



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EMERSON PORTELA SENA

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE CÁLCIO TIPO L (Ca_vL) NO EFEITO
CARDIOVASCULAR DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* March EM MODELO
DE HIPERTENSÃO.**

TERESINA - PI

2024

EMERSON PORTELA SENA

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE CÁLCIO TIPO L (Ca_vL) NO EFEITO
CARDIOVASCULAR DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* March EM MODELO
DE HIPERTENSÃO.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

TERESINA - PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do CCS

Divisão de Representação da Informação

S474e Sena, Emerson Portela.
Envolvimento dos canais de cálcio tipo L (CavL) no efeito cardiovascular da resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão / Emerson Portela Sena. -- Teresina, 2024.
107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2024.
“Orientadora: Profª. Dra. Aldeídia Pereira Oliveira”

1. Terpenos. 2. Vasorrelaxamento. 3. Hipertensão. I. Oliveira,
Aldeídia Pereira de. II. Título.

CDD 615.32

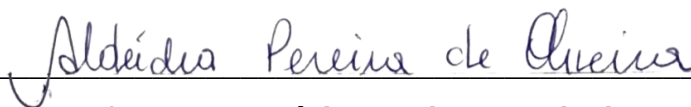
Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

EMERSON PORTELA SENA

ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE CÁLCIO TIPO L (Ca_vL) NO EFEITO
CARDIOVASCULAR DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* March EM MODELO
DE HIPERTENSÃO.

Aprovado em: 15 / 02 / 2024

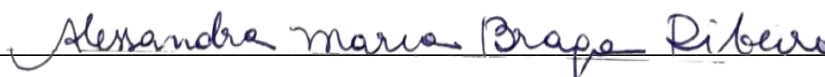
Banca examinadora:



Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira
(Orientadora – Presidente da Banca) - UFPI



Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos
(Examinadora interna) - UFPI



Profa. Dra. Alessandra Maria Braga Ribeiro
(Examinadora externa) – IFPI

DEDICÁTORIA

Dedico a realização deste trabalho a todo o povo brasileiro, que através do esforço de seu trabalho financiou a realização desta pesquisa. A todos os pais, mães e provedores dos mais distintos lares do Brasil que acordam todos os dias para proverem o sustento de suas famílias, de forma digna e honrosa. A execução deste trabalho é dedicada a cada um de vocês.

Agradecimientos

Até aqui o Senhor nos ajudou (1 Samuel 7:12)

Agradecer a Deus é a melhor dádiva que a fé pode propiciar ao ser humano. É na fé que todos os mistérios do Criador são revelados e aquilo que antes parecia difícil e tão distante de nossa realidade agora é algo presente e concreto em nossas mãos. Acreditar que tudo é possível e que tudo acontece com a permissão de Deus é o primeiro passo para alcançar sucesso nos objetivos da vida, testemunhá-los é consequência de tamanha bondade divina entregue pelas mãos do Criador.

Do céu sou imensamente grato por todas as bênçãos e vitórias que conquistei ao longo da vida, agradeço a Deus o Criador da vida e da bondade, a Jesus o Cordeiro Mestre e fonte de toda sabedoria, a Virgem Maria mãe da humanidade e consoladora do cristão e ao Espírito Santo que concede os dons da sabedoria, ciência e temor de Deus. Não posso também esquecer a minha amada santinha Teresa de Lisieux (Santa Teresinha do Menino Jesus) que prometeu cair do céu uma chuva de rosas a quem a procurasse, que, ao longo dessa jornada abençoou cada dia de trabalho e fez cumprir a sua promessa de que aqui na terra jamais seria invocada em vão. Gratidão resume tudo que estou sentindo, pois só de já ter chegado aqui me considero vitorioso.

Aos meus pais Maria de Deus e Francisco das Chagas, que me ensinaram tudo que sei, que influenciaram na minha formação moral e pessoal, na educação, na vida e que através de suas ações me fizeram entender que o estudo é a maior herança que o ser humano pode transmitir a outro. Pai e Mãe vocês são os maiores incentivadores desse trabalho, que me apoiaram em todas as decisões, nos momentos difíceis e nas horas de cansaço, a certeza de chegar em casa e encontrá-los me esperando sentados na sala quando os protocolos duraram até altas horas da noite me fazia sorrir a alma, mesmo que o corpo estivesse fadigado da rotina exaustiva. Palavras nunca vão demonstrar tamanha gratidão que tenho a Deus e a vida, por ter sido escolhido por vocês, por ser filho de vocês. Se vocês evidenciam a todos que tem orgulho de mim, saibam que eu tenho muito mais orgulho de ser seu filho, de chamá-los do substantivo mais doce e mais importante da vida de um ser humano, que é pai e mãe.

Também vou citar a presença do meu querido Zeus, meu companheiro de quatro patas que me espera ansiosamente na porta da sala todas as vezes que saio de casa e demoro a retornar. Embora não saiba falar nem agir humanamente expressa, da sua forma, amor e carinho e recebe tudo isso em troca. A vida mudou

muito depois que você chegou meu amiguinho, me fez ter um novo olhar voltado para as coisas mais simples e para os animais com maior carinho. Desejo que nossos passeios de domingo sejam contínuos meu filho de quatro patas, e que você seja sempre esse “doguinho” que com seu olhar deixa a todos encantados e felizes.

A toda a minha família que acreditou em mim e que depositou esperanças e orações na realização desse trabalho, também dedico a cada um de vocês o meu muito obrigado por me incentivarem e confiarem no meu potencial. Em especial aos meus compadres Sandro Portela e Andréia Portela, que sempre demonstraram tanto carinho e incentivo a realização desta pós-graduação, na vida e convivência familiar. Gratidão a vocês meus compadres “queridos”.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPI por me receberem tão bem e contribuírem para meu aprendizado, compartilhando seus conhecimentos e experiências, em especial a Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos e Profa. Dra. Rita de Cássia Menezes de Oliveira, pelo incentivo à docência, aos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas e carinho. Ao Prof. Dr. João Paulo Jacob Sabino pela parceria de sempre, pelo zelo e pelo cuidado que são suas marcas registradas.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) em especial ao Jose, que quando presente sempre me recebia com um abraço e um sorriso no rosto, desejando bom dia e enviando boas vibrações para que tudo nos protocolos sempre dessem certo.

Aos amigos do NPPM Maísa Campêlo, Bruno Sousa e Naiana Deodato, obrigado por cada conversa, cada troca de experiência e cada momento de angústia compartilhado, vocês são preciosos. Quero agradecer também a uma grande amizade que fiz no núcleo com carinho especial a minha amiga Dra. Alessandra Braga que desde o início dividiu comigo tudo o que sabia e que aprendia dentro da farmacologia, e que no início desta jornada do mestrado presenteou-me com a disciplina de farmacologia paga em uma instituição fora da UFPI, esse e tantos outros gestos jamais serão esquecidos por mim minha amiga querida, muito obrigado a você da forma mais sincera que existe.

Também gostaria de agradecer a uma pessoa muito especial, a uma mulher muito forte, guerreira, valente, atenciosa, gentil e competente. Estou sob sua orientação desde o ano de 2017, quando cheguei na UFPI e conheci pela primeira vez

o NPPM, era um adolescente de calção e chinelo no pé, mochila nas costas e uma cabeça cheia de sonhos, esperando a primeira oportunidade de conhecer o que era de fato a ciência que tanto ouvi falar durante toda a vida, e que agora tinha a oportunidade de conhecer, e fazer parte dela. Então é a minha orientadora Prof. Dra. Aldeídia Oliveira a quem quero dedicar todo este parágrafo de agradecimento, por ter me recebido de braços abertos naquele dia do ano de 2017, ter mostrado seu laboratório, seu plano de trabalho, e o mais importante por nunca ter me deixado desamparado em todos os sentidos. Gratidão a Deus que um dia proporcionou nosso encontro e desde então me fez voar tão alto quanto o meu esforço e dedicação me permitiram. Peço que Deus e nossa santinha Santa Teresinha do Menino Jesus sempre olhem por você e por todos aqueles que amas, que derramem uma chuva de bênçãos sobre sua vida e que a senhora seja sempre feliz. Muito obrigado por tudo professora, muito obrigado mãe científica.

Por fim gostaria de expressar minha gratidão as instituições de ensino e fomento à pesquisa UFPI, CAPES e CNPq pelo financiamento que proporcionou a execução desse trabalho e em especial ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM/UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia PPGFarm/UFPI por proporcionarem conhecimentos e práticas científicas e docentes que agregaram valores a minha formação profissional e humana.

DO CÉU EU DESEJO UMA CHUVA DE ROSAS A TODOS VOCÊS!

Emerson Portela

EPÍGRAFE

“O temor do Senhor é o princípio do
conhecimento [..]”

Provérbios 1:7

ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE CÁLCIO TIPO L (Ca_vL) NO EFEITO CARDIOVASCULAR DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* March EM MODELO DE HIPERTENSÃO.

RESUMO

A hipertensão é umas das maiores causas de morte no Brasil e no mundo. A espécie vegetal *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), conhecida como Almécega, tem uso popular para fins analgésico, cicatrizante e cardiovascular e contém uma resina extraída do caule composta de uma mistura de terpenos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fração ácida obtida da resina de Almécega (F.A.R.A.) sobre o sistema cardiovascular em animais normotensos e hipertensos (SHR), bem como avaliar o seu potencial citotóxico, hipoglicemiante e análise *in silico*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFPI (CEUA 739/2022). A avaliação da citotoxicidade foi investigada através de teste de viabilidade celular (MTT) em células tronco mesenquimais extraídas da medula óssea de ratos SHR. Os resultados demonstram que: nos testes *in vitro* de MTT não houve evidência de citotoxicidade nos diferentes nos intervalos de 24, 48 e 72h. Para os testes *in vivo* (pletismografia de cauda e efeito hipoglicemiante) foram utilizados ratos Wistar (n=5) e ratos SHR (n=5). Para a avaliação da atividade hipotensora, anti-hipertensiva e hipoglicemiante foram administradas as doses de 25, 50, 100mg/Kg da fração. Os resultados evidenciaram efeito hipotensor de maneira dose dependente em ratos normotensos. Após 30 minutos do tratamento os valores pressóricos basais dos grupos: controle (126mmHg) e captopril (93mmHg), mostraram diferença significativa quando comparados com as doses da F.A.R.A. (PAS: 115; 94; 79mmHg) para as doses de (25 50 e 100mg/Kg, respectivamente), sem alterações na frequência cardíaca. Para os animais SHR (hipertensos) a F.A.R.A demonstrou efeito anti-hipertensivo dose dependente e bradicárdico de forma não dependente de dose. Os valores de pressão arterial após 120 minutos foram de: 168 mmHg (controle), 125mmHg (captopril), e 155; 134 e 123 mmHg para as doses (25, 50 e 100mg/Kg, respectivamente). Os valores de frequência cardíaca foram de 393 bpm (controle); 389 (captopril) e 375; 390; 353bpm para as doses (25, 50 e 100mg/Kg, respectivamente). A fração também demonstrou efeito hipoglicêmico, dose-dependente, nos modelos animais testados com redução dos valores basais [149,75] em animais normotensos na dose de 25mg/Kg [125,80], 50mg/Kg [99,80] e 100mg/Kg [74,00]. Para os animais SHR após 120 minutos da administração os índices basais [96,00] foram reduzidos nas doses de 25mg/Kg [82,00]; 50 mg/Kg [74,4] e 100mg/Kg [63,00]. A fim de avaliar o possível efeito vasorrelaxante da fração ácida foram realizados testes *in vitro/ex vivo* de reatividade vascular (n=5), em que os anéis de aorta de ratos SHR foram pré-contraídos com Fenilefrina 10⁻⁶M e em seguida administradas concentrações da F.A.R.A. (0,1-1000µg/mL). A fração demonstrou efeito vasorrelaxante de maneira dose dependente na presença do endotélio (pD₂ = 2.3 ± 0,6) e na ausência do endotélio (pD₂ = 2.7 ± 1,3) sem diferença significativa. Após verificação do efeito vasorrelaxante da F.A.R.A., realizou-se experimento com Bay K 8644 (10⁻⁶M) um ativador de Ca_vL, a fim de verificar o mecanismo de ação relacionado ao efeito vasorrelaxante. Os resultados evidenciaram que a concentração de 243µg/mL promoveu uma reversão total (pD₂ = 1.6 ± 0,3) dos valores de contração induzidas pelo Bay K8644. Verificou-se a participação dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante da fração (TEA 3mM). Os resultados demonstraram atenuação da resposta vasorrelaxante induzida pela fração. Nas análises *in silico* com o ácido beta elemônico resultados de ancoragem molecular evidenciaram interação do terpeno majoritário com aminoácidos próximo ao sítio ativo da proteína alvo (Ca_vL) com energia de interação de -10.7kcal/mol. Os resultados obtidos permitem inferir que a fração possui atividade sobre o sistema cardiovascular, apresentando certa margem de segurança em sua utilização.

Palavras-chaves: Terpenos; vasorrelaxamento; hipertensão.

INVOLVEMENT OF L-TYPE CALCIUM CHANNELS (Ca_vL) IN THE CARDIOVASCULAR EFFECT OF *Protium heptaphyllum* March RESIN IN A HYPERTENSION MODEL.

ABSTRACT

Hypertension is one of the biggest causes of death in Brazil and around the world. The plant species *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), known as Almécega, is popularly used for analgesic, healing and cardiovascular purposes and contains a resin extracted from the stem composed of a mixture of terpenes. Thus, the present work aimed to evaluate the effect of the acid fraction obtained from Almécega resin (F.A.R.A.) on the cardiovascular system in normotensive and hypertensive animals (SHR), as well as to evaluate its cytotoxic, hypoglycemic potential and in silico analysis. All experimental protocols were approved by the UFPI Animal Use Ethics Committee (CEUA 739/2022). The evaluation of cytotoxicity was investigated using cell viability testing (MTT) on mesenchymal stem cells extracted from the bone marrow of SHR rats. The results demonstrate that: in the in vitro MTT tests there was no evidence of cytotoxicity at different intervals of 24, 48 and 72 hours. For in vivo tests (tail plethysmography and hypoglycemic effect) Wistar rats (n=5) and SHR rats (n=5) were used. To evaluate the hypotensive, antihypertensive and hypoglycemic activity, doses of 25, 50, 100 mg/kg of the fraction were administered. The results showed a dose-dependent hypotensive effect in normotensive rats. After 30 minutes of treatment, the basal blood pressure values of the groups: control (126mmHg) and captopril (93mmHg) showed a significant difference when compared with the F.A.R.A. doses (SBP: 115; 94; 79mmHg) for the doses (25, 50 and 100mg/Kg, respectively), without changes in heart rate. For SHR (hypertensive) animals, F.A.R.A. demonstrated a dose-dependent and bradycardic antihypertensive effect in a non-dose-dependent manner. Blood pressure values after 120 minutes were: 168 mmHg (control), 125 mmHg (captopril), and 155; 134 and 123 mmHg for the doses (25, 50 and 100mg/Kg, respectively). Heart rate values were 393 bpm (control); 389 (captopril) and 375; 390; 353bpm for the doses (25, 50 and 100mg/Kg, respectively). The fraction also demonstrated a dose-dependent hypoglycemic effect in the animal models tested with a reduction in baseline values [149.75] in normotensive animals at doses of 25mg/Kg [125.80], 50mg/Kg [99.80] and 100mg/Kg [74.00]. For SHR animals, after 120 minutes of administration, basal rates [96.00] were reduced at doses of 25mg/kg [82.00]; 50 mg/Kg [74.4] and 100mg/Kg [63.00]. In order to evaluate the possible vasorelaxant effect of the acid fraction, in vitro/ex vivo tests of vascular reactivity were carried out (n=5), in which the aorta rings of SHR rats were pre-contracted with 10-6M Phenylephrine and then administered concentrations of the F.A.R.A. (0.1-1000µg/mL). The fraction demonstrated a vasorelaxant effect in a dose-dependent manner in the presence of the endothelium ($pD_2 = 2.3 \pm 0,6$) and in the absence of the endothelium ($pD_2 = 2.7 \pm 1,3$) without significant difference. After verifying the vasorelaxant effect of F.A.R.A., an experiment was carried out with Bay K 8644 (10-6M), a CavL activator, in order to verify the mechanism of action related to the vasorelaxant effect. The results showed that the concentration of 243µg/mL promoted a total reversal ($pD_2 = 1.6 \pm 0,3$) of the contraction values induced by Bay K8644. The participation of potassium channels in the vasorelaxant effect of the fraction (TEA 3mM) was verified. The results demonstrated attenuation of the vasorelaxant response induced by the fraction. In silico analyzes with beta elemenic acid, molecular anchoring results showed interaction of the majority terpene with amino acids close to the active site of the target protein (CavL) with an interaction energy of -10.7kcal/mol. The results obtained allow us to infer that the fraction has activity on the cardiovascular system, presenting a certain margin of safety in its use.

