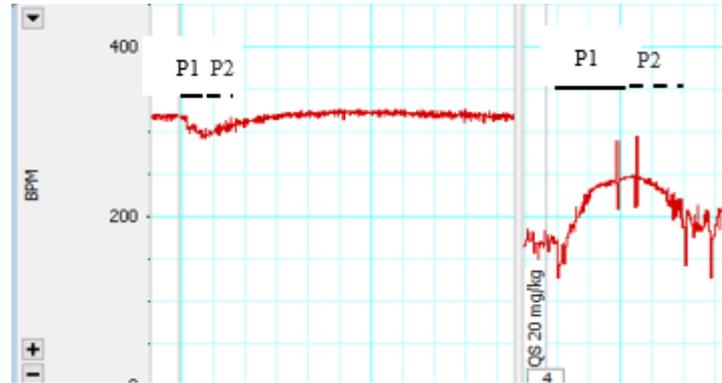
5.3 Efeitos cardiovasculares resultantes da administração de quitosana sulfatada em ratos após tratamento com L-NAME

Ratos submetidos a tratamento com L-NAME na dose de 20 mg/kg com valores basais médios de $244,2 \pm 29,65$ batimentos por minuto e $94,48 \pm 8,06$ mmHg, dados coletados de 5 animais, $n = 5$. A resposta tanto da frequência cardíaca quanto da pressão arterial média apresentaram uma resposta bifásica (figura 10) após aplicação da quitosana sulfatada na dose de 20 mg/kg.

Na frequência cardíaca a resposta da quitosana sulfatada em P1 antes do tratamento com L-NAME foi uma diminuição de $4,85 \pm 1,95\%$ em relação ao valor basal e após o tratamento com L-NAME a resposta da quitosana sulfatada foi de um aumento de $7,96 \pm 1,51\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Holm-Sidak's multiple comparisons test*). Conforme *Unpaired t test* a diferença entre as médias foi de $12,82 \pm 2,47$. Com a relação à resposta de P2, antes do tratamento a diminuição foi de $4,11 \pm 1,38\%$ e após o tratamento com L-NAME o aumento foi de $11,51 \pm 3,71\%$. Posteriormente foi realizado *Unpaired t test* que mostrou uma diferença entre

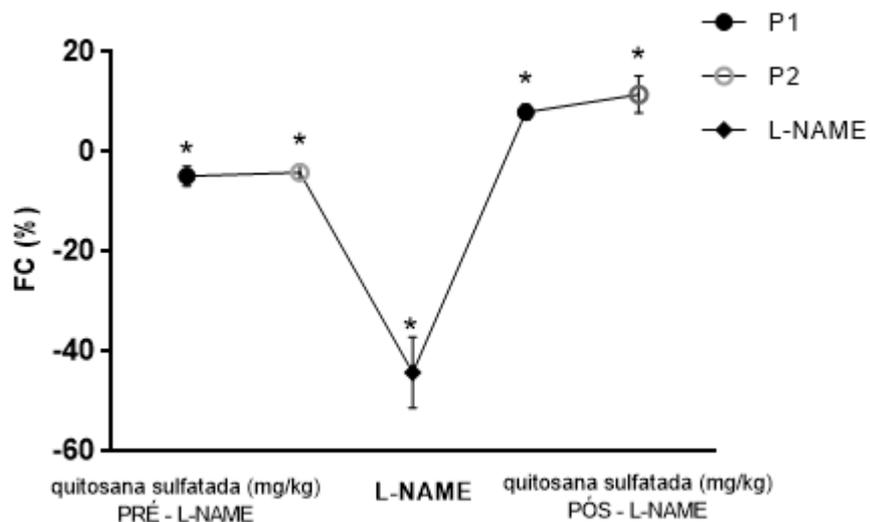
as médias de $15,62 \pm 3,95$ ($p < 0,05$, *Holm-Sidak's multiple comparisons test*). Conforme mostrado na Figura 11.

Figura 10: Comparação entre o efeito da quitosana sulfatada sobre a frequência cardíaca antes e após o tratamento com L_NAME.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 11: Efeito da quitosana sulfatada sobre a frequência cardíaca antes e após o tratamento com L_NAME.

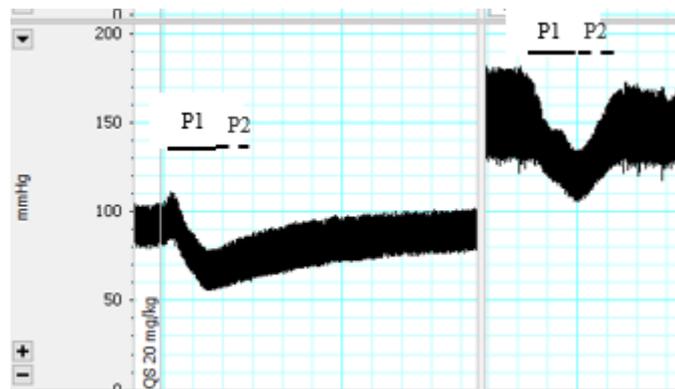


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada, 20 mg/kg, sobre a FC em ratos anestesiados antes e após tratamento com L-NAME. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que as respostas atingiram valores significativos em relação aos valores basais da FC registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

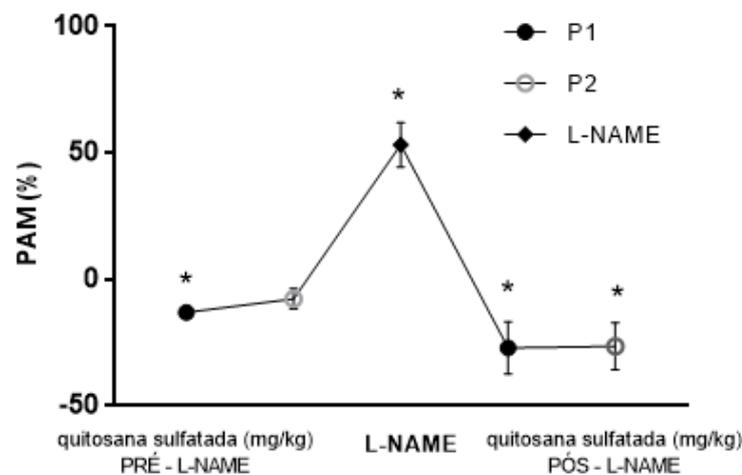
A resposta bifásica na pressão arterial média está representada na figura 12. Na PAM a resposta da quitosana sulfatada em P1 antes do tratamento com L-NAME foi uma diminuição de $13,08 \pm 1,62\%$ em relação ao valor basal e após o tratamento com L-NAME a resposta da quitosana sulfatada foi uma diminuição de $27,09 \pm 10,34\%$ ($p < 0,05$, ANOVA e *Dunn's multiple comparisons test*). Conforme *Unpaired t test* a diferença entre as médias foi de $14,02 \pm 10,47$. Com a relação à resposta de P2, antes do tratamento com L-NAME a diminuição foi de $7,69 \pm 4,01\%$ e após o tratamento com L-NAME a diminuição foi de $26,41 \pm 9,30\%$, confirmado com *Mann Whitney test* ($p < 0,05$, ANOVA e *Dunn's multiple comparisons test*). Conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 12: Comparação entre o efeito da quitosana sulfatada sobre a pressão arterial média antes e após o tratamento com L-NAME.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Figura 13: Efeito da quitosana sulfatada sobre a pressão arterial média antes e após o tratamento com L-NAME.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada, 20 mg/kg, sobre a PAM em ratos anestesiados antes e após tratamento com L-NAME. As barras verticais indicam erro padrão da média (E.P.M.). P1, resposta referente a primeira fase em cada dose. P2, resposta referente a segunda fase em cada dose. *, indicam que as respostas atingiram valores significativos em relação aos valores basais da PAM registrados antes da administração de quitosana sulfatada.

Com relação ao tempo em segundos de atuação da quitosana sulfatada, P1, e de recuperação, P2, é mostrado na tabela 3, onde é possível perceber que não existe grande diferença antes e após o tratamento com L_NAME.

Tabela 3: Tempo de atuação da quitosana sulfatada em segundos antes e após tratamento com L-NAME.

	P1	P2
<i>Pré – L-NAME</i>	12,4 ± 1,16	22,3 ± 6,83
<i>Pós – L-NAME</i>	13,5 ± 2,28	20,45 ± 1,23

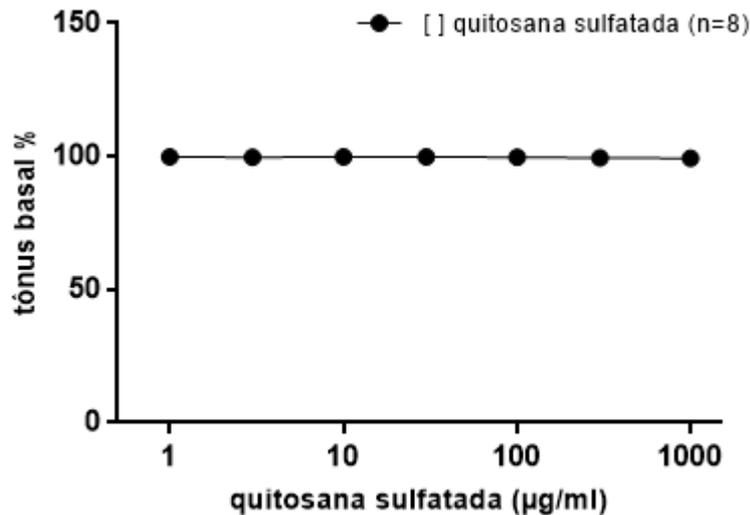
Fonte: elaborada pela autora, 2022.

A tabela mostra o tempo em segundos de atuação da quitosana sulfatada ($p < 0,05$, *Holm-Sidak's multiple comparisons test*).

5.4 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada no tônus basal de aorta isolada de rato

A quitosana sulfatada não apresentou efeitos vasculares significativos com relação ao tônus basal de tecidos de aortas isoladas de ratos. Após a adição de concentrações crescentes (1 – 1000 µg/mL) de quitosana sulfatada não foram observadas respostas ao tecido (figura 14), ou seja, a substância não possui atividade sobre o tônus basal do músculo liso vascular. E a CE50 do grupo, endotélio intacto, corresponde a 237,2, (99,35 – 99,8) µg/mL; n=8.