Keywords: Terpenes; vasorelaxation; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Prevalência da hipertensão arterial entre mulheres (A) e homens (B) no planeta no ano de 2019.....	21
Figura 02. O sistema renina-angiotensina (SRAA), suas alças de desvio e vias de sinalização convergentes.....	26
Figura 03. Composição dos vasos sanguíneos em três camadas distintas: incluindo íntima, média e adventícia.....	27
Figura 04. Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a estímulo, como a acetilcolina.....	28
Figura 05. Estrutura de Ca_vL	29
Figura 06. Espécie <i>Protium heptaphyllum</i> March, popularmente conhecida como Almécega.....	35
Figura 07. Representação ilustrativa do teste de MTT em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos hipertensos.....	43
Figura 08. Janela de visualização do programa LabChart 8.....	45
Figura 09. Monitor de Glicemia On Call® Plus II acrescido de fita teste após avaliação do valor de glicose em amostra sanguínea de rato.....	47
Figura 10. Sistema de aquisição de dados AECAD 1604, AQCAD42.....	48
Figura 11. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da F.A.R.A em anéis de artéria aorta de ratos na presença e ausência de endotélio vascular.....	49
Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito da F.A.R.A. sobre contração induzida por Bay K 8644.....	50
Figura 13. Representação esquemática para verificação da participação dos canais para potássio TEA 3mM.....	51
Figura 14. Efeito da F.A.R.A sobre a viabilidade celular em células tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de ratos	55
Figura 15. Efeito da F.A.R.A sobre a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de animais normotensos.....	56
Figura 16. Efeito da F.A.R.A sobre a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de animais espontaneamente hipertensos.....	58
Figura 17. Avaliação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A em animais normotensos (Wistar) após trinta minutos de administração.....	59

Figura 18. Avaliação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A em animais espontaneamente hipertensos (SHR) durante 120 minutos de avaliação.....	60
Figura 19. Efeito vasorrelaxante da Fração Ácida de Resina Almecega em anéis de aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas com e sem a presença do endotélio vascular.....	61
Figura 20. Registro original do efeito da F.A.R.A. sobre contração induzida por KCl 20mM e Bay K 8644 em anel de artéria aorta isolada de rata SHR na ausência de endotélio vascular.....	62
Figura 21. Efeito vasorrelaxante da Fração Ácida de Resina Almecega em anéis de aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas com contração induzida por Bay K 8644 em CavL.....	62
Figura 22. Efeito inibidor de contração da Fração Ácida de Resina Almecega em anéis de aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas contraídos por agonista de CavL, Bay K 8644.....	61
FIGURA 23. Registro original do efeito da F.A.R.A. após contração induzida por Fenilefrina na presença de TEA 3mM.....	64
FIGURA 24. Registro original com escala de tempo do efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. na ausência e presença de TEA	64
FIGURA 25. Porcentagem de relaxamento induzida pela F.A.R.A. na presença de TEA 3mM.....	65
FIGURA 26. Estrutura 3D representando a sobreposição entre a estrutura de CavL modelada e o modelo molde obtido da base de dados.....	66
FIGURA 27. Gráfico de Ramachandran obtido para o CavL construído no Prime.....	66
FIGURA 28. Estrutura 2D representando a ligação do ácido β -elemônico com os aminoácidos constituintes da proteína molde.....	67
FIGURA 29. Estrutura 3D representando a ligação do ácido β -elemônico fora do sítio ativo do CavL modelado.....	68
FIGURA 30. Estrutura 2D representando a ligação do verapamil com CavL modelado.....	69
FIGURA 31. Energia livre de ligação dos ligantes verapamil e ácido β -elemônico em CavL.....	69
FIGURA 32: Representação esquemática do mecanismo de ação vasorrelaxante induzido pela F.A.R.A em CavL.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Composição da solução de Krebs Normal.....	41
TABELA 02: Solução despolarizante de KCl 20 mM.....	42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AQCAD	Sistema Completo de Aquisição de Dados para Contração Muscular
AVC	Acidente vascular cerebral
BMMSC	Célula tronco mesenquimal de rata hipertensa
BPM	Batimentos por minuto
CAv	Canal de cálcio dependente de voltagem
CavL	Canal de cálcio sensível a voltagem do tipo L
pD₂	Logarítmico negativo da concentração que promove 50% da resposta máxima
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DC	Débito cardíaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DAC	Doença Arterial Coronariana
DAG	Diacilglicerol
EE	Extrato etanólico bruto
EA	Fração de acetato de etila
ECA	Enzima conversora de angiotensina
F.A.R.A	Fração Ácida da Resina de Almécega
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IP3	Inositol trifosfato
LAGO	Laboratório de Geoquímica Orgânica
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil éster
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MMHG	Milímetro de mercúrio
MSCs	Célula tronco mesenquimal
NO	Oxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão diastólica
PAM	Pressão arterial média
PKC	Proteína quinase C
PAS	Pressão arterial sistólica
RVP	Resistência vascular periférica
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema nervoso central
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SRAA	Sistema renina angiotensina-aldosterona
TEA	Tetraetilamonio
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VES	Volume de ejeção sistólica

Obs: As abreviaturas ou símbolos utilizados neste trabalho que não constam nesta relação encontram-se descritos ao longo do texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	20
1.2 Modelo experimental de hipertensão.....	22
1.3 Mecanismos de controle da pressão arterial.....	24
1.4 Tratamento da Hipertensão Arterial.....	26
1.5 Plantas Medicinais.....	33
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material botânico.....	39
3.2 Fármacos, reagentes e equipamentos.....	39
3.3 Animais.....	39
3.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	40
3.4.1 Solução nutritiva de Krebs Normal.....	40
3.4.2 Solução Despolarizante de KCl 20mM.....	40
3.5 Protocolos experimentais.....	41
3.5.1 Citotoxicidade em células tronco medulares de ratos SHR pelo teste do MTT.....	41
3.6 REGISTRO DA PRESSÃO SISTÓLICA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA PELO MÉTODO DE PLETISMOGRAFIA.....	42
3.6.1 Linhagens animais utilizadas para o método de avaliação indireto da pletismografia de cauda.....	42
3.6.2 Execução do protocolo experimental da pletismografia de cauda em ratos Wistar.....	43
3.6.3 Protocolo experimental da pletismografia de cauda em ratos SHR.....	43
3.7 Investigação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A sobre animais hipertensos e normotensos.....	44
3.8 ENSAIO FARMACOLOGICO IN VITRO.....	46
3.8.1 Avaliação do efeito vasorrelaxante da F.A.R.A em anéis de artéria aorta de ratas hipertensas.....	46

3.8.2 Efeito da F.A.R.A. sobre contrações induzidas por S(-) Bay K 8644 em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratas SHR.....	48
3.8.3 Efeito da participação dos canais para potássio na resposta vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A. em anéis de aorta.....	48
3.9 Análise <i>in silico</i>	51
3.9.1 Modelagem de Proteínas por Homologia	51
3.9.2 Docking molecular	52
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Determinação da citotoxicidade da F.A.R.A pelo teste de MTT.....	55
5.2 Avaliação da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica de ratos normotensos	56
5.3 Avaliação da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica de ratos hipertensos SHR.....	57
5.4 Verificação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em modelos animais normotensos Wistar.....	59
5.5 Verificação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em modelos animais hipertensos SHR.....	59
5.6 Verificação do efeito da F.A.R.A. no vasorrelaxamento em anéis de artéria aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas.....	60
5.7 Efeito da F.A.R.A. sobre contrações induzidas por S(-) - Bay K 8644 em anéis de artéria aorta de ratas SHR.....	61
5.8 Verificação da participação dos canais de potássio na resposta vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A.....	63
5.9 Análises <i>in silico</i>	65
5.9.1 Modelagem comparativa da estrutura proteica do CavL.....	65
5.9.2 <i>Ancoragem</i> molecular.....	67
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÕES.....	86
8 PERSPECTIVAS.....	89
9 REFERÊNCIAS.....	91

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica não transmissível caracterizada quando os níveis pressóricos do indivíduo se apresentam elevados e com persistência da pressão arterial (PA) alta. A Sociedade Brasileira de Cardiologia, (SBC) classifica o indivíduo como hipertenso quando a PA sistólica (PAS) apresenta-se maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) apresenta-se maior ou igual a 90 mmHg. Sabe-se que a hipertensão arterial é uma das enfermidades mais importantes que acometem o Brasil. É uma doença que se torna comum no decorrer dos anos e tem se tornado um grave problema de saúde pública no mundo (SBC, 2021).

A HA é uma condição de saúde globalmente significativa, estima-se que 29% da população mundial, aproximadamente 1,56 bilhão de pessoas, desenvolverão a doença em 2025 (Calzerra *et al.*, 2018).

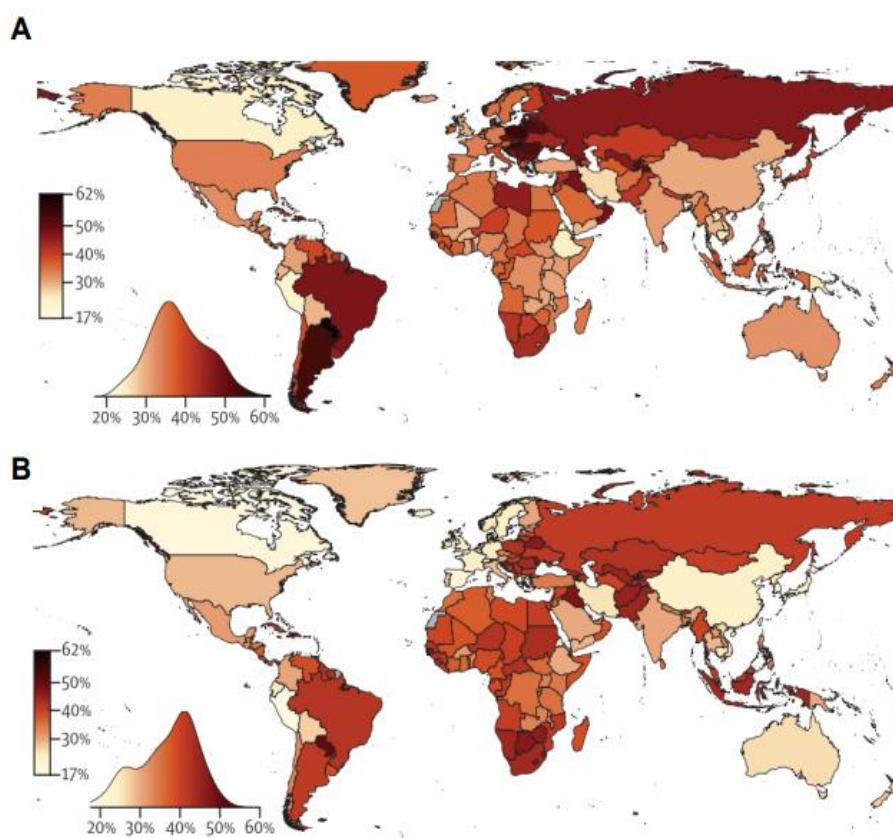
A hipertensão também é apontada na literatura como umas das maiores causas de óbitos, além disso, também gera um alto custo socioeconômico, pois pode ocasionar em pessoas ativas determinadas deficiências temporárias ou até mesmo permanentes (Silva, 2016). O SUS, Sistema Único de Saúde, aponta que 24% dos indivíduos em atendimento afirmam ter recebido diagnóstico de hipertensão, sendo a doença crônica mais relatada somando cerca de 38,1 milhões de indivíduos no Brasil com a doença (Ministério da Saúde, 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a hipertensão arterial (HA) tem alta prevalência no Brasil e no mundo, e é um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares - DCVs e renais, tendo influência de múltiplos fatores, como demográficos, fatores ligados a herança genética, condição socioeconômica do indivíduo e também comportamental (ligados a hábitos de vida como sedentarismo, tabagismo, consumo excessivo de sal e dietas hipercalóricas. Alguns desses fatores são passivos serem controlados ou modificados reduzindo a incidência da hipertensão arterial de suas consequências (OMS 2013; SBC, 2020).

Além das possíveis complicações geradas pela HAS, os custos com tratamento e prevenção da doença geram custo oneroso aos sistemas de saúdes (público ou privado) geralmente associado a um alto índice de morbidade. De acordo com a SBC (2020) no ano de 2017 no Brasil ocorreram de 1.312.663 óbitos, com um percentual

de 27,3% em doenças cardiovasculares (DCVs). Esse índice de prevalência é maior entre pessoas de 30 e 69 anos de idade, o que representou 22,6% das mortes prematuras no país, atreladas a custos de manutenção e hospitalização que ao longo da última década, 77% dos custos com hospitalizações no SUS com doença arterial coronariana são representados por DCVs associadas à hipertensão arterial e aumentaram 32%, em reais, de 2010 a 2019, passando de R\$ 1,6 bilhão para R\$ 2,2 bilhões no período (SBC 2020). Em zonas menos desenvolvidas, como a América Latina e alguns países da Oceania, a porcentagem de pessoas com pressão arterial elevada registrou um aumento (FIGURA 01) no ano de 2019 (Zhou *et al.*, 2021).

FIGURA 01. Prevalência da hipertensão arterial entre mulheres (A) e homens (B) no planeta no ano de 2019. (População em faixa etária entre 30 e 79 anos).



Fonte: Zhou *et al.*, 2021.

Além disso a hipertensão pode ser associada com alterações no metabolismo que podem levar a obesidade e a resistência à insulina, fatores que aumentam os riscos para surgimento de novas doenças cardiovasculares (Lu *et al.*, 2015). Dessa maneira o surgimento de outras DCVs pode ser atrelado a hipertensão arterial levando a problemas na fluidez sanguínea ou até o desenvolvimento de doenças trombóticas,

bem como de doença arterial coronariana (DAC), insuficiência cardíaca, angina, infarto agudo do miocárdio (IAM), arritmias e outras doenças (Magalhães et al., 2014; Capurso-Capurso, 2020). Assim, identificar os fatores associados, bem como conhecer a sua magnitude, constitui elemento de fundamental importância para subsidiar ações de controle da HAS.

Entre as principais doenças associadas a hipertensão está a diabetes mellitus. A pressão arterial elevada e o diabetes mellitus são duas das condições crônicas globalmente mais comuns (Sarno et al., 2020). De acordo com o Ministério da Saúde consistentemente a maioria dos pacientes acima de 18 anos e diagnosticados com diabetes, 50% ou mais também são portadores da hipertensão arterial. O diabetes mellitus está associado a uma série de complicações de saúde, especialmente quando não é controlado adequadamente como a dislipidemia, em que o alto índice de lipídios no sangue pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares; disfunção endotelial contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose e aumentar o risco de complicações cardiovasculares (Kremer et al., 2022).

Além disso, durante a pandemia da COVID em 2019, a hipertensão arterial (HA) e o diabetes mellitus (DM) emergiram como as comorbidades mais prevalentes entre os indivíduos que faleceram, e sua fisiopatologia desempenhou um papel significativo no agravamento dos casos de COVID-19 (Shereen et al., 2020). Essas descobertas indicam uma interconexão frequente entre as duas condições crônicas, destacando a importância de novas formas de tratamento no controle da hipertensão arterial e de suas comorbidades associadas.

1.2 Modelos experimentais de hipertensão

Existem modelos experimentais utilizados para mimetizar a condição da hipertensão arterial sistêmica (HAS) com o uso de modelos animais roedores, uma vez que, os ratos são a espécie animal mais utilizada no mundo em pesquisa da fisiopatologia e de tratamentos para a hipertensão (Carbone, 2021; Fernandes; Pedroso, 2017). Alguns exemplos são o modelo renovascular, ratos hipertensos L-name e ratos SHR.

O modelo de hipertensão renovascular pode ser induzido pela constrição seletiva de uma única artéria renal na presença do rim contralateral, configurando a hipertensão de Goldblatt tipo 2 rins e 1 clipe (2R1C). Neste cenário, observa-se uma

maior atividade de renina plasmática aumentando os níveis pressóricos. Alternativamente, a hipertensão pode ser gerada através da constrição de uma artéria renal associada à remoção do rim contralateral, caracterizando a hipertensão de Goldblatt tipo 1 rim, 1 clipe (1R1C). Ambos os modelos resultam no aumento da pressão arterial devido aos níveis plasmáticos elevados de renina e ANG 2 (Cummins *et al.*, 2001; Rakuan *et al.*, 2010).

Outro modelo de HA centrado na função renal envolve a indução de lesões, integrais ou parciais, no tecido parenquimatoso renal que levam a uma elevação rápida e sustentada da pressão arterial nos animais utilizados, desencadeando simultaneamente alterações fisiológicas e danos nos órgãos-alvo que mimetizam características observadas em contextos humanos, principalmente o aumento dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) (Conn, 2017; HU *et al.*, 2021).

Roedores tratados com L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico) por via oral ao longo de até oito semanas, configuram um modelo amplamente reconhecido de hipertensão arterial sistêmica. Em muitas instâncias, a elevação da pressão arterial torna-se evidente após um período de quatro semanas de administração de L-NAME. A administração prolongada de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS), como o L-NAME, desencadeia uma modalidade de hipertensão que se associa a danos em órgãos-alvo. A hipertensão induzida por L-NAME está intimamente vinculada à lesão endotelial, além de causar danos substanciais nos tecidos cardíacos e aórticos, assim como fibrose glomerular significativa (Leong *et al.*, 2015; Ramanathan; Thekkumalai, 2014).

No modelo SHR a hipertensão inicia por volta das 5-6 semanas de vida do animal. Esse aumento da pressão apresenta relação com o aumento na resistência periférica total, mantendo inicialmente um débito cardíaco (DC) normal. Esses roedores apresentam alterações na expressão e função dos canais de cálcio, havendo uma conexão com o desenvolvimento da hipertensão. Pois o funcionamento inadequado desses canais pode contribuir para a vasoconstrição excessiva e aumento da resistência vascular, ambos associados à elevação da pressão arterial (Atanur *et al.*, 2010).

Outra vantagem desse modelo é a capacidade de investigar a evolução da hipertensão, de maneira análoga ao que ocorre em seres humanos, visto que também

são identificadas três fases distintas: pré-hipertensão, desenvolvimento e manutenção dos níveis pressóricos, em que níveis de pressão arterial caracterizados como hipertensão espontânea ocorrem entre a 7^a e 15^a semana de vida do roedor, alcançando um planalto entre a 20^a e a 28^a semanas. (Carvalho *et al.*, 2020; Fazan Jr *et al.*, 2001).