Figura 14: Avaliação dos efeitos da quitosana sulfatada (1 – 1000 µg/mL) sobre o tônus basal de aorta de ratos.



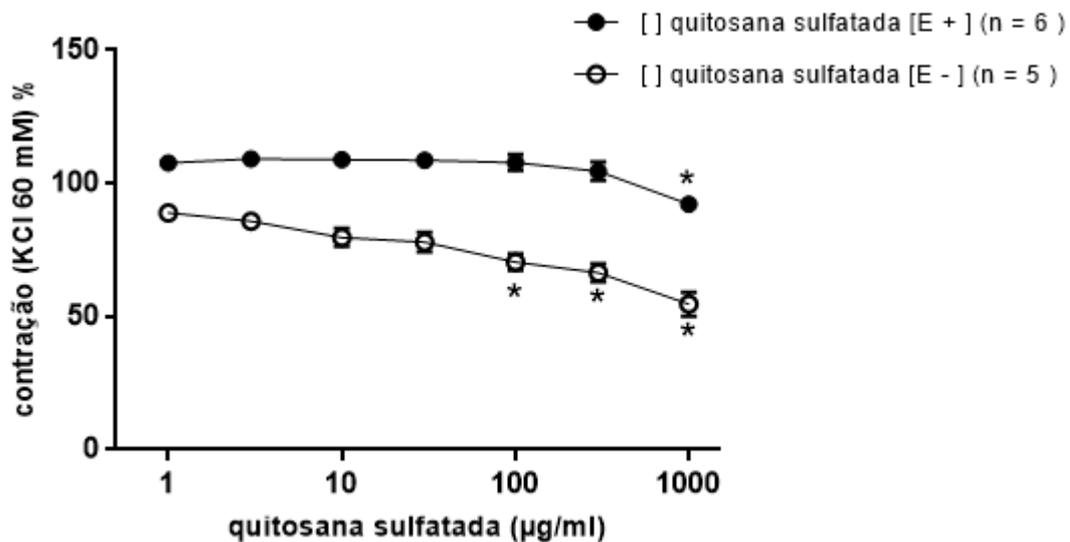
Fonte: elaborada pela autora, 2022.

O gráfico mostra os efeitos da quitosana sulfatada (1 - 1000 µg/mL) sobre o tônus basal de aorta isolada de ratos. n= número de experimentos. As barras verticais indicam E.P.M.

5.5 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada em contrações induzidas por KCl (60 mM) em aorta isolada de rato

As concentrações de quitosana sulfatada (1 – 1000 µg/ml) relaxaram a contração sustentada induzida por KCl (60 mM). O efeito da quitosana sulfatada tornou-se significativo ($p < 0,05$, ANOVA) na concentração de 1000 µg/ml para a preparação com o endotélio íntegro e nas preparações com o endotélio desnudo a resposta significativa se deu a partir da dose de 100 µg/ml. O valor de CE50 para o relaxamento dos anéis com endotélio íntegro foi de 520,2 [92,25 – 107,8] µg/ml ($n = 6$) e de 93,11 [54,69 – 88,91] µg/ml ($n = 5$) para anéis sem endotélio ($p < 0,05$, Holm- Sidak's). Representado pela Figura 15 a comparação entre as respostas da quitosana sulfatada com endotélio íntegro e endotélio desnudo.

Figura 15: Efeito vasculares da quitosana sulfatada (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) em aorta isolada de rato pré-contráida com KCl (60 mM)



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Gráfico com os valores médios da concentração de KCl (60 mM) após a adição de concentrações crescentes de quitosana sulfatada (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$). [E+]: endotélio íntegro; [E-]: endotélio desnudo. n = número de experimentos. As barras verticais indicam E.P.M. *, indica resposta significativa.

5.6 Efeitos vasculares da quitosana sulfatada em contrações induzidas por Fen (1 μM) em aorta isolada de rato

As concentrações de quitosana sulfatada (1 – 1000 $\mu\text{g/ml}$) relaxaram a contração sustentada induzida por Fen (1 μM). O efeito da quitosana sulfatada tornou-se significativo ($p < 0,05$, ANOVA) nas concentrações de 300 e de 1000 $\mu\text{g/ml}$ para a preparação com o endotélio íntegro e nas preparações com o endotélio desnudo a resposta significativa se deu na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$. O valor de CE50 para o relaxamento dos anéis com endotélio íntegro foi de 99,99 [66,43 – 84,43] $\mu\text{g/ml}$ (n = 6) e de 99,82 [84,73 – 101,9] $\mu\text{g/ml}$ (n = 5) para anéis sem endotélio ($p < 0,05$, Holm- Sidak's). Representado pela Figura 16 a comparação entre as respostas da quitosana sulfatada com endotélio íntegro e endotélio desnudo.