1.4 Mecanismos de controle da pressão arterial

A pressão arterial média (PAM) é o produto da multiplicação entre dois fatores que podem sofrer alterações como resposta de condições fisiológicas do momento do indivíduo. Assim, a PAM é representada pelo produto entre o débito cardíaco, DC, e a resistência vascular periférica, RVP, ($PAM = DC \times RVP$) onde o DC é obtido através do produto do volume de ejeção sistólica, VES, e a frequência cardíaca, FC, ($DC = VES \times FC$) é válido ressaltar ainda que o DC é influenciado pela relação entre os volumes de fluido extracelular e sanguíneo, pela capacidade que os vasos sanguíneos apresentam de contração e relaxamento bem como da contratilidade do miocárdio e resistência ao fluxo sanguíneo (Cowley, 2006).

As fórmulas matemáticas comprovam que os valores de pressão arterial podem ser influenciados através de alterações (modificações) que ocorrem nesses parâmetros, corrigindo os valores de níveis basais de PA no indivíduo (Irigoyen *et al.*, 2005). Para garantir que o fluxo sanguíneo seja constante e evitar variações bruscas nos valores de pressão arterial o sistema fisiológico utiliza mecanismos que atuam sobre tais parâmetros, de forma a manter o nível de pressão arterial o mais constante possível. Esses valores são ajustados por meio de mecanismos que englobam o envolvimento do sistema nervoso, ação de trocas líquidas em nível de capilares sanguíneos, sistema renal e mecanismos hormonais (Bressiani *et al.*, 2017).

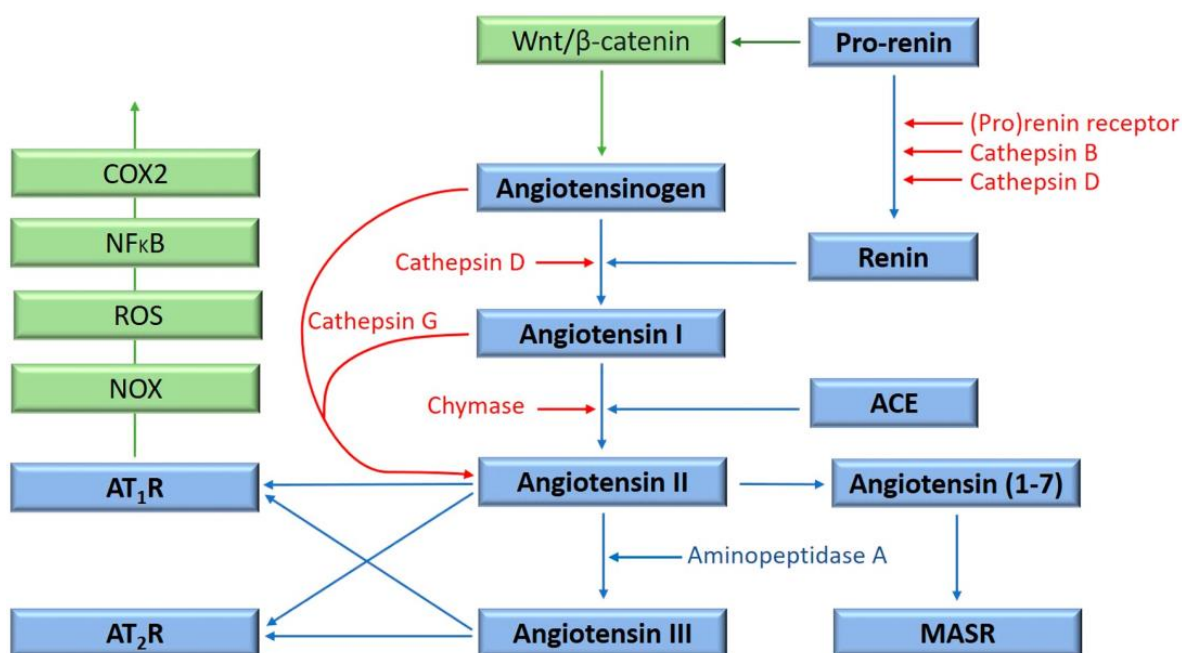
O Sistema Nervoso Central (SNC) anatomicamente dividido em encéfalo, cerebelo e tronco encefálico, sendo este último, formado pelo mesencéfalo, ponte e bulbo (Valenti *et al.*, 2009) é um dos principais mediadores que atua no controle da pressão arterial por meio das vias simpática (norepinefrina e/ou noradrenalina) e parassimpática (acetilcolina). O centro de controle neural com ação sobre o sistema cardiovascular é localizado na área do bulbo, numa região denominada de núcleo do trato solitário. O controle neural sobre a pressão arterial é realizado por reflexos nervosos, sendo o mais importante o barorreceptor (mecanorreceptores localizados

nas artérias aorta e carótida) atuando na regulação dos índices de PA através de vasoconstrição, vasodilatação e do bombeamento cardíaco (Kouvelas *et al.*, 2009; Moreira, Takakura, 2011; Bressiani *et al.*, 2017).

A longo prazo a regulação e controle da PA tem relação com a capacidade dos rins em eliminar sódio o suficiente para manter um balanço deste íon numa faixa normal, uma vez que um dos fatores que elevam os níveis pressóricos é a ingestão de sal. Existe uma relação direta entre a excreção urinária de sódio e a pressão arterial média - PAM. Níveis altos de PAM leva, ao aumento imediato da diurese e da perda de sódio pelos rins que é denominado de natriurese pressórica. No consumo equilibrado de água e sódio os rins viabilizam a redução da volemia afetando os níveis do débito cardíaco, o que resulta diretamente em controle da pressão arterial (Martelli, 2015).

Outro mecanismo que também atua por intermédio do sistema renal no controle da PA é o sistema renina - angiotensina - aldosterona (SRAA) que age por meio de balanço hídrico, influenciando na homeostase do tônus vascular (Cabandugama *et al.*, 2017; Colafella *et al.*, 2019). O SRAA é ativado quando a secreção de renina, no rim, é estimulada por uma hipotensão arterial renal ou pela diminuição da carga de sódio (Na^+) no túbulo distal, detectado pelo córtex renal. Essa redução leva a ativação do sistema nervoso autônomo simpático em resposta à diminuição da PA. O fígado também atua nesse sistema originando o angiotensinogênio (AGT) que induz a formação de angiotensina I que por sua vez será clivada, pela enzima da ECA, gerando a angiotensina II (Ang II) FIGURA 02 (Wilkinson-Berka *et al.*, 2012). De forma geral a Ang II exerce seus efeitos sobre o sistema cardiovascular por meio de vasoconstrição, modulação do tônus autonômico, e liberação do hormônio aldosterona pelas glândulas adrenais fazendo com que os rins retenham água e Na^+ (Ferrario, 2010).

FIGURA 02: O sistema renina-angiotensina (SRAA), suas alças de desvio e vias de sinalização convergentes.



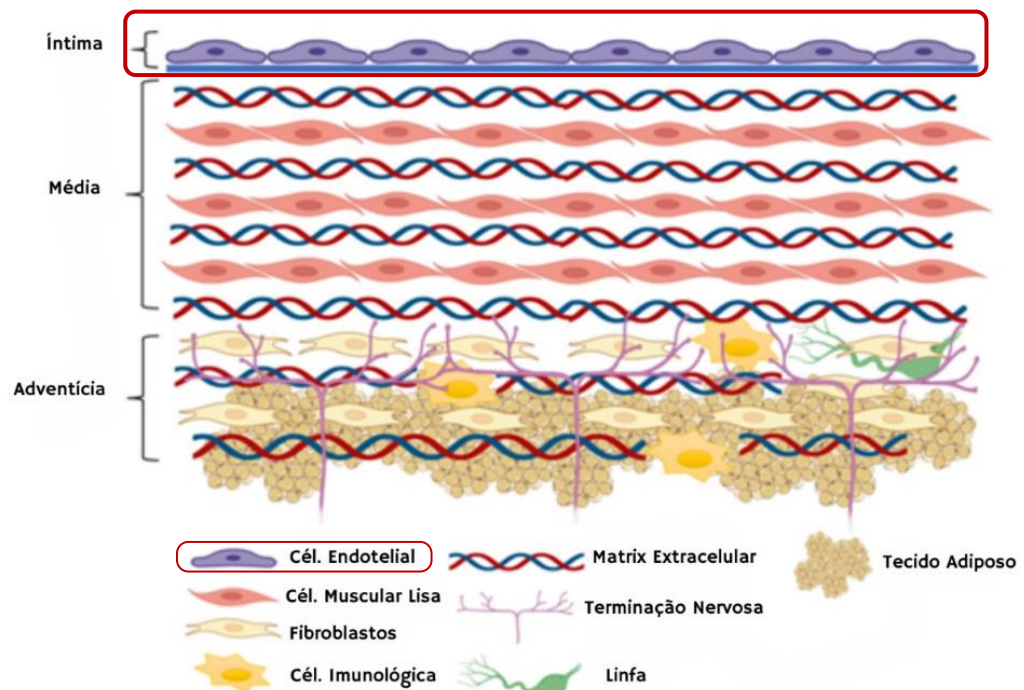
Fonte: Kilmister (2021).

O sistema renal pode receber ainda a influência de metabolitos produzidos diretamente pelo coração mediando sua capacidade de influenciar a modulação da pressão arterial. Krieger e colaboradores (1996) fizeram a descrição do peptídeo natriurético atrial, **ANP**, um hormônio que é secretado, quando há o estiramento dos átrios cardíacos, pelos miócitos atriais. As ações desse hormônio nos vasos, rins e glândulas adrenais promove tanto de forma aguda como crônica a redução da PA e do volume intravascular. Nos rins, o ANP atua em receptores presentes nos microvasos renais induzindo hiper filtração promovendo inibição do transporte de sódio e supressão da secreção de renina. Os autores descreveram ainda que o ANP também atua sobre o SRAA pois promove a inibição da síntese de aldosterona indiretamente (pela inibição da secreção de renina) como diretamente (por ação nas células da camada glomerulosa da adrenal) reduzindo os níveis de pressão arterial.

Outro importante mediador no controle dos níveis pressóricos é o óxido nítrico (NO) liberado pelo endotélio vascular. O endotélio é constituído por uma camada única de células endoteliais na porção mais interna dos vasos sanguíneos (FIGURA 03) o que garante ao endotélio a capacidade de atuar frente a diferentes estímulos, levando-

o a sintetizar e a secretar substâncias que podem modular o estado dos vasos sanguíneos (Gross; Aird, 2000).

FIGURA 03: Composição dos vasos sanguíneos em três camadas distintas: incluindo íntima, média e adventícia.



Fonte: Adaptado de Ma *et al.*, (2023).

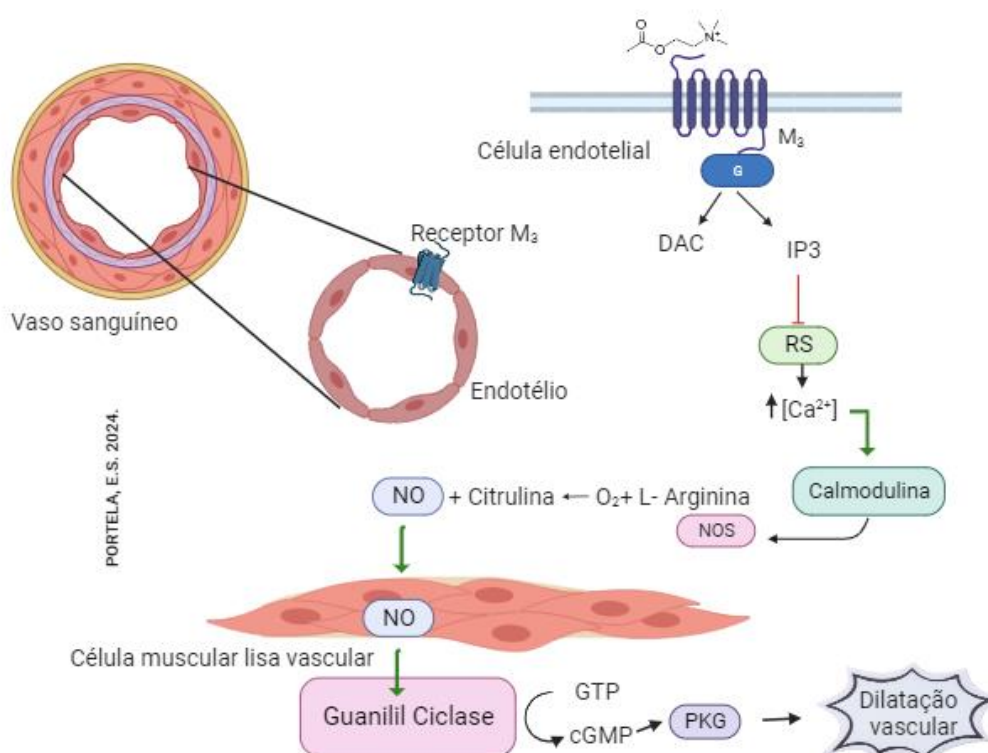
Camada mais interna (íntima) presença das células endoteliais responsáveis pela liberação de óxido nítrico (NO).

A liberação do óxido nítrico é iniciada após a produção de um estímulo, como um neurotransmissor conhecido como acetilcolina (ACh), em seguida o NO é biossintetizado do aminoácido L-arginina, oxigênio e uma variedade de cofatores mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), FIGURA 04, (Collier; Vallance, 1991). Após sua síntese o NO, no músculo liso vascular, promove vasodilatação sendo primeiramente referenciado como um fator de relaxamento derivado do endotélio (Furchgott; Zawadzki, 1980).

Nos vasos sanguíneos, o NO exerce ação de modular o diâmetro vascular interferindo na resistência vascular oferecida pelo vaso, reduzindo-a, pois relaxa o

musculo liso. Entretanto, a ação vasodilatadora do NO pode ser afetada pela condição específica de cada indivíduo, em que a presença de algumas doenças como a hipertensão, diabetes ou aterosclerose interfere negativamente nessa modulação da PA (Cerqueira; Yoshida, 2002). Artérias e arteríolas sintetizam maior quantidade de NO do que outros vasos, como veias e vênulas, sendo que a vasodilatação é maior nos vasos arteriais havendo liberação contínua de óxido nítrico mantendo o tônus vascular dilatado.

FIGURA 04: Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a estímulo, como a acetilcolina.



Fonte: Autor. Desenvolvido com BioRender.

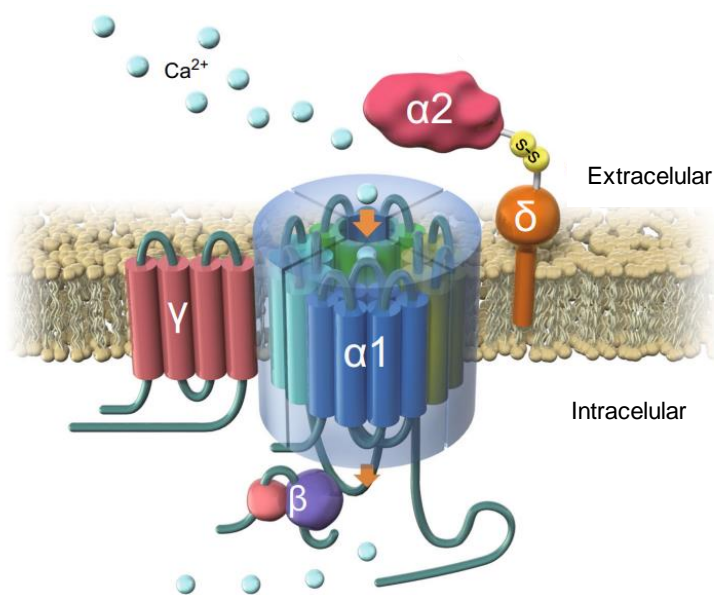
G=Proteína G; DAC=Diacilglicerol; IP₃= Inositol trifosfato; RS=retículo sarcoplasmático; NOS=óxido nítrico sintase; M₃= receptor muscarínico M₃; Ca²⁺=íon cálcio; NO=óxido nítrico; GTP= Trifosfato de guanossina; cGMP=monofosfato de guanossina cíclico; PKG= proteína quinase G.

Os canais iônicos também atuam no processo de regulação do músculo liso vascular, pois, são capazes de modular o acoplamento excitação/contração dos vasos

sanguíneos pois alteram o potencial de membrana plasmática e das concentrações de Ca^{2+} do meio intracelular (Thorneloe; Nelson, 2005).

A ação contrátil do musculo liso vascular é mediada através do influxo do íon cálcio dependente de voltagem, a partir da entrada do íon há formação de segundos mensageiros da sinalização elétrica dando início as funções celulares (Zhang *et al.*, 2005). Os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) são considerados a maior via de influxo de Ca^{2+} em uma variedade de tipos celulares, (Barlow *et al.*, 2006). A subunidade alfa-1 do canal de cálcio do tipo L, é uma parte importante em vários tecidos. Sua presença em tecido cardíaco, neurônios e células endócrinas destaca sua versatilidade e impacto em diferentes sistemas fisiológicos. Esses canais consistem em complexos hetero-oligoméricos, compostos por uma subunidade $\alpha 1$ central, associada a subunidades auxiliares (β , $\alpha 2$ δ e em alguns tecidos γ) (Figura 05) (Ninomiya *et al.*, 2020; Lacinová, 2005).

FIGURA 05: Estrutura de Ca_vL . Presença de uma subunidade transmembrana $\alpha 1$ formadora de poros, uma subunidade extracelular $\alpha 2$ ligada por uma ponte dissulfeto à subunidade transmembrana δ , uma subunidade β intracelular e uma subunidade γ transmembrana.



Fonte: Adaptado de Ninomiya *et al.*, 2020.

A ação dos canais para Ca^{2+} que são ativados por alta voltagem tem seu início a partir de potenciais de membrana acima de $-20mV$, esses canais também são

chamados de Ca^{2+} tipo L, são sensíveis a fármacos que atuam como inibidores (nifedipino) e como ativadores (Bay K 8644) desse canal (Lacinová, 2005). O fluxo de íons através dos canais também é crucial para a manutenção do potencial de membrana. Tanto o potencial de membrana quanto a concentração intracelular de cálcio impactam no controle do influxo e liberação de Ca^{2+} , afetando a sensibilidade do aparato contrátil. Assim, também é importante destacar a importância dos canais iônicos de potássio (K^+) para a complexidade da homeostase eletrolítica, desempenhando um papel fundamental na manutenção do potencial de membrana. O fluxo iônico regulado por esses canais, exerce uma influência direta no potencial de membrana, inclusive, nas células do músculo liso vascular, diversas categorias distintas de canais de potássio desempenham uma função específica no processo de vasorrelaxamento. Destacam-se entre elas os canais de potássio voltagem-dependentes (K_v), os canais sensíveis a ATP (KATP) e os canais ativados por cálcio de alta condutância (BKCa) (Haam *et al.*, 2022; Jackson, 2017; Akata, 2007).

Além do uso de fármacos que atuam na modulação do influxo de cálcio, é comum que indivíduos hipertensos busquem complementar o tratamento medicamentoso com o uso de plantas medicinais, seja como uma medida preventiva ou uma tentativa de reduzir os valores pressóricos já elevados. Algumas plantas medicinais têm sido estudadas por seus potenciais efeitos na redução e tratamento da hipertensão através de seus produtos naturais (Romana, 2018).

Compostos de origem natural representam alternativas promissoras terapêuticas, não apenas para o tratamento de doenças, mas também como fontes potenciais para modificações estruturais. Essas adaptações estruturais têm o intuito de aprimorar a eficácia terapêutica, especialmente direcionada a alvos específicos. No contexto das plantas medicinais, suas propriedades intrínsecas proporcionam uma base sólida para intervenções doenças. Dessa maneira os derivados de plantas medicinais atuam como estratégias viáveis para abordar desafios contemporâneos de saúde. Além disso, a necessidade contínua de realizar modificações estruturais e análises detalhadas de interações moleculares com proteínas-alvo evidencia a importância científica dessas moléculas (Linazzi, 2023). Essa abordagem não apenas as coloca como objeto de estudo, mas também oferece oportunidades essenciais para aprimorar e potencializar a ação terapêutica desses compostos, apresentando novas

perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos e intervenções na área clínica.

1.3 Tratamento da Hipertensão Arterial

No que se refere às formas de tratamento empregadas no controle da hipertensão arterial existem duas formas gerais que são recomendadas para o indivíduo hipertenso que seriam o tratamento não medicamentoso e o tratamento medicamentoso. Aquele se refere a alterações no modo de vida do indivíduo como, redução da ingestão de sal, prática regular de atividades físicas, redução do consumo de bebidas alcoólicas e o abandono do tabagismo (Sousa *et al.*, 2021).

No tratamento farmacológico da hipertensão arterial ocorre a utilização de fármacos que abrangem seis classes terapêuticas desempenhando papéis distintos na regulação da pressão arterial. Essas classes compreendem diuréticos, que promovem a excreção de sódio e água; inibidores de ação central, que atuam no sistema nervoso central; β -bloqueadores, que bloqueiam os receptores β -adrenérgicos; bloqueadores de canais de cálcio, que interferem na entrada de íons de cálcio nas células; inibidores da enzima conversora de angiotensina, que influenciam o sistema renina-angiotensina-aldosterona; e bloqueadores dos receptores de angiotensina 2, que inibem a ação da angiotensina 2. Essas abordagens farmacológicas visam controlar a HA, reduzindo os fatores hipertensivos e mantendo a homeostase cardiovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016; Brasil, 2018).

Os diuréticos são medicamentos que estimulam a formação e eliminação de urina, abrangendo quatro conjuntos principais de acordo com sua área de atuação nos rins como os diuréticos tiazídicos apresentando como característica a redução da quantidade de K^+ . Essa classe farmacológica evidencia a capacidade de reduzir a retenção hidrossalina demonstrando ação hipotensora (Machado *et al.*, 2021.; Shah *et al.*, 2004).

Os Agentes Inibidores de ação central representam uma classe de medicamentos simpaticolíticos que promovem uma inibição da descarga neural simpática. Esses fármacos exercem sua ação ao estimular os receptores α_2 adrenérgicos pré-sinápticos no sistema nervoso central, resultando na redução do tônus simpático (Xu *et al.*, 2017).

Os β bloqueadores adrenérgicos exercem sua ação por meio da modulação da contratilidade miocárdica e controle da frequência cardíaca (FC). A regulação da frequência cardíaca e da contratilidade miocárdica desencadeada pelos beta-bloqueadores resulta em uma redução do débito cardíaco, e leva a redução da pressão arterial. Este efeito se destaca, especialmente, no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS) quando há uma associação com elevado débito cardíaco e aumento do tônus simpático (Almonfrey *et al.*, 2020).

Na prática clínica o controle do influxo de cálcio é uma das formas de tratamento da hipertensão arterial. Os bloqueadores dos canais de cálcio atuam nos canais de membrana ligando-se à subunidade α_1 desses canais nos tecidos musculares reduzindo a entrada de cálcio na célula. Essa diminuição na concentração de cálcio intracelular resulta em uma redução na contratilidade do músculo (Romana, 2022). Exemplos desses fármacos são nifedipina (usado com anti-hipertensivo), anlodipino, verapamil e diltiazem que apresentam efeito dilatador vascular por aturem sobre o fluxo de íons cálcio por meio do bloqueio de canais (Silva *et al.*, 2020; Santos-Júnior *et al.*, 2022).

Os antagonistas de canal de cálcio também promovem vasodilatação e redução da resistência vascular periférica. Os Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCCs) podem ser categorizados como dihidropiridinas, a exemplo o verapamil. A contração do músculo liso vascular é influenciada pela concentração de íons Ca^{2+} intracelular, quando esse canal tem sua atividade interrompida ou reduzida por uma dihidropiridinas resulta na inibição do transporte transmembranar do Ca^{2+} , promovendo redução da concentração intracelular desse íon levando ao relaxamento do músculo liso, reduzindo a resistência periférica e promovendo redução da pressão arterial (Machado *et al.*, 2021).

Outros medicamentos utilizados na hipertensão são os bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que podem atuar como inibidores de renina, inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1. Os Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) representam uma classe de fármacos que atua inibindo a ação dessa enzima, resultando na supressão da formação de angiotensina II. Esta última está associada ao aumento da pressão arterial devido à intensificação da retenção de sódio e água nos vasos. (Malaquias *et al.*, 2016). O captopril foi o precursor entre os fármacos desta classe a ser desenvolvido para o tratamento da

hipertensão. Esses fármacos também atuam diminuindo a síntese ou bloqueando os efeitos da aldosterona e da Angiotensina 2, prevenindo, desta maneira, os efeitos prejudiciais no sistema cardiovascular desses dois compostos. (Te Reite *et al.*, 2015).

No Brasil determinados medicamentos utilizados no controle da hipertensão arterial podem ser adquiridos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e pelo Programa Farmácia Popular (Brasil, 2018). Outro método bastante utilizado, principalmente pelas populações de baixo poder monetário, é a utilização de plantas medicinais para a cura ou alívio de determinadas doenças que acometem o corpo (Cunha *et al.*, 2023).

1.5 Plantas Medicinais

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos (ANVISA, 2010). Países em desenvolvimento, por apresentarem um sistema de saúde não acessível a todos, fazem utilização de plantas medicinais na medicina popular como única forma de tratamento para determinadas doenças, em que 65% a 80% da população depende dessas plantas para cuidados básicos de saúde (Chen *et al.*, 2016; National Health, 2016). Muitas espécies de plantas têm significativa importância por parte da população no tratamento de doenças (utilizando-se formas simples de administração, como chás, decocções, infusões e macerados) incluindo a hipertensão arterial. As plantas medicinais e outros produtos naturais, são uma importante fonte para a obtenção de agentes terapêuticos há muitos anos pela humanidade (Calixto *et al.*, 2017).

A busca para alívio ou cura das doenças enfrentadas pelo homem ao longo dos anos era conseguida a partir da utilização dos produtos naturais, os quais existiam de muitas maneiras, desde tinturas, chás e até na forma de pó. A utilização das plantas no tratamento de enfermidades é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 65% a 80 % da população nos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como fonte para obter a garantia de uma boa saúde primária (Junior *et al.*, 2005).

As espécies vegetais que são administradas ao homem ou animal, por determinada via ou forma que exercem ação terapêutica, tendo uma utilização em comunidades tradicionais, como “remédios” caseiros é considerada como uma planta

medicinal. Muitas vezes também são consideradas como matéria-prima na fabricação de medicamentos fitoterápicos. (Firmo *et al.*, 2011). A Organização Mundial de saúde (OMS) afirma que cerca de 80% da população no mundo é beneficiada com o uso das propriedades terapêuticas das plantas medicinais; mas a falta de conhecimento sobre essas propriedades em conjunto com o mau uso, são alguns dos fatores determinantes para o manejo irregular e exagerado (Rosa *et al.*, 2011).

Essas espécies vegetais são relevantes para a busca farmacológica por novas “drogas” que apresentem potencial terapêutico obtido de compostos derivados de substâncias químicas simples presentes no vegetal (metabólitos primários e secundários), cujo objetivo é atuar na nutrição e proteção do vegetal (Maciel *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2002).

Para modificar o quadro de hipertensão, o uso de plantas medicinais tem sido uma alternativa frequentemente utilizada (Barros; Aguiar, 2012; Sousa *et al.*, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial já utilizou alguma planta com objetivos terapêuticos. A flora brasileira é muito diversificada e tem originado os princípios ativos mais importantes do mundo (Alves, *et al.*, 2009).

Os metabólitos primários são açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros; já os metabólitos secundários (cumarinas, taninos, quinonas, polifenóis, terpenos) são produtos de reações químicas de enzimas e estruturas específicos da planta, atuando na sobrevivência da espécie (Simões, 2003). Assim, essas substâncias possuem diversas atividades medicinais com alto potencial curativo, sendo utilizadas como agentes de prevenção de doenças (neurodegenerativas, inflamatórias, cardiovasculares entre outras) (Arruda *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2009).

Diante disso, faz-se necessário o estudo de plantas medicinais e seus derivados para tratar doenças, e reforçar a busca por substâncias farmacologicamente ativas, em especial as enfermidades que possuam ação sobre o sistema cardiovascular (como a hipertensão arterial por exemplo), já que essas doenças são apontadas na literatura como umas das maiores causas de óbitos.

Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, delineia diretrizes e metas prioritárias para orientar a colaboração entre diversos parceiros para alcançar metas comuns voltados à garantia do acesso seguro e à promoção do uso racional de

plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país. Além disso, a política visa impulsionar o desenvolvimento de tecnologias e inovações, fortalecer as cadeias e os arranjos produtivos, promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira e contribuir para o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (Ministério da Saúde, 2006). Dentre as plantas medicinais mais utilizadas pelas comunidades, pode-se mencionar a espécie *Protium heptaphyllum* March conhecida popularmente como Almecegueira, Almécega ou Breu Branco (FIGURA 06).

FIGURA 06: Espécie *Protium heptaphyllum* March, popularmente conhecida como Almécega.



Fonte: Domínio Público.

A espécie *P. heptaphyllum*, pertencente à família Burseraceae, é uma árvore encontrada em quase todo o Brasil (em áreas úmidas ou áreas de solo arenoso seco) é perene e aromática, com altura de 10 a 20 metros, com caule de 40 a 60 cm de diâmetro (Lorenzi, 2008). É encontrada principalmente na região amazônica e em alguns estados do Nordeste, como Bahia, Ceará e Piauí, e outros países da América do Sul, Colômbia, Paraguai, Suriname e Venezuela, (Mobin *et al.*, 2017).

A espécie *Protium heptaphyllum* é bastante conhecida por ser rica em resinas e óleos essenciais (Mobin *et al.*, 2017). De acordo com Mendes (2019) o óleo essencial dessa espécie vegetal quando administrado por via venosa induz efeito hipotensor e bradicárdico por participação dos receptores muscarínicos, α e β -adrenérgicos em ratos normotensos e efeito anti-hipertensivo em ratos SHR. Já o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* quando complexado a β -ciclodextrina apresentou atividade anti-hipertensiva em ratos hipertensos (L-NAME) ainda segundo o mesmo autor. A espécie também exala uma resina oleosa chamada Almecega ou Breu

branco, que endurece em contato com o ar; esse material tem uma coloração branco-esverdeada e um aroma agradável usada na produção de cosméticos, como cremes e pomadas, devido às suas propriedades medicinais e aroma agradável (Correia, 1984).

Além do uso destinado para fins industriais a resina obtida da casca da árvore é reconhecida na medicina popular por seus benefícios terapêuticos por apresentar propriedades anti-inflamatórias, ajudando a aliviar inflamações e dores musculares quando aplicada externamente. Contribui para a cicatrização de feridas e regeneração dos tecidos (Mobin, 2016).

Ademais, alguns constituintes do óleo essencial da espécie vegetal apresentam ação sobre o sistema cardiovascular como efeito hipotensor, anti-hipertensivo, vasorrelaxante ou cardioprotetor (Mendes, 2019; Nunes 2018; Oliveira, 2021; Paulino, 2019, Santos, 2018).

Apesar de seu amplo uso terapêutico na medicina popular em tratamentos contra doenças, não há relatos na literatura sobre aplicações da resina ou de sua fração ácida sobre o sistema cardiovascular. A partir disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Fração Ácida obtida da Resina de Almécega (F.A.R.A) sobre parâmetros cardiovasculares em modelos animais normotensos e hipertensos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos cardiovasculares e hipoglicemiante induzidos pela Fração Ácida da Resina de Almécega (F.A.R.A) em ratos normotensos e hipertensos (modelo SHR) e hipoglicemiante

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade da F.A.R.A. através do teste de MTT;
- Verificar os efeitos da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar e SHR;
- Avaliar a ação da F.A.R.A. sobre a glicemia de ratos Wistar e SHR;
- Verificar o efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. em artéria aorta de ratas SHR;
- Investigar a participação de canais de cálcio na ação vasorrelaxante da F.A.R.A.
- Investigar a participação de canais de potássio na ação vasorrelaxante da F.A.R.A.
- Realizar análise *in sílico* de ancoragem molecular do terpeno majoritário presente na fração, com o canal de cálcio do tipo L.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

A Fração Ácida da Resina de Almecega (obtida da espécie vegetal *Protium heptaphyllum* March) foi adquirida através de parceria realizada com o Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO-UFPI) em parceria com o Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima do Departamento de Química da UFPI Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI. A exsicata do material botânico está registrada no Herbário Graziela Barroso da UFPI com o Nº 18.247 (Vieira Júnior, 2005).

3.2 Substâncias, reagentes e equipamentos.

Os reagentes, anestésicos e fármacos utilizados foram: xilazina (Ceva[®] 20mg/kg), quetamina (Ceva[®] 80mg/kg), Tiopental sódico (Cristália, Brasil 100mg/kg), lidocaína (10mg/Kg), fenilefrina, acetilcolina. A substância teste utilizada Fração Ácida da Resina de Almecega e como diluente da substância foi utilizado o Chremophor 1% (SIGMA[®]). Para o ensaio de MTT foram utilizados os seguintes reagentes: D-MEM 15%, soro fetal bovino (FBS), água de injetáveis, dimetilsulfóxido (DMSO), captopril (Medley[®]) e Bay K 8644-Sigma-Aldrich[®] dissolvido em etanol 100%, TEA-Tetraetilamônio -Sigma-Aldrich[®].

Utilizou-se sistema eletrônico de aquisição de dados biológicos (Sistema Completo de Aquisição de Dados para Contração Muscular 2.5.2 - AQCAD), computador, leitor de microplacas Bio Tek Elx 800, Manguito MLT 125/1, Transdutor de sinal Power lab 415 ADInstrument, monitor de glicemia On cal Pluss II entre outros equipamentos laboratoriais.

3.3 Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, ratos e ratas espontaneamente hipertensos (SHR) com 60 dias de vida pesando entre 200-300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), mantidos no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM/UFPI) e no Biotério Setorial do Departamento de Biofísica e Fisiologia da UFPI, em temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sobre ciclos de 12 h claro/escuro, com água e ração *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas éticas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFPI), sob o número 739/2022. Ao término dos experimentos os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico geral Tiopental sódico - 100 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.). Os procedimentos de eutanásia foram feitos conforme resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e resolução normativa do CONCEA nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

3.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

3.4.1 Solução nutritiva de Krebs Normal

Para a preparação da solução nutritiva de Krebs Normal, baseou-se na metodologia desenvolvida por Altura et al., (1970). Os sais utilizados foram: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), glicose ($C_6H_{12}O_6$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e fosfato de potássio mono hidratado ($KH_2PO_4 \cdot H_2O$). Após o preparo da solução, mediu-se o pH e ajustou se para 7,4 quando necessário (TABELA 1).

TABELA 1: Composição da solução de Krebs Normal

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,7
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,2
$NaHCO_3$	25,0
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,2
Glicose	5,5

Fonte: Adaptado de Altura et al., 1970.