Figura 16: Curvas concentração-efeito para quitosana sulfatada (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) na reversão da contração induzida pela Fen (1 μM) em anéis de aorta isolada de rato

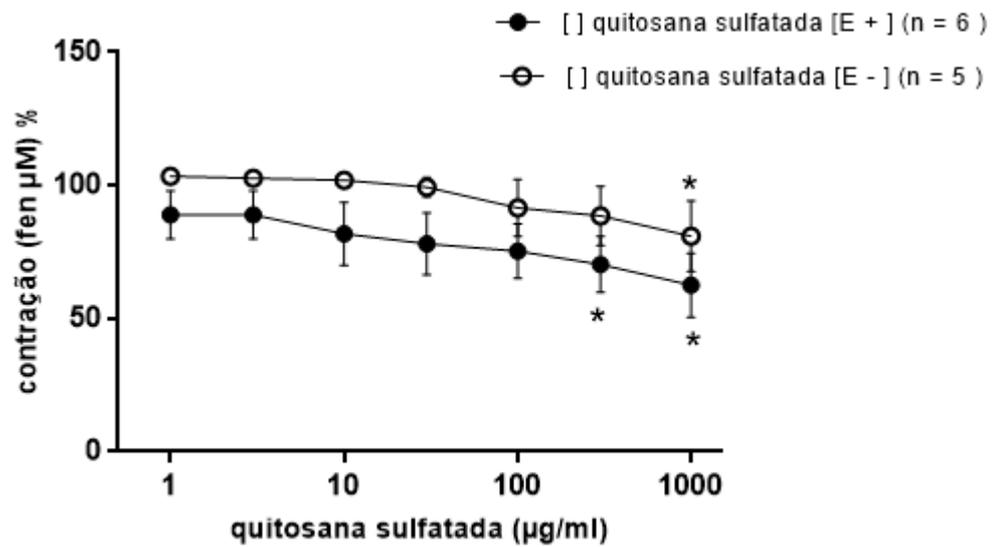


Gráfico com os valores médios da contração de Fen (1 μM) após a adição de concentrações crescentes de quitosana sulfatada (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$). [E+]: endotélio íntegro; [E-]: endotélio desnudo. As barras verticais indicam E.P.M. *, indica resposta significativa.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se os efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada, utilizando abordagens *in vivo* para avaliar a PAM e a FC em ratos normotensos e abordagem *in vitro* em anéis de artéria aorta torácica de ratos. Como principais resultados foi observado que a quitosana sulfatada induziu uma bradicardia e hipotensão nas doses administradas em ratos normotensos anestesiados. E nos estudos *in vitro* a quitosana induziu vasodilatação em anéis de aorta, não dependendo da integridade da camada endotelial para induzir relaxamento.

A manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de vários fatores, como débito cardíaco, resistência periférica. Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção como na variação da pressão arterial, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001).

O presente estudo mostrou que injeções intravenosas de quitosana sulfatada induziram bradicardia e hipotensão. Para uma melhor avaliação, o efeito da quitosana foi apresentada em duas fases. A primeira fase, denominada P1, corresponde a fase de resposta rápida da quitosana que representa a resposta da quitosana sulfatada em nível cardíaco. E a segunda fase, denominada aqui como P2, é a fase de recuperação para o valor inicial, ou próximo, a injeção de quitosana sulfatada, que representa a resposta da quitosana sulfatada em nível vascular. Apesar de não ter encontrado na literatura uma justificativa para a divisão (P1 P2), da resposta da quitosana, justificou-se essa divisão pela diferença da resposta quando analisada em outros momentos, principalmente quando analisada o tempo de recuperação.

Genericamente fármacos vasodilatadores atuam na manutenção da concentração de cálcio (Ca^{2+}), ou na alteração da sensibilidade a esses íons na musculatura lisa vascular. Dessa forma, aumentam o fluxo de sangue para os tecidos, diminuem a PA e a pressão venosa central. Os vasodilatadores de ação direta são potentes hipotensores, que atuam diretamente na musculatura lisa vascular, aumentando o calibre arterial, e conseqüentemente reduzindo à resistência vascular periférica, diminuindo a pressão arterial. Substâncias vasodilatadoras têm como alvo os canais de Ca^{2+} da membrana plasmática celular e do retículo sarcoplasmático, bem como algumas enzimas específicas. As substâncias que compõe os vasodilatadores de ação indireta atuam principalmente pela inibição da vasoconstrição simpática e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (KUBOTANI; FERNANDES, 2019).

Os componentes simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo controlam e regulam a função de vários órgãos, bem como um dos principais componentes do neuro eixo cardíaco (OTTAVIANI *et al.*, 2022). O nervo vago é um componente importante do sistema nervoso autônomo e tem um papel importante na regulação da homeostase. Com 80% de suas fibras nervosas aferentes, transporta informações do corpo para o cérebro, e 20% eferentes, transporta sinais do cérebro para o corpo, tem como função primordial transmitir informações do corpo para o cérebro, bem como atuar na regulação de órgãos e manutenção da homeostase (HOWLAND, 2014).

Ao analisarmos a resposta da quitosana sulfatada por meio da inervação parassimpática via nervo vago, pode-se observar que as duas fases do efeito da quitosana foram vistas tanto com o nervo vago intacto como após a vagotomia bilateral. Com a bivaotomia o efeito da bradicardia aumentou consideravelmente, se comparado com os nervos intactos. E o efeito hipotensor foi levemente menor. E com relação ao tempo de duração do efeito da quitosana sulfatada, antes da bivaotomia a duração ocorreu em 17,9 segundo e após a bivaotomia o tempo de recuperação foi aproximadamente de 175,8 segundos. A duração dos efeitos farmacológicos e metabólicos da quitosana não foram avaliadas no presente estudo.