3.4.2 Solução Despolarizante de KCl 20mM

Para a preparação da solução despolarizante de KCl 20 mM foi preparada uma solução de Krebs despolarizante com KCL 20 mM conforme descrito na TABELA 2. Após o preparo da solução, mediu-se o pH e ajustou se para 7,4 quando necessário.

TABELA 2: Composição da solução despolarizante de KCl 20 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	34,1
KCl	20,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,2
Glicose	5,5

Fonte: Adaptado de Altura *et al.* 1970

3.5 Protocolos experimentais

3.5.1 Citotoxicidade em células tronco medulares de ratas SHR pelo teste do MTT

O ensaio MTT foi realizado no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt) do Centro de Ciências Agrárias da UFPI. Para avaliar se a F.A.R.A. apresenta efeito citotóxico nas células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratas hipertensas (BMMSC), o ensaio MTT foi adaptado do protocolo descrito por Capella *et al.*, (2019) e avalia a viabilidade celular com base na função mitocondrial através da redução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em um sal de formazan insolúvel colorido.

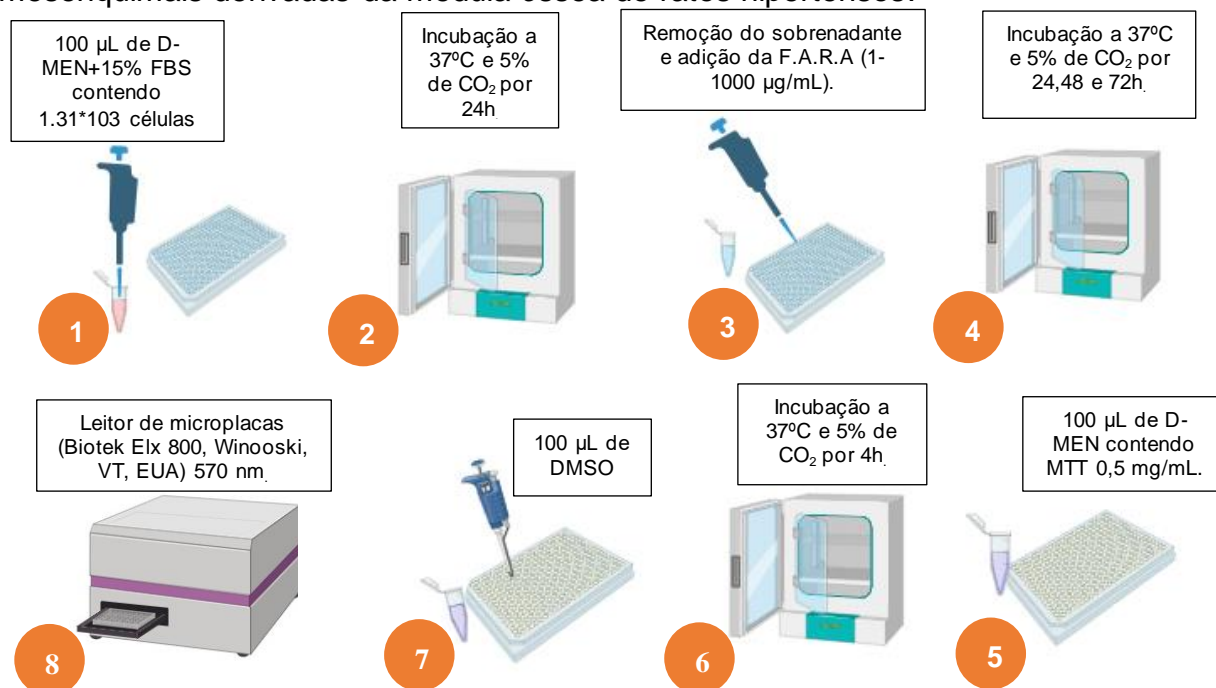
Os BMMSC foram semeados a $1,31 \times 10^3$ células por poço em uma placa de 96 poços, cultivados em 100 μ L de D-MEM 15% FBS e deixados crescer por 24 h. Em seguida, 50 μ L da Fração Ácida da Resina de Almécega (1; 3; 9; 27; 81; 243; 500; 750 e 1000 μ g/mL) foram colocados sobre a cultura e incubados por 24, 48 e 72 h. Depois disso, a F.A.R.A. foi removida e o ensaio MTT foi realizado. Um controle positivo (BMMSC em meio de cultura usual) e um controle negativo (o diluente) foram incluídos para validar o protocolo de viabilidade.

Em seguida, uma solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada às células para atingir uma concentração final de 0,5 mg/mL em DMEM e depois incubada por 4 h. O meio foi removido e substituído por 100 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazan.

A absorvância dos corantes foi registada a 570 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx 800, Winooski, VT, EUA). O número de células viáveis após 24, 48 e 72h foi expresso como absorvância de formazan ou corante vermelho neutro obtido do crescimento celular em contato com hidrogéis e grupos controle. A citotoxicidade da

F.A.R.A. foi estudada em contato com a linhagem celular BMMSC pelo ensaio MTT durante 24, 48 e 72 h em cultura para demonstrar a biocompatibilidade (FIGURA 07).

FIGURA 07. Representação ilustrativa do teste de MTT em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos hipertensos.



Fonte: Autor. Desenvolvido com BioRender.

3.6 REGISTRO DA PRESSÃO SISTÓLICA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA PELO MÉTODO DE PLETISMOGRAFIA.

3.6.1 Delineamento experimental para o método da pletismografia de cauda.

Para a realização deste ensaio experimental foram utilizadas duas linhagens de animais testes. A primeira foi a linhagem de ratos Wistar (normotensos) que tiveram a avaliação de seus valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC) avaliados 30 minutos após receberem por gavagem a administração da F.A.R.A. Para este método os animais foram divididos em grupos de 6 cada, em que foram avaliados os valores basais de PAS e FC (controle negativo) Grupo Captopril 10mg/Kg, controle positivo, (Silva *et al.*, 2011) e os grupos que receberam a Fração teste nas doses propostas de 25, 50 e 100mg/Kg. A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foi realizada a partir da utilização de cinco grupos testes. O primeiro grupo recebeu a administração do veículo cremophor 1%, o

segundo grupo controle positivo que recebeu a administração de captopril 10mg/Kg (Silva *et al.*, 2011), e os demais grupos de animais que receberam a substância teste nas doses de 25, 50 e 100mg/Kg. Após receberem a administração de suas respectivas substâncias (v.o) cada grupo passou por um período de monitoramento dos valores de PAS e FC por 30 minutos

A segunda linhagem de animais utilizada foi a de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que tiveram a avaliação de seus valores de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca avaliados durante um período de 120 minutos em intervalos cronometrados de 15 minutos entre cada aferição. Para este método os animais foram divididos em grupos de 6 cada, em que foram avaliados os valores basais de PAS e FC (controle negativo) Grupo Captopril 10mg/Kg (controle positivo) e os grupos que receberam a Fração teste nas doses propostas de 25 50 e 100mg/Kg.

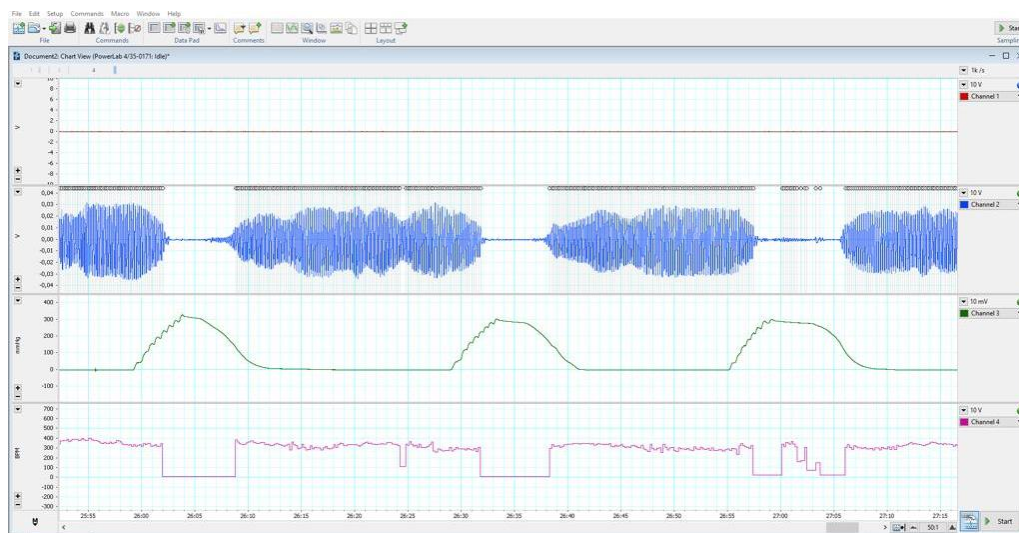
3.6.2 Protocolo experimental da pletismografia de cauda em ratos normotensos.

O método utilizado para verificar a PAS indireta dos animais seguiu o protocolo de Magaldi (1944) em que os animais passaram por um período de treinamento, realizado uma vez ao dia durante três dias, para aclimação em um contensor cilíndrico, a fim de reduzir possíveis variações pressóricas devido ao estresse. Os ratos foram aquecidos por 10 minutos em caixa de madeira contendo uma lâmpada de 40 watts para promover dilatação da artéria caudal e facilitar a medida da PAS (pressão arterial sistólica) e FC (frequência cardíaca), posteriormente colocados no cilindro de contenção. Um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato, acoplados ao transdutor de pulso / manguito de pressão MLT125/r conectado a um sistema de transdução de sinal (PowerLab 4/S, ADInstrument Pty Ltda) e este, estava ligado a um computador contendo o programa de análise desse sinal (LabChart 8 Pro - ADInstruments Pty Ltda).

Após o início de aferição da PAS através da artéria caudal dos animais, os mesmos foram monitorados e tiveram a pressão definida através da média aritmética realizada após três medidas sequenciais.

A partir disso a pressão arterial sistólica era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso após desinsulfração do manguito (pulso de retorno) deste processo (FIGURA 08). Já para análise da FC foram selecionados os mesmos pontos que correspondiam ao retorno do sinal de pulso da PAS (Moura-Junior, 2009).

FIGURA 08: Representação da janela de visualização do programa LabChart 8 Pro, durante um experimento de medida indireta da pressão arterial sistólica.



Fonte: Autor.

As linhas representam: pressão arterial sistólica (canal 2/ linha azul), pressão do manguito (canal 3/ linha verde), frequência cardíaca (canal 4/ linha rósea).

3.6.3 Protocolo experimental da pletismografia de cauda em ratos SHR

O método utilizado para verificar a PAS indireta dos animais seguiu o protocolo de Magaldi (1944) já descrito no item 3.6.2 acima. A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foi realizada a partir da utilização de cinco grupos testes. O primeiro grupo recebeu a administração do veículo cremophor 1%, o segundo grupo controle positivo que recebeu a administração de captopril 10mg/Kg (Silva *et al.*, 2011), e os demais grupos de animais que receberam a substância teste nas doses de 25, 50 e 100mg/Kg. Após receberem a administração de suas respectivas substâncias (v.o) cada grupo passou por um período de monitoramento dos valores de PAS e FC por 120 minutos sendo cada medida coletada a cada 15 minutos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos). A partir disso a pressão arterial sistólica era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso após desinsuflação do manguito (pulso de retorno) deste processo. (FIGURA 08). Já para análise da FC foram selecionados os mesmos pontos que correspondiam ao retorno do sinal de pulso da PAS (Moura-Junior, 2009).

3.7 Investigação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em ratos hipertensos e normotensos.

Para o desenvolvimento deste protocolo foram utilizadas duas linhagens distintas de animais roedores em dieta *ad libitum*. A primeira linhagem utilizada foi de ratos Wistar (n=6) que tiveram seus valores de glicose sanguínea avaliados após 30 minutos da administração, por gavagem, da F.A.R.A. (25, 50 e 100mg/Kg) através de punção sanguínea caudal. Modelos normotensos não apresentam pressão arterial elevada e possuem sistema adrenérgico e colinérgico trabalhando em equilíbrio. Outro ponto importante é que um dos parâmetros avaliados (FC) no rato normotenso pode ser reduzida devido a ação cardíaca intrínseca ou de marcapasso (Negrão, Rondon, 2001).

A segunda linhagem utilizada foi de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (n=6) que tiveram seus valores de glicose sanguínea avaliados durante 120 minutos da administração por gavagem da F.A.R.A. (25, 50 e 100mg/Kg) através de punção sanguínea caudal. Modelos hipertensos apresentam pressão arterial elevada e possuem superexpressão do sistema adrenérgico em detrimento do colinérgico. Outro ponto importante é que um dos parâmetros avaliados (FC) no rato hipertenso ela pode ser reduzida devido à diminuição do tônus simpático no coração (Negrão, Rondon, 2001).

Para a quantificação da concentração dos níveis de glicose em mg/dL de sangue foi utilizado para ambos os grupos o Monitor de Glicemia On Call® Plus II (FIGURA 09) com intervalo de medição entre 20 e 600 mg/dL em que foram coletadas da cauda de cada animal aproximadamente 0.5 µL de amostra de sangue em cada momento de avaliação.

FIGURA 09: Monitor de Glicemia On Call® Plus II acrescido de fita teste após avaliação do valor de glicose em amostra sanguínea de rato.



Fonte: Autor.

3.8 ENSAIO FARMACOLOGICO IN VITRO

3.8.1 Avaliação do efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. em anéis de artéria aorta de ratas hipertensas.

Após eutanásia dos animais (lidocaína - 10mg/Kg e Tiopental sódico - 100 mg/kg i.p.) a artéria aorta foi cuidadosamente removida e imersa em placas de petri contendo solução de Krebs. Em seguida, a aorta foi limpa de tecido conectivo e adiposo. Os anéis do primeiro segmento da artéria (3- 4 mm) foram mantidos em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs, a 37 °C e aerados com uma mistura de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis foram acoplados a hastes de aço inoxidável, em forma de triângulos, os quais foram passados através do lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permanecessem paralelos. Através de um fio de algodão as hastes de metal foram fixadas à transdutores de tensão isométricas acoplado a um amplificador de sinal, AECAD 1604, software AQCAD 2.0.5, AVS Projetos-SP, (FIGURA 10) para o registro das tensões. Assim, toda alteração no diâmetro do vaso foi capitada pelo transdutor de força. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 1,5 g por um período de 60 minutos, sendo reajustada quando necessário. Durante essa etapa o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para

prevenir a interferência de metabólitos. Os anéis sem endotélio eram caracterizados com menos de 10% de relaxamento (Altura; Altura, 1996).

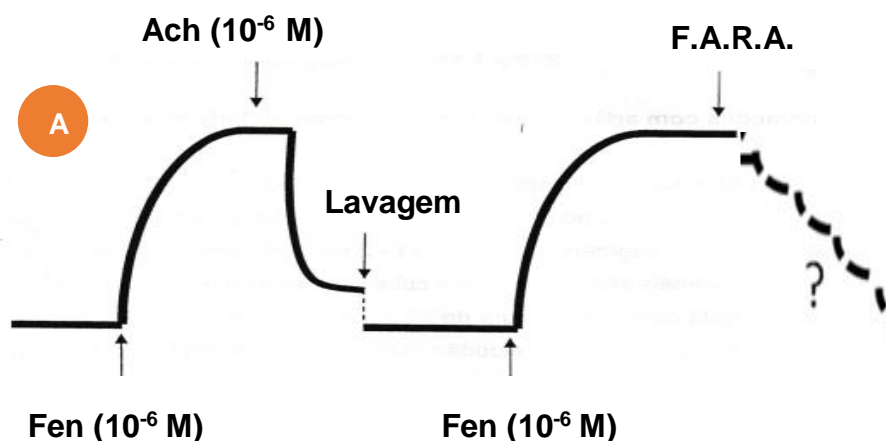
FIGURA 10: Sistema de aquisição de dados AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP) e sistema de cubas para órgão isolado (A e B), anéis de artéria aorta isolada de ratas SHR (C).



Fonte: Autor.

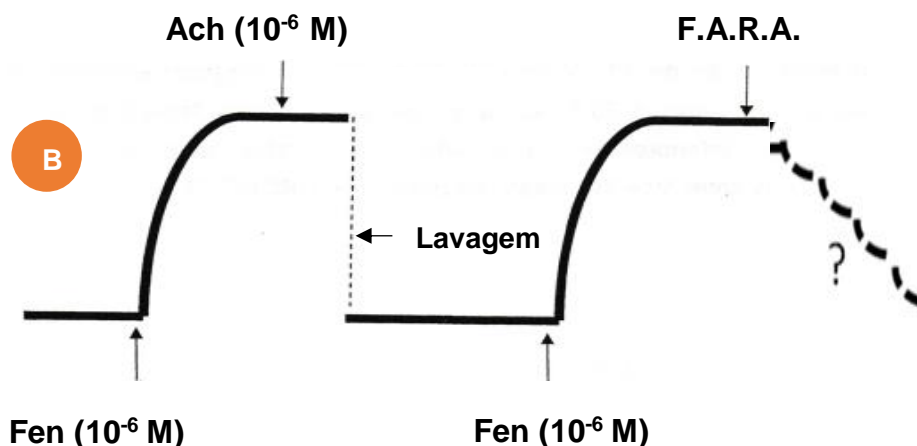
Após um período de 60 minutos e verificada a ausência do endotélio vascular (FIGURA 11) foi induzida uma contração através da adição de fenilefrina (FEN 10^{-6} M) e em seguida a administração da F.A.R.A. de forma cumulativa (1; 3; 9; 27; 81; 243; 500; 750 e $1000\mu\text{g/mL}$). Anéis sem endotélio foram obtidos, quando necessários, através de átrio mecânico do vaso com a haste de aço inoxidável.

FIGURA 11 A: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da F.A.R.A. em anéis de artéria aorta de ratos na presença e ausência de endotélio vascular. A: Anéis com endotélio vascular. Ach=Acetilcolina; Fen=Fenilefrina.



Fonte: Autor.

FIGURA 11 B: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da F.A.R.A. em anéis de artéria aorta de ratos na presença e ausência de endotélio vascular. B: Anéis sem endotélio vascular. Ach=Acetilcolina; Fen=Fenilefrina.



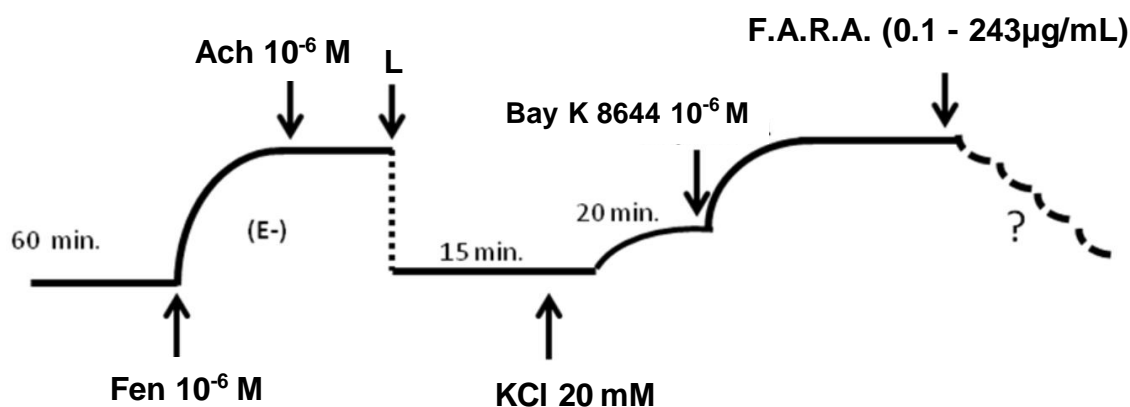
Fonte: Autor.

3.8.2 Efeito da F.A.R.A. sobre contrações induzidas por S-(-) Bay K 8644 em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratas SHR

Após a verificação da ausência do endotélio vascular, as preparações de aorta foram pré-incubadas com uma solução despolarizante de KCl 20mM por 20 minutos

seguinto a metodologia desenvolvida por Barrús e colaboradores (1996) procedimento realizado para obter-se melhor resposta ao agente contrátil utilizados. Em seguida administrou-se às cubas Bay k 8644 10^{-6} M um ativador de Ca_vL (Aleixandre *et al.*, 1992; Barrús *et al.*, 1996) para obtenção de uma contração sustentada. Na fase tônica desta contração administrou-se F.A.R.A. (0.1 - 243 μ g/mL) FIGURA 12.

FIGURA 12: Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito da F.A.R.A. sobre contração induzida por Bay K 8644 (10^{-6} M) em anéis de artéria aorta isolada de ratas SHR na ausência do endotélio vascular. FEN= Fenilefrina; Ach= Acetilcolina; L= Lavagem; min= minuto.

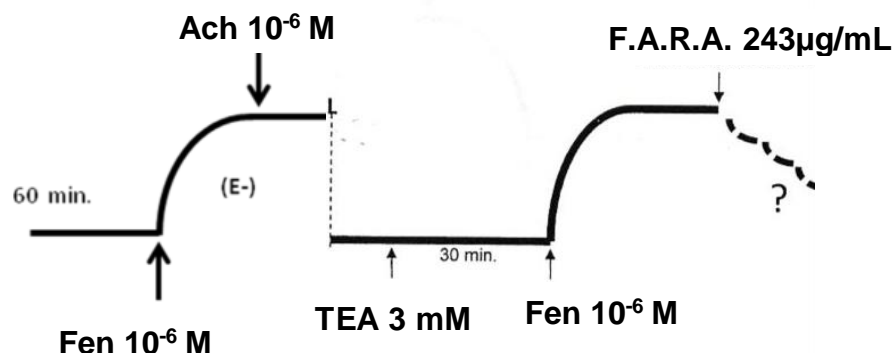


Fonte: Autor.

3.8.3 Efeito da participação dos canais para potássio na resposta vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A. em anéis de aorta.

Para o desenvolvimento deste protocolo foi utilizada a metodologia adaptada de Haam e colaboradores (2022). Os anéis de artéria aorta sem endotélio vascular foram pré-incubados por 30 min. com TEA, Tetraetilamônio, (3 mM) um bloqueador não seletivo de canais para potássio (Haam *et al.*, 2022). Após 30 min, desse procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-6} M), em cuja fase sustentada adicionou-se concentração única da F.A.R.A. [243 μ g/mL]. A resposta obtida foi comparada com o controle na ausência do TEA 3 mM (Figura 13).

FIGURA 13: Representação esquemática para verificação da participação dos canais para potássio na resposta vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A. em anéis de aorta. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, min.= minuto, TEA = Tetraetilamônio.



Fonte: Autor.

3.9 Análises *in sílico*

Em análise de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, que está sendo finalizada através de parceria do Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí (LAGO) com a Universidade Federal da Paraíba, foi evidenciado que o terpeno (entre os majoritários) ácido β - elemônico é o constituinte mais abundante da fração. A partir disso realizamos avaliação de *docking molecular* com ácido β - elemônico e o canal de cálcio do tipo L.

3.9.1 Modelagem de Proteínas por Homologia

A modelagem de proteínas por homologia foi realizada utilizando a sequência fasta de aminoácidos adquirida na plataforma Uniprot (ID: Q13936). Foi identificada a proteína com estruturas que apresentavam similaridade estrutural, utilizando a plataforma Phyre2 (Protein Homology/Analogy Recognition Engine v. 2.0), conforme descrito por Kelley *et al.*, (2015). A estrutura tridimensional gerada foi baixada e sobreposta no software Chimera com a proteína modelo identificada pelo Phyre2 no Protein Data Bank. A proteína Cav L (PDB ID: 8FHS), foi selecionada buscando aquela com menor raiz do desvio quadrático médio (RMSD). Espera-se que proteínas com boa estrutura modelada apresentem RMSD de até 2 angstroms em comparação com o modelo de referência (Carugo; Pongor, 2001). Além disso, a qualidade do modelo de proteína gerada pela plataforma foi analisada usando o PROCHECK, com base no

gráfico de Ramachandran, utilizando o software Chimera, conforme descrito por Hooft *et al.*, (1997).

3.9.2 Docking molecular

Para os procedimentos de *docking molecular*, a estrutura do ácido beta elemônico foi adquirida na plataforma PubChem, onde foi baixada em formato SDF. Em seguida, essa estrutura passou por otimização utilizando o campo de força molecular da Merck (MMFF94s) através do software Avogadro, conforme detalhado por Hanwell *et al.* (2012), a fim de obter a conformação de menor energia. A representação bidimensional do ácido beta elemônico foi elaborada utilizando o software Marvin Sketch v.23.11.

A estrutura da proteína modelada foi protonada utilizando os parâmetros de pH 7.4 e o campo de força PARSE na plataforma PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2007). As estruturas da proteína e do ligante foram preparadas, incluindo a adição de hidrogênios polares e o cálculo das cargas de Gasteiger. Posteriormente, o docking foi concluído utilizando o programa AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010), e as energias de interação de cada uma das 9 poses em cada complexo foram utilizadas para os cálculos estatísticos posteriores. Para analisar as interações tridimensionais e bidimensionais entre a proteína e o ligante, foi empregado o software Biovia Discovery Studio (BDS). Essas ferramentas possibilitaram uma investigação detalhada das interações moleculares, fornecendo informações cruciais sobre a afinidade e especificidade da ligação entre a proteína e o ligante (Morris *et al.* 2009) e (Trott e Olson 2010), respectivamente. A molécula do verapamil foi escolhida como controle positivo para este ensaio uma vez que Nunes (2018) evidenciou em sua pesquisa que o α -terpineol, um constituinte presente no óleo essencial de *P. heptaphyllum* demonstrou atenuação do efeito hipotensor após bloqueio de canais de cálcio com administração intravenosa de verapamil.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como Média \pm EPM. Os dados obtidos em todos os protocolos foram submetidos a ANOVA (One Way), e os dados de vasorrelaxamento foram submetidos ao teste de análise não linear, seguido de pós teste de Nolin Fit e Unpaired T student, pós teste de Tuckey. Os valores de pD₂

(Logarítmico negativo da concentração que promove 50% da resposta máxima) foram obtidos através de regressões não-lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas obtidas pelas substâncias testadas para os experimentos *in vitro*. Em todos os testes a significância foi de 5% (*p<0,05). Para toda a confecção dos gráficos e análises utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prims® 8.0.

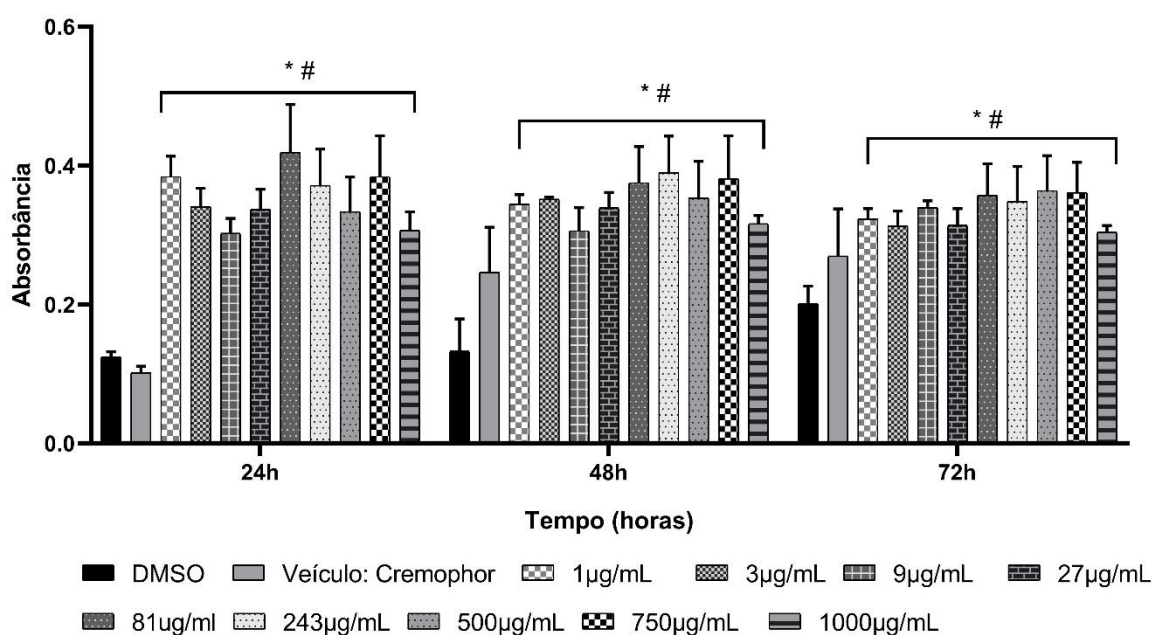
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da citotoxicidade da F.A.R.A pelo teste de MTT

As concentrações testadas de 1 até 1000 µg/mL mostraram alta viabilidade celular em que foi possível observar através da absorbância celular aumentada. As concentrações de 81, 243, 500 e 750 µg/mL expressaram maior absorbância (0.355, 0.358, 0.363 e 0.361nm respectivamente) após 72h (FIGURA 14).

FIGURA 14: Efeito da F.A.R.A sobre a viabilidade celular em células tronco mesenquimais.

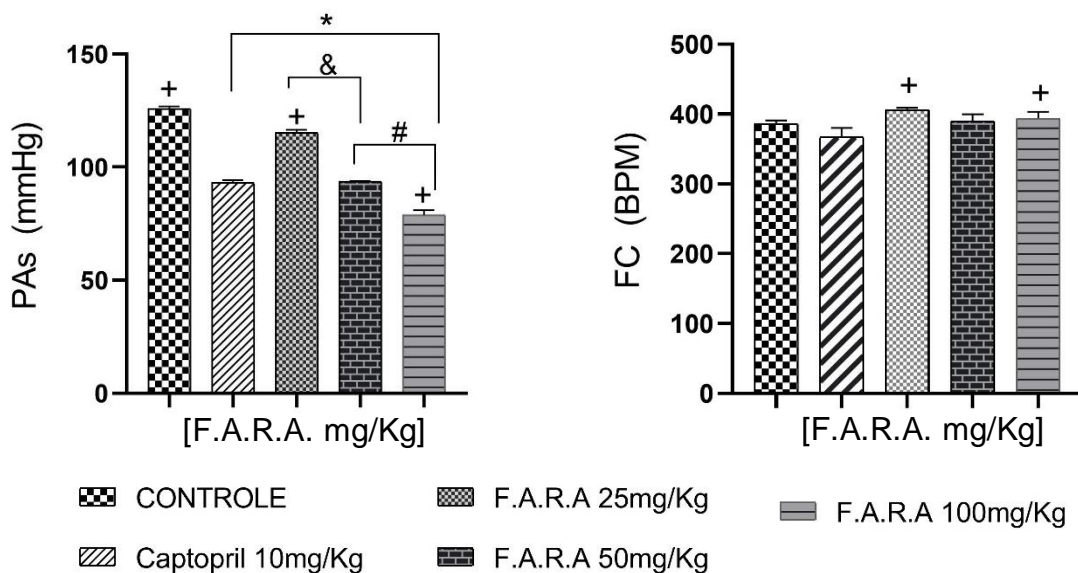


Experimento realizado em triplicata com análise de variância One-way ANOVA. *p<0.05 vs DMSO; #p<0.05 vs Cremophor.

5.2 Avaliação da F.A.R.A sobre a pressão arterial sistólica de ratos normotensos

Os valores de aferição da pressão sistólica foram de: 115; 94; 79 mmHg para os animais tratados com as doses de 25 50 e 100mg/Kg respectivamente, e 126; 93mmHg para os grupos controle e captopril 10mg/Kg nessa ordem. A frequência cardíaca dos animais foi de 386 bpm para o grupo controle; 367 bpm para o grupo captopril; 406; 390 e 393bpm para os animais tratados com as doses de 25, 50 e 100mg/Kg respectivamente sem alterações significativas com o grupo controle (FIGURA 15).

FIGURA 15: Efeito da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de animais normotensos.

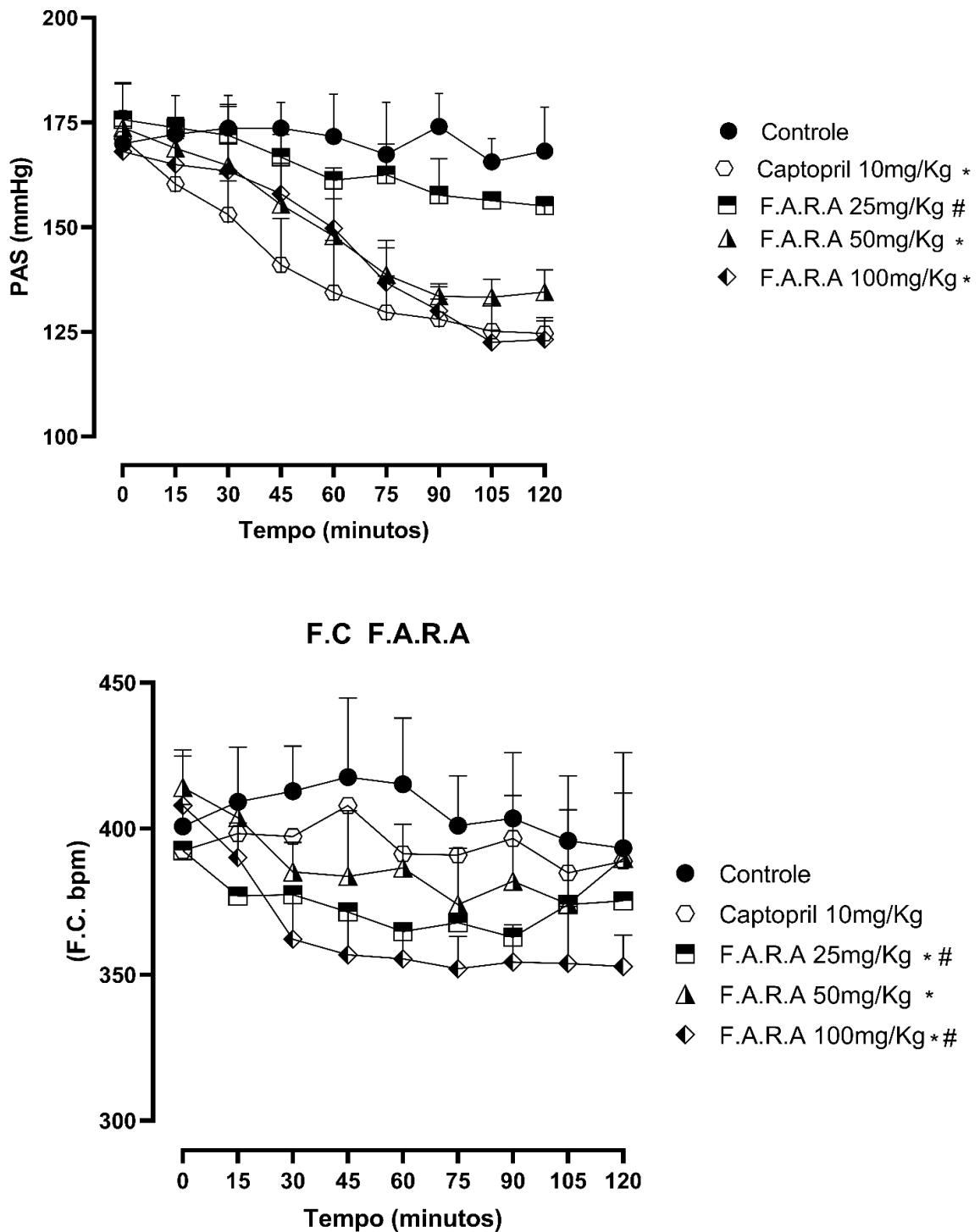


One-way ANOVA. * $p < 0.05$ vs controle; + $p < 0.05$ vs Captopril; # $p < 0.05$ vs 25mg/Kg; & $p < 0.05$ vs 100mg/Kg. CONTROLE = Cremophor 1% + salina.