A liberação basal de NO pelas células endoteliais vasculares controla a pressão arterial no estado basal. O NO é sintetizado enzimaticamente a partir da L - arginina, processo que pode ser antagonizado por compostos de L -arginina substituídos, como o éster metílico da N -nitro - L -ARGININA (L-NAME), que competem pela NO sintase (SHARIFI; AKBARLOO; DARABI, 2005).

A administração crônica de L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), a animais é capaz de inibir a produção endógena de NO e elevar a pressão arterial de maneira persistente, caracterizando um modelo de hipertensão (KANG *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 1992). Um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da pressão arterial durante o tratamento com L-NAME está associado com a deficiência de NO e alterações em vários sistemas reguladores da pressão arterial (BERNÁTOVÁ *et al.*, 2007).

Para investigar a resposta vasodilatadora da quitosana sulfatada associado ao NO, um grupo de ratos foram submetidos a dose de quitosana antes e após pré-tratamento com L-NAME. Com relação a frequência cardíaca, a quitosana induziu uma leve taquicardia após o tratamento com o L-NAME e na pressão arterial média a quitosana aumentou consideravelmente sua resposta hipotensora, se comparados com ratos normotensos. E o tempo de duração do efeito da quitosana sulfatada foi maior após o tratamento com L-NAME, tanto na resposta imediata quanto no tempo de recuperação. Com isso é possível deduzir que o efeito

vasorrelaxante não advém da ação do óxido nítrico. Uma possível hipótese para essa resposta vasodilatadora seria o bloqueio na entrada de Ca^{2+} , o que sugere novos estudos.

Uma das limitações do estudo foi a impossibilidade, nesse primeiro momento, de estudar os efeitos da quitosana sulfatada em ratos não anestesiados, já que seus efeitos por via sistêmica ainda serem desconhecido. E para evitar possíveis irritações e até mesmo estímulos dolorosos, optou-se por realizar em ratos anestesiados. Novos estudos são necessários para uma melhor avaliação dos efeitos da quitosana em ratos não anestesiados.

Os efeitos de diferentes substâncias sobre o mecanismo contrátil do músculo liso formam a base de muitas aplicações farmacológicas, pois o músculo liso é um componente importante da maioria dos sistemas fisiológicos, incluindo os vasos sanguíneos que possuem uma camada de células musculares lisas em sua composição anatômica (RANG; DALE, 2016; WEBB, 2003).

A estrutura dos vasos em forma de tubo e a disposição das células em circunferência permite que a luz do vaso reduza no momento da contração muscular. Esta musculatura é capaz de se manter contraída por longos períodos com um baixo consumo energético, o que é fundamental para funções vasculares básicas como o tônus, permitindo assim o controle da pressão arterial (SHIMOKAWA; SATOH, 2014).

O músculo liso contém filamentos de actina e de miosina. O processo contrátil é ativado por íons de cálcio, e o trifosfato de adenosina (ATP) é degradado em difosfato de adenosina (ADP) para fornecer energia para a contração (GUYTON; HALL, 2011).

Certas substâncias endógenas e exógenas são capazes de se ligar ao receptor da célula muscular lisa sem gerar variações no potencial de membrana, nesse caso há aumento nos níveis de um segundo mensageiro intracelular como o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ou o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) que irão posteriormente alterar os níveis intracelulares de cálcio (WALSH, 2011). A concentração intracelular de íon cálcio [Ca^{2+}] aumenta quando o Ca^{2+} entra na célula pelos canais de cálcio da membrana celular ou do retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{2+} se liga a calmodulina para formar o complexo cálcio – calmodulina que em seguida ativa a cinase das cadeias leves de miosina do músculo. Quando a concentração de Ca^{2+} diminui, devido ao bombeamento para fora de cálcio, o processo é revertido e a miosina fosfatase remove o fosfato de MLC (MLC, do inglês *miosin light chain*), causando relaxamento (GUYTON; HALL, 2011; RANG; DALE, 2016).

Substâncias que atuam diminuindo as concentrações intracelulares de cálcio atuarão no relaxamento do músculo liso, como por exemplo os bloqueadores de canais de cálcio que diminuem influxo de cálcio na célula através dos canais de cálcio tipo L, dependentes de

voltagem na membrana celular, causando vasodilatação. Assim como substâncias que abrem os canais de potássio, causando hiperpolarização celular e diminuição do influxo de cálcio na célula (WEBB, 2003).

Outro possível mecanismo de vasodilatação seria pelo aumento nos níveis de GMPc, por exemplo através da liberação de acetilcolina pelas fibras parassimpáticas, que induz na produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais vasculares. Substâncias que estimulam os receptores adrenérgicos β e aumentam a concentração de AMPc também causam relaxamento do músculo liso vascular por reduzir a atividade da cinase da cadeia leve da miosina e a concentração de cálcio intracelular (SHIMOKAWA; SATOH, 2014). O que se pode analisar que o controle vasomotor está associado a uma série de mecanismos e estruturas, relacionados ao sistema nervoso autônomo, hormônios endógenos, neurotransmissores, fármacos e células endoteliais vizinhas (XUE; SHI; BIAN, 2011).

A participação do endotélio no processo de contração e relaxamento do vaso produzindo uma gama de substâncias vasoativas como os prostanóides, NO, peptídeos, fatores de hiperpolarização derivados do endotélio, entre outros (CUNHA *et al.* 2013). O fator hiperpolarizante derivado do endotélio produz vasodilatação em resposta a uma série de mediadores químicos como a acetilcolina e a bradicinina (RANG; DALE, 2016).

Uma vasodilatação mais relevante é mediada por um componente do fator relaxante derivado do endotélio, sintetizado a partir da L-arginina, o NO, que ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando a síntese de GMPc, que diminui a afinidade do miofilamento de miosina ao cálcio. A produção de NO é estimulada pelo atrito do fluxo sanguíneo nas células endoteliais ou pelo estímulo de algum agente vasodilatador como a acetilcolina, ATP, bradicinina, serotonina e histamina (TOUSOULIS *et al.*, 2012).

A enzima responsável pela produção do NO é a óxido nítrico sintase (NOS) que pode ser subdividida em três subtipos: induzível, neuronal e endotelial. A endotelial e a neural são ativadas pelo aumento da concentração de cálcio dentro da célula através do complexo cálcio-calmodulina, então o NO estimula a GCs a produzir GMPc que por sua vez ativa a proteinocinase G (PKG) que fosforila proteínas reduzindo a concentração de cálcio dentro da célula causando relaxamento muscular (GARCIA; SESSA, 2019).

O estudo mostrou que a quitosana sulfatada induzem a vasodilatação em anéis de aorta de ratos. Em preparações teciduais mantidas sob o tônus basal a quitosana sulfatada não apresenta resposta significativa, ou seja, não apresenta nenhum tipo de efeito vascular.

A quitosana sulfatada foi capaz de relaxar anéis de aorta pré-contraídas com KCl. Quando comparada preparações teciduais com e sem endotélio a quitosana sulfatada mostrou

respostas significativamente diferentes. Em preparações teciduais com endotélio intacto o efeito relaxante da quitosana foi praticamente nulo, se comparado com preparações teciduais com endotélio desnudo onde o efeito relaxante chegou a 45,31% na dose de 1000 microgramas/ml. O que mostra que a resposta relaxante da quitosana se deu independente da integridade endotelial.

Quando mensurado em preparações teciduais pré-contraídas com fenilefrina e resposta da quitosana sulfatada foi diferente. Em preparações com endotélio intacto a quitosana sulfatada relaxou em 37,43% microgramas/ml, já em preparações com endotélio desnudo a magnitude do relaxamento chegou em 19,12%.

Nesta pesquisa foi possível identificar uma redução significativa do efeito vasodilatador da quitosana sulfatada quando pré-contraídos com fenilefrina em comparação com a pré-contracção com KCL. A fenilefrina é um vasoconstrictor que atua nos receptores adrenérgicos α ativando a mobilização de cálcio intra e extracelular, já o KCl induz a contracção vascular através do influxo de cálcio extracelular, porém bloqueia os canais de potássio, o que pode influenciar no relaxamento da musculatura lisa vascular induzida pelo NO (FEREZIN, *et al.*, 2005). Foi possível observar que o efeito relaxante da quitosana sulfatada não se deu por meio do NO, já que seu efeito foi independente da integridade do endotélio. Sugerindo que esse efeito relaxante se deu por meio da diminuição da $[Ca^{2+}]$, mecanismo esse que não foi analisado no presente estudo. Novos estudos são necessários para demonstrar o mecanismo vasorrelaxante da quitosana sulfatada.

7 CONCLUSÃO

- A quitosana sulfata induziu bradicardia e hipotensão.
- O efeito hipotensor independe da inervação parassimpática via nervo vago.
- O efeito hipotensor independe da presença de NO.
- A quitosana sulfata possui atividade vasodilatadora em músculo liso vascular.
- E a ação vasodilatadora independe da integridade endotelial.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, V.V.C. *et al.* Quitina e Qitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, 27-34, 2007.
- BATTULGA, T. *et al.* Analysis of interaction between sulfated polysaccharides and HIV oligopeptides by surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 909–914, 15 mar. 2019.
- BERTÁNOVÁ, I. *et al.* Chronic low-dose L-NAME treatment increases nitric oxide production and vasorelaxation in normotensive rats. **Physiological Research**, v. 56, p. S17-S24, 2007.
- BIAGGIONI, I. The Pharmacology of Autonomic Failure: From Hypotension to Hypertension. **Pharmacol Rev.**, 69:53–62, January 2017.
- BILSEN, M.V. *et al.* O sistema nervoso autônomo como alvo terapêutico na insuficiência cardíaca: um estudo científico de declaração de posição da Translacional Comitê de Pesquisa da Insuficiência Cardíaca Associação da Sociedade Europeia de Cardiologia. **Jornal Europeu de Insuficiência Cardíaca**, 19,1361–1378, 2017.
- BOECKER A. *et al.* Relevance and Recent Developments of Chitosan in Peripheral Nerve Surgery. **Front Cell Neurosci.** Apr 4;13:104, 2019.
- CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97–109, 2016.
- CAMPELO, C. S. *et al.* Sulfonated chitosan and dopamine based coatings for metallic implants in contact with blood. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 682–691, 1 mar., 2017.
- CAO, L. *et al.* Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N,6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2. **Biomaterials**, v. 35, n. 2, p. 684–698, jan. 2014.
- CARREÓN, J. *et al.* Mercury recovery from aqueous solutions by polymer-enhanced ultrafiltration using a sulfate derivative of chitosan. **Membrane Water Treatment**, v. 1, p. 231–251, 25 out. 2010.
- CHAGAS, F. D. S. *et al.* Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 415–421, 15 set. 2020.
- CHEN, L.; HUANG, G. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 743–746, 1 abr. 2019.
- CHENG, Z.J.; WANG, R.; CHEN, Q.H. Autonomic Regulation of the Cardiovascular System: Diseases, Treatments, and Novel Approaches. **Neurosci. Bull.** February, 35(1):1–3, 2019.
- CHEUNG, R.C.F. *et al.* Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Mar. Drugs**, 13, 5156-5186, 2015.