5.3 Avaliação da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica de ratos hipertensos SHR.

Na FIGURA 16 são apresentados os valores médios da PAS e FC em ratos hipertensos (SHR) após administração da F.A.R.A. Os valores médios de pressão arterial sistólica foram de: 168 mmHg para o grupo controle; 125 mmHg para o grupo captopril (10mg/Kg) e 155; 134 e 123mmHg para os animais tratados com as doses de 25, 50 e 100mg/Kg respectivamente. Os valores obtidos para as aferições da frequência cardíaca foram de 393bpm para o grupo controle; 389bpm para o grupo captopril; 375; 390; 353bpm para os animais tratados com as doses da fração de 25, 50 e 100mg/Kg respectivamente.

FIGURA16: Efeito da F.A.R.A. sobre a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de animais espontaneamente hipertensos.



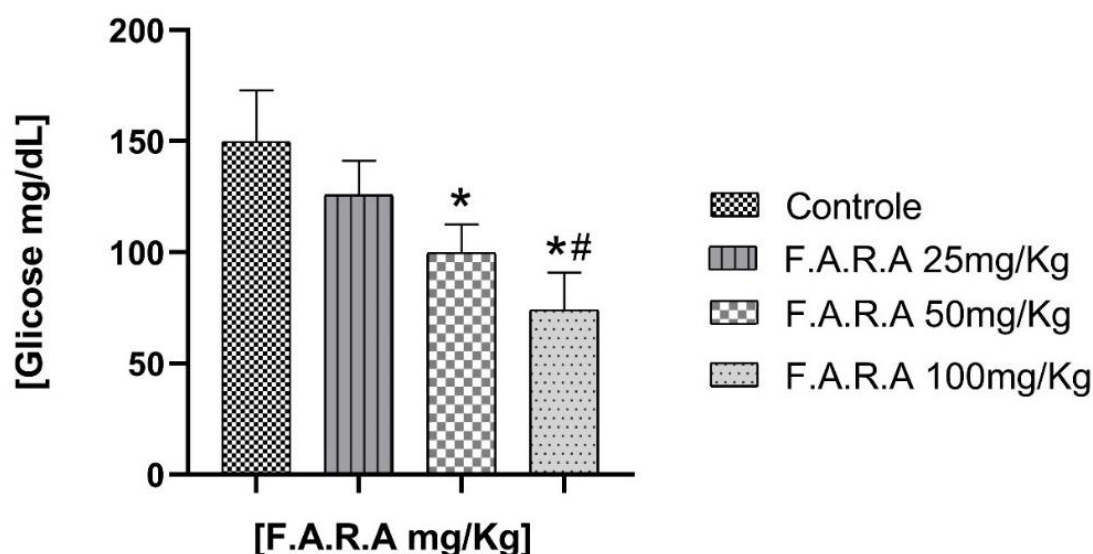
One-way ANOVA. * $p < 0.05$ vs controle; # $p < 0.05$ vs captopril.

CONTROLE = Cremophor 1% + salina.

5.4 Verificação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em modelos animais normotensos Wistar.

Os valores obtidos após administração da F.A.R.A. indicaram que o índice de glicose dos animais [149,75 mg/dL] (grupo controle) foi reduzido nas doses de 25 mg/Kg [125,80 mg/dL], 50 mg/Kg [99,80 mg/dL] e 100 mg/Kg [74,00 mg/dL] (FIGURA 17).

FIGURA 17: Avaliação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em animais normotensos (Wistar) (n=6).

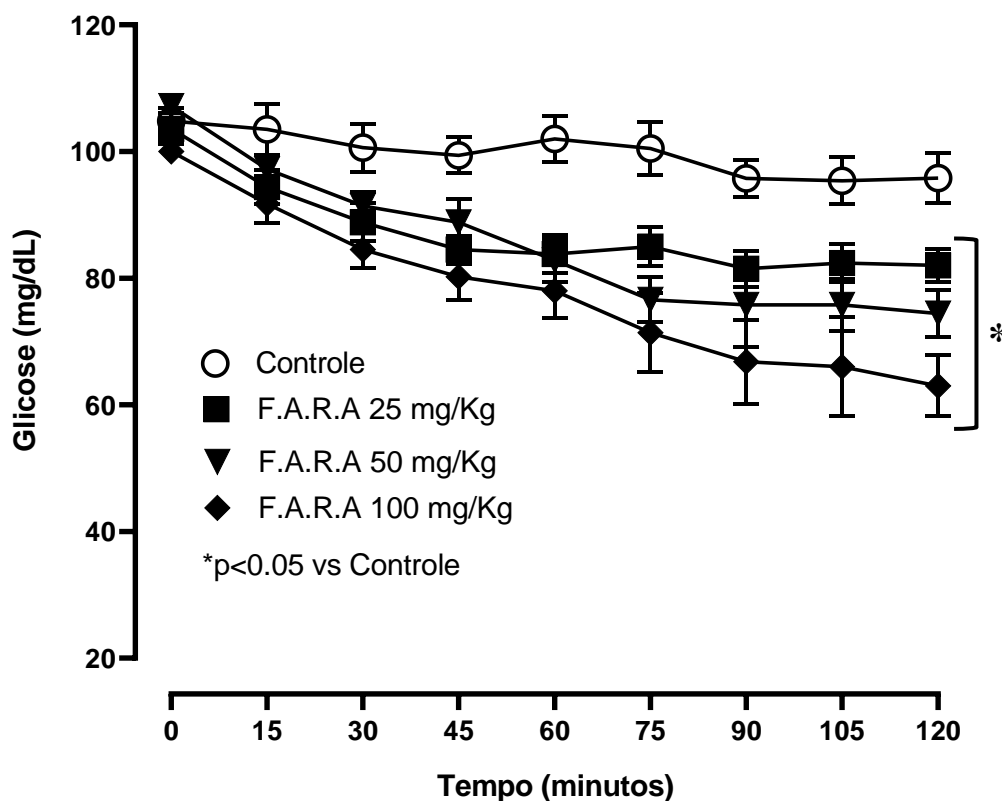


One-Way ANOVA * $p < 0.05$ vs controle; # $p < 0.05$ vs 25 mg/Kg. CONTROLE = Cremophor 1% + salina.

5.5 Verificação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em modelos animais hipertensos SHR.

No tratamento realizado em animais hipertensos, após administração da fração, o índice glicêmico dos animais [96,00 mg/dL] (grupo controle) foi reduzido nas doses de 25 mg/Kg [82,00mg/dL]; 50 mg/Kg [74,4 mg/dL] e 100 mg/Kg [63,00 mg/dL] (FIGURA 18).

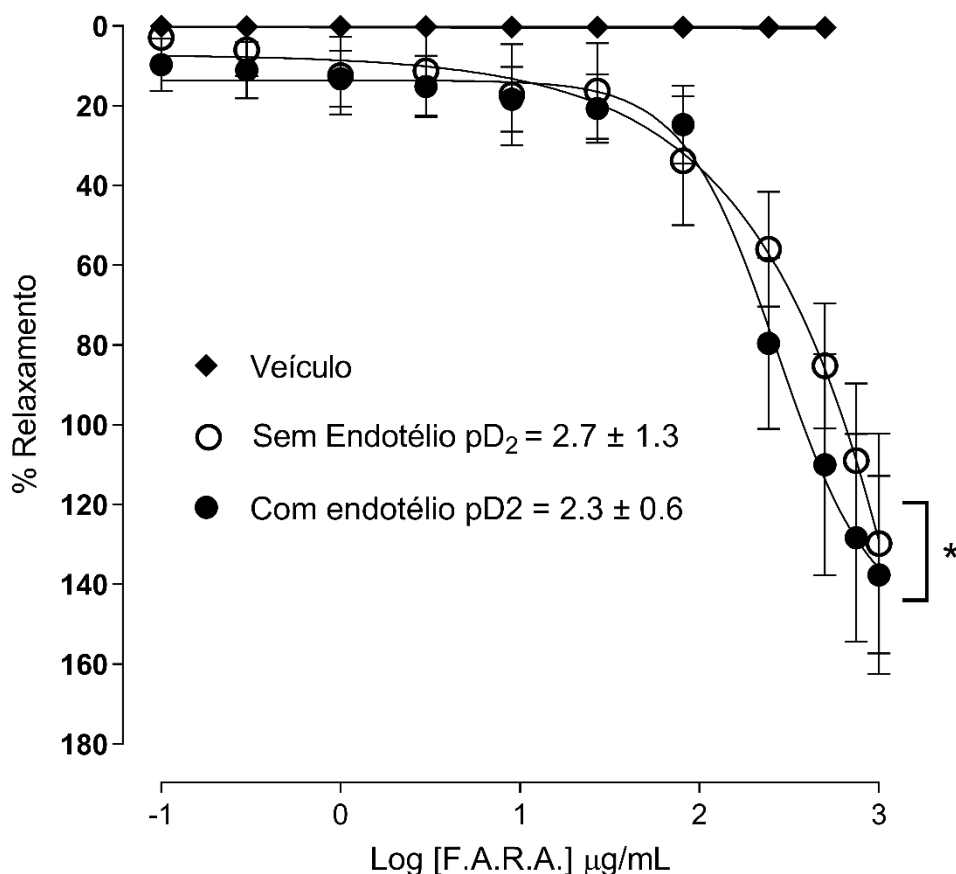
FIGURA 18: Avaliação do efeito hipoglicemiante da F.A.R.A. em animais espontaneamente hipertensos (n=6). One-Way ANOVA *p<0.05 vs controle.



5.6 Verificação do efeito da F.A.R.A. no vasorrelaxamento em anéis de artéria aorta torácica de ratas espontaneamente hipertensas.

A F.A.R.A. exibiu efeito vasorrelaxante dependente de concentração por inibir as contrações tônicas induzidas por FEN 10^{-6} M na presença ($pD_2 = 2.3 \pm 0,6$) e na ausência ($pD_2 = 2.7 \pm 1,3$) de endotélio funcional (FIGURA 17), sem diferença estatisticamente significativa entre esses valores. O valor de E_{max} para preparações sem endotélio vascular foi de ($129,73 \pm 27,52$ %) e para preparações com endotélio vascular foi de ($137,54 \pm 24,66$ %) (FIGURA 19).

FIGURA 19: Curva concentração resposta da Fração Ácida de Resina Almecega em anéis de aorta torácica com e sem a presença do endotélio vascular (n=6). Análise de regressão não linear, teste de Nolin fit. * $p < 0.05$ vs veículo.



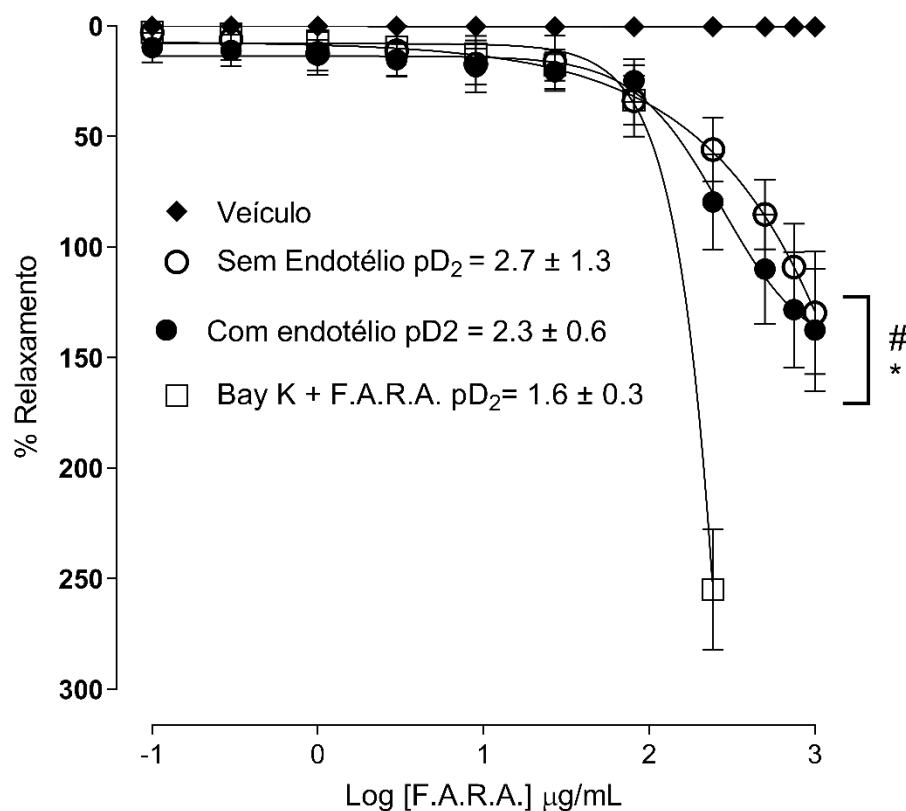
5.7 Efeito da F.A.R.A. sobre contrações induzidas por S(-) - Bay K 8644 em anéis de artéria aorta de ratas SHR.

A FIGURA 20 representa o registro original do vasorrelaxamento induzido pela fração ácida. A F.A.R.A. [243 $\mu\text{g/mL}$], induziu efeito vasorrelaxante dependente de concentração na ação contracturante por Bay K8444 ($pD_2 = 1.6 \pm 0,3$) E_{max} 254,79 \pm 27,9 (FIGURA 21).

FIGURA 20: Registro original do efeito da F.A.R.A. sobre contração induzida por KCl 20mM e Bay K 8644 em artéria aorta na ausência de endotélio vascular. Δ reversão = 0,32g/f. Fen= Fenilefrina; Ach= Acetilcolina, 0.1;1;3;9;81;243= concentrações da F.A.R.A. escala com barrinho grama força em porcentagem o delta e a escala de tempo

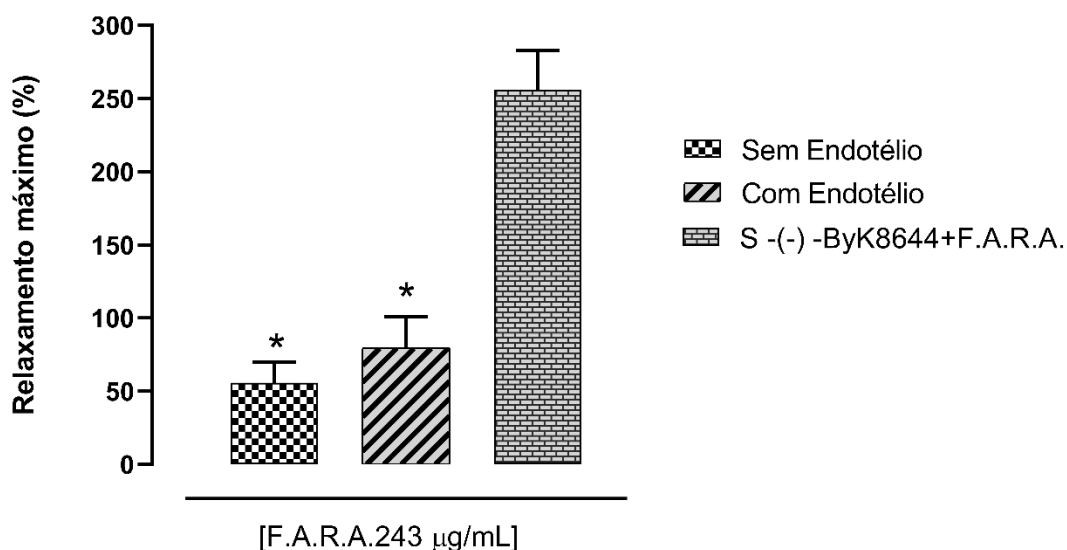


FIGURA 21: Efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. em anéis de aorta torácica com contração induzida por Bay K 8644 (n=5). Análise estatística One-Way ANOVA seguida de pós teste de Tuckey, n=5. * $p < 0.05$ vs veículo, # $p < 0.05$ vs Bay K8644.



A FIGURA 22 representa o efeito máximo relaxante da F.A.R.A. na concentração de 243 μ g/mL em anéis aórticos na ausência e presença do endotélio vascular. O índice de relaxamento foi maior (>200%) em comparação aos resultados na presença do endotélio (79,50%) e ausência do endotélio vascular (58,89%).

FIGURA 22: Relaxamento máximo da Fração Ácida da Resina de Almécega em anéis de aorta (n=5). Análise estatística One- Way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni, n=5. *p<0.01 vs Bay K.



5.8 Verificação da participação dos canais de potássio na resposta vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A.

A FIGURA 23 traz o registro original do efeito vasorrelaxante induzido pela fração na presença do bloqueador TEA 3 mM. Efeito vasorrelaxante mediado em aproximadamente 80 minutos após administração da F.A.R.A. A comparação entre o tempo de relaxamento induzido pela fração na presença e ausência do TEA é representado na FIGURA 24. Na ausência do bloqueador o efeito vasorrelaxante foi alcançado em aproximadamente 30 minutos, na presença do TEA o efeito vasorrelaxante foi obtido em aproximadamente 80 minutos.

Na figura 25 é representado a porcentagem de relaxamento induzida pela F.A.R.A. ($E_{max} = 116,83 \pm 7,2$) na presença de Tetraetilamônio ($E_{max} = 97,87 \pm 3,2$).

FIGURA 23: Registro original do efeito da F.A.R.A. após contração induzida por Fenilefrina na presença de TEA 3mM. Δ reversão = 0,40g/f. Fen= Fenilefrina; Ach= Acetilcolina, 243= concentração da F.A.R.A.

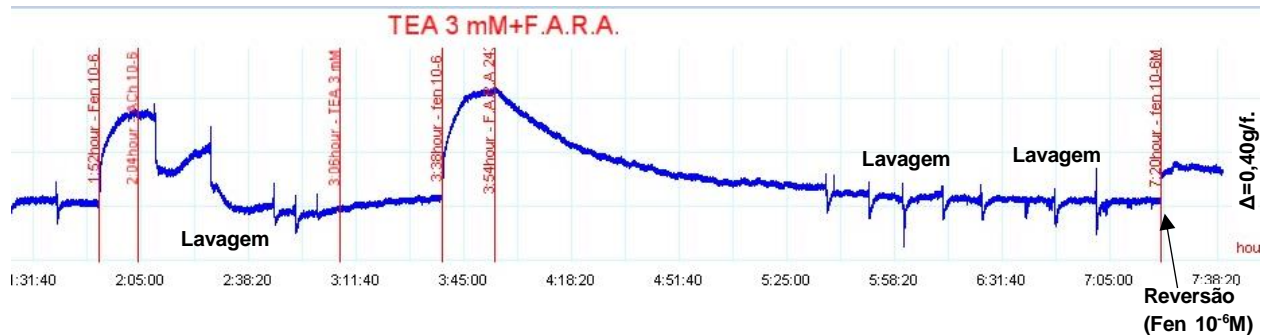


FIGURA 24: Registro original com escala de tempo do efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. na ausência (A) e na presença de TEA 3mM (B).

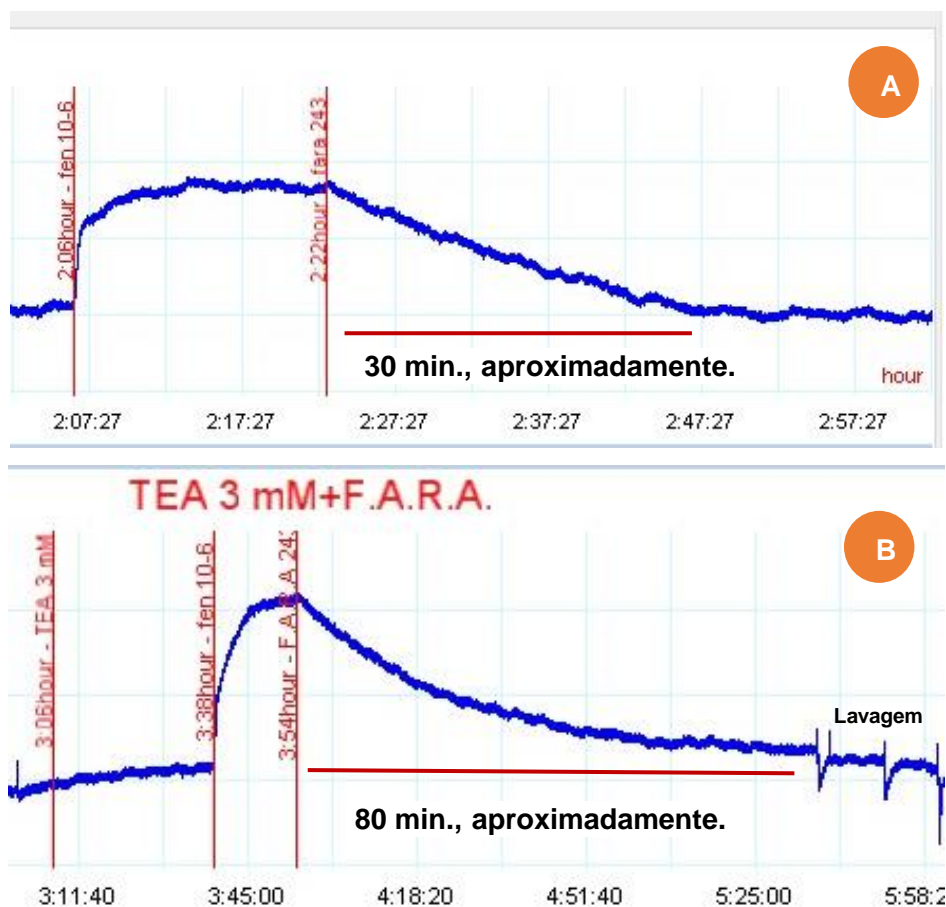
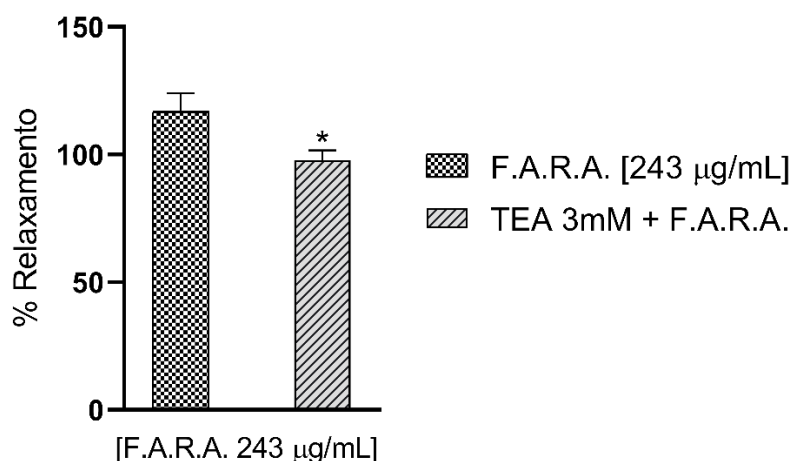


FIGURA 25: Porcentagem de relaxamento induzida pela F.A.R.A. na presença de TEA 3mM (n=4). Análise estatística Unpaired T Test. * $p < 0.01$ vs F.A.R.A. [243 $\mu\text{g}/\text{mL}$].



5.9 Análises *in silico*

5.9.1 - Modelagem comparativa da estrutura proteica do Ca_vL .

A sobreposição entre o modelo da proteína e o construído está representado na FIGURA 26. O modelo por homologia revelou identidade sequencial equivalente a 1544 aminoácidos em comparação a proteína molde, com uma distância de aproximadamente 0,117 angstroms entre as sobreposições das proteínas. A FIGURA 27 exhibe um gráfico de Ramachandran para determinar os resíduos de aminoácidos presentes nas regiões energeticamente mais e menos favoráveis, resultando em uma similaridade de 85,6% com a molécula utilizada como molde.

FIGURA 26: Estrutura 3D representando a sobreposição entre a estrutura de Ca_vL modelada (cor amarela) e o modelo molde obtido da base de dados (cor azul).

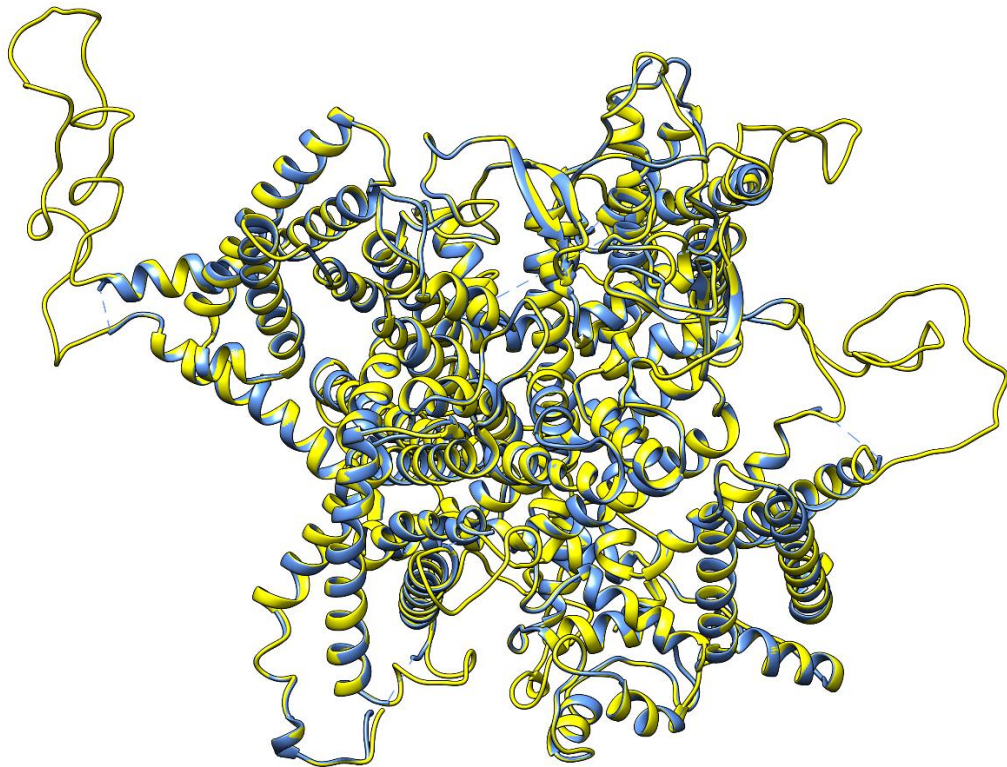
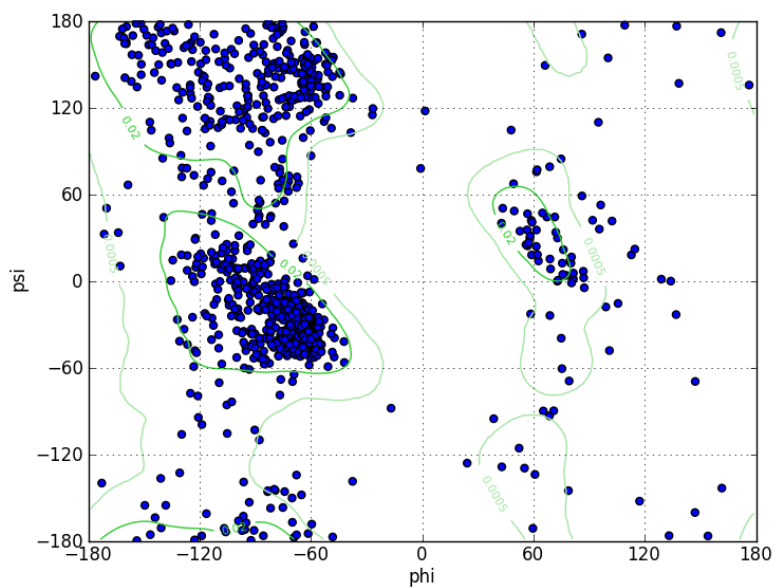


FIGURA 27: Gráfico de Ramachandran obtido para o CavL construído no Prime.



5.9.2 Ancoragem molecular

Na FIGURA 28 está representado a interação do ácido β - elemônico com a estrutura modelada do CavL. A molécula obteve interações com aminoácidos localizados próximos ao sítio ativo da proteína (CavL), ligando-se a Tyr 742 próximo a Asn 743, Asn 741 próximo a Asn 740; Leu 397 próximo a Asn 398 e Phe 737 próximo a Glu 706 com afinidade -10.7 kcal/mol. A FIGURA 29 representa a estrutura 3D do ácido β - elemônico com o canal de cálcio, evidenciando a ligação fora o sítio ativo da proteína.

FIGURA 28: Estrutura 2D representando a ligação do ácido β -elemônico com os aminoácidos constituintes da proteína molde. Em destaque aminoácidos do sítio ativo (vermelho) e em destaque (azul) aminoácidos de interação localizados próximo ao sítio ativo.

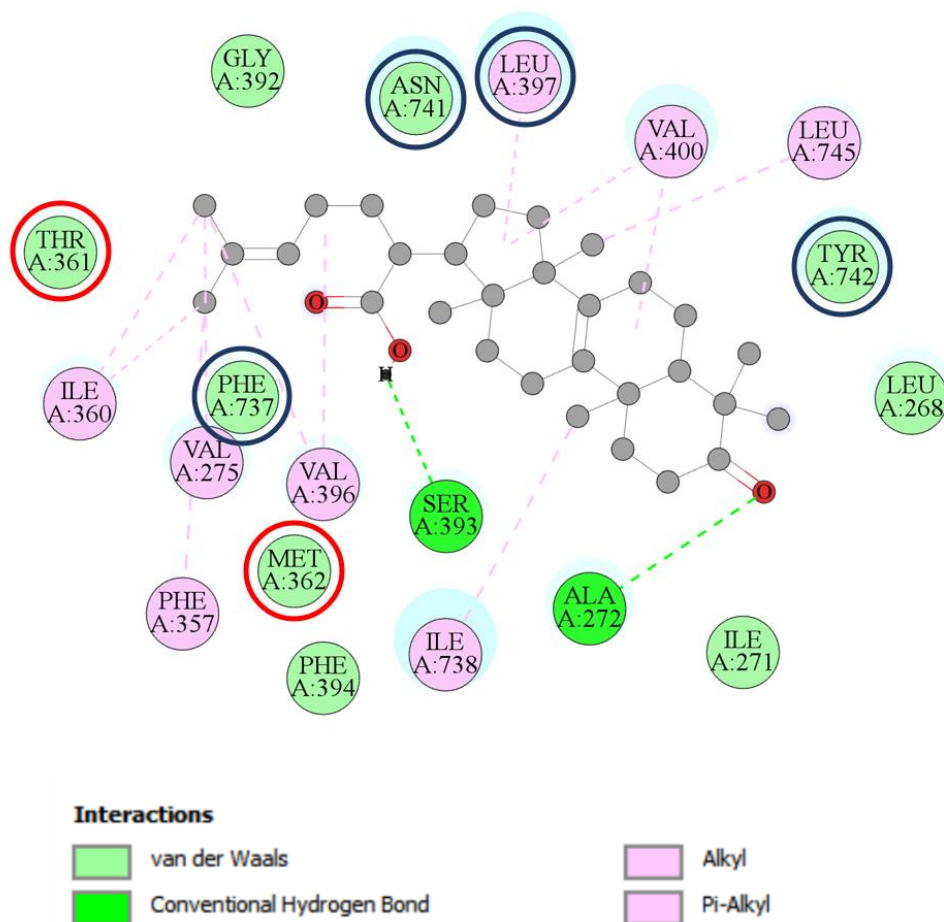
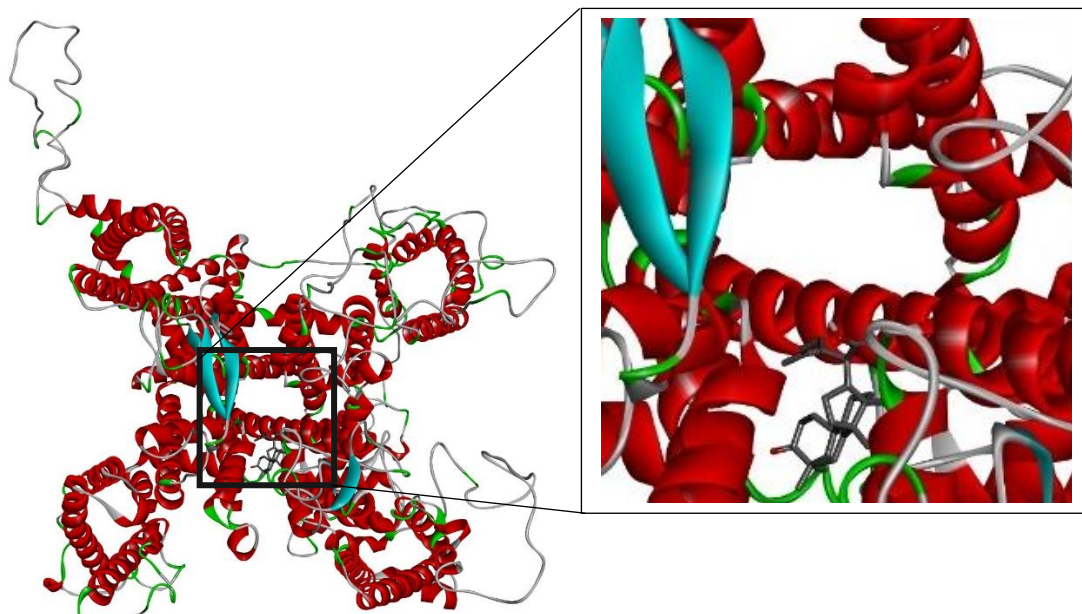


FIGURA 29: Estrutura 3D representando a ligação do ácido β -elemônico fora do sítio ativo do CavL modelado.



Na FIGURA 30 é representada a interação 2D do verapamil (controle positivo) com o CavL com afinidade -7.6 kcal/mol. A interação do ligante com a proteína (CavL) não foi evidenciada dentro do sítio ativo, porém próximo a ele. Interagindo com os aminoácidos próximos ao sítio ativo, Val 400, Tyr 742 próximo a Asn 740, Ala 272, Ile 738 e Ile 360 próximo a Thr 361.

A FIGURA 31 representa o gráfico de energia livre de interação entre os ligantes (verapamil e ácido β -elemônico) com a proteína CavL.

FIGURA 30: Estrutura 2D representando a ligação do verapamil com CavL modelado. Em destaque (azul) aminoácidos próximos ao sítio ativo, em destaque (vermelho) aminoácidos presentes no sítio ativo.