CHONG G.O. *et al.* Efficacy of a chitosan tampon in the loop electro-surgical excision procedure: A prospective randomized controlled study. **Sci Rep.** Apr 7;10(1):6017, 2020.

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

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal, Biobased Polymers and Related Materials.** v. 49, n. 4, p. 780–792, 1 abr. 2013.

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

FEREZIN, C.Z. *et al.* The complex trans-'[RuCl([15]ane'N IND.4')NO]' POT. 2+' induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, p. 170-175, 2005.

GAMZAZADE, A. *et al.* Structural features of sulfated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 1, p. 113–116, 5 dez. 1997.

GARAMENDIA, I. *et al.* Cardiovascular autonomic and hemodynamic responses to vagus nerve stimulation in drug-resistant epilepsy. **Seizure**, 45, 56–60, 2017,

GARCIA V, SESSA WC. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **Br J Pharmacol.** Jan;176(2):189-196, 2019.

GUYTON & HALL: **Tratado de Fisiologia Médica**, 12^a ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ. ISBN: 978-85-352-3735-1, 2011.

HALPERN, W.; MULVANY, M. J. Tension responses to small length changes of vascular smooth muscle cells. **Journal of Physiology.** 265: 21-23, 1977.

HOWLAND, R. H. New developments with vagus nerve stimulation therapy. **Journal of psychosocial nursing and mental health services**, v. 52, n. 3, p. 11-14, 2014.

HUANG Z. *et al.* Protective Effects of Chitosan-Bilirubin Nanoparticles Against Ethanol-Induced Gastric Ulcers. **Int J Nanomedicine.** Dec 20;16:8235-8250, 2021.

HUANG, R. *et al.* Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 6, p. 483–489, 14 mar. 2003.

IRIGOYEN, M.C, CONSOLIM-COLOMBO, F.M., KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev Bras Hipertens** vol 8(1): janeiro/março de 2001.

ISLAMA, M.D.M. *et al.* Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. **Bioactive Materials** 5 (2020) 164-183.

KANG S.H. *et al.* Hemostasis pad combined with compression device after transradial coronary procedures: A randomized controlled trial. **PLoS One.** Jul 24;12(7):e0181099, 2017.

KANG, D. G. *et al.* Effects of bulbous *Fritillaria* water extract on blood pressure and renal functions in the L-NAME hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, pg. 51-56, 2004.

- KANG, M.L. *et al.* Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. **Biomaterials**. Dec;35(37):9984-9994. 2014.
- KHEMANI, P.; MEHDIRAD, A.A. Cardiovascular Disorders Mediated by Autonomic Nervous System Dysfunction. **Cardiology in Review**, v. 28, n. 2, March/April, 2020.
- KOBATA S. I. *et al.* Prevention of bone infection after open fracture using a chitosan with ciprofloxacin implant in animal model. **Acta Cir Bras**. 4;35(8), 2020.
- KUBOTANI K.P.S, FERNANDES D.R. Use of vasodilator drugs of direct and indirect action in the treatment of arterial hypertension: review article. **Rev Cient da Fac Educ e Meio Ambiente: Revista da Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA**, Ariquemes, v. 10, n. 1, p. 150-157, jan.-jun. 2019.
- LARANJEIRA, M.C.C.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 672-678, 2009.
- LIMA, M.F.; ABREU, F.O.M.S. Comparison of chitosan sulfatation methods for Cu^{2+} adsorption. **Revista coleta científica**, ano iv, vol. iv, n.8, jul.-dez., 2020.
- MINTO, B.W. *et al.* Biocompatibilidade do gel de quitosana associado ao glicerol fosfato na reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**. v. 72, n. 06, 2020.
- MOHAMMADI H., ALIHOSSEINI F., HOSSEINI S. A. Improving physical and biological properties of nylon monofilament as suture by Chitosan/Hyaluronic acid. **Int J Biol Macromol**. Dec 1;164:3394-3402, 2020.
- MORAES, A. F. *et al.* Hemocompatibility of 2- N -3,6- O -sulfated chitosan films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 9, p. 47128, 5 mar. 2019.
- MORAES, A.F. *et al.* Quitosana sulfatada: caracterização e estudo da propriedade antitrombogênica. **Colaob**, Foz do Iguaçu-pr, 2016.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for Alternatives to Heparin: Sulfated Fucans from Marine Invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225–232, 1 nov. 1999.
- MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 6, p. 1013–1051, 1 jun. 2008.
- NAGASAWA, K. *et al.* Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid. **Carbohydrate Research**, v. 18, n. 1, p. 95–102, 1 maio 1971.
- NEGM, N. A. *et al.* Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 681–702, 2020.
- OTTAVIANI M.M. *et al.* Closed-Loop Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Cardiovascular Diseases: State of the Art and Future Directions. **Front Cardiovasc Med**. Apr 7;9:866957, 2022.

PEREZ RECALDE, M. *et al.* Carrageenan and agaran structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1370–1378, 20 jan. 2016.

PIASECKA-ZELGA J. *et al.* An in vivo biocompatibility study of surgical meshes made from bacterial cellulose modified with chitosan. **Int J Biol Macromol**. Sep;116:1119-1127, 2018.

PIRES, N.R. *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, volume 91, 1,2, 92-99, 2013.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. C. N.-C. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, n. 79, p. 342–356, 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIBEIRO, M. O. *et al.* Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of hypertension. **Hypertension**, v. 20, p.298-303, 1992.

SANTANA, C.C. *et al.* Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**. v. 66, n. 4, 2014.

SANTOS R. N. D. *et al.* Experimental Evaluation of Chitosan Membrane and Collagen Sponge (TachoSil®) as Sealants in Cardiovascular Surgery. **Braz J Cardiovasc Surg**. 2;37(2):176-184, 2022.

SHARIFI, A. M.; AKBARLOO, N.; DARABI, R. Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME induced hypertension. **Pharmacological Research**, v. 52, pg. 438-444, 2005.

SHIMOKAWA H., SATOH K. Função vascular. **Arteriosclerose, Trombose e Biologia Vascular**. 34:2359–2362, 2014.

SOMLYO, A. P. *et al.* Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**, Volume 134, p. 201–234, 1999.

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

TOUSOULIS D. *et al.* The role of nitric oxide on endothelial function. **Curr Vasc Pharmacol**. Jan;10(1):4-18, 2012.

TRIGGLE, C. R. *et al.* The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 6, p. 713–738, 2012.

VANHOUTTE, P. M. *et al.* Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V. DE; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde - ISSN: 2236-1103**, 6 set. 2015.

VAZ, J. M. *et al.* Antibacterial Coatings Based on Chitosan for Pharmaceutical and Biomedical Applications. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/159920/article>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

VICTOR, R.S. *et al.* A Review on Chitosan's Uses as Biomaterial: Tissue Engineering, Drug Delivery Systems and Cancer Treatment. **Materials**, 13, 4995, 2020.

WALSH, M. P. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: Mechanism, function, and pathological implications. **Iubmb Life**, v. 63, n. 11, p.987-1000, out. 2011.

WANG C.H. *et al.* Procoagulant and Antimicrobial Effects of Chitosan in Wound Healing. **Int J Mol Sci**. Jun 30;22(13):7067, 2021.

WANG D. *et al.* Valproic acid-labeled chitosan nanoparticles promote recovery of neuronal injury after spinal cord injury. **Aging (Albany NY)**. May 28;12(10):8953-8967, 2020.

WANG Y.W. *et al.* Biological Effects of Chitosan-Based Dressing on Hemostasis Mechanism. **Polymers (Basel)**. Nov 19;11(11):1906, 2019.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances In Physiology Education**, v. 27, n. 4, p.201-206, dez. 2003.

WHALEN, K. **Farmacologia Ilustrada** - 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

WU, J.K. *et al.* Quantitative Assessment of Autonomic Regulation of the Cardiac System. **Journal of Healthcare Engineering**, vol. 4501502, 2019.

XING, R. *et al.* Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1387–1392, 15 fev. 2005.

XUE YL, SHI HX, BIAN K. Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta. **Vasc Health Risk Manag**. 7:273-80, 2011.

ZHAO, D. *et al.* Aplicações biomédicas de quitosana e suas nanopartículas derivadas. **Polímeros (Basileia)**. abril, 10(4):462, 2018.

ANEXO I



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos cardiovasculares da quitosana sulfatada em ratos normotensos.", protocolada sob o CEUA nº 6074050421 ~~em anexo~~, sob a responsabilidade de **Rodrigo Jose Bezerra de Siqueira** e equipe; Luziane Gomes da Silva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/06/2021.

We certify that the proposal "Study of the cardiovascular effects of sulfated chitosan in normotensive rats.", utilizing 51 Heterogenics rats (51 males), protocol number CEUA 6074050421 ~~in anexo~~, under the responsibility of **Rodrigo Jose Bezerra de Siqueira** and team; Luziane Gomes da Silva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 06/16/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2021** a **04/2022**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **6 a 8 semanas**

N: **51**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **100 a 150 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - NUBIMED - UFC**

Fortaleza, 12 de julho de 2021

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuzza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará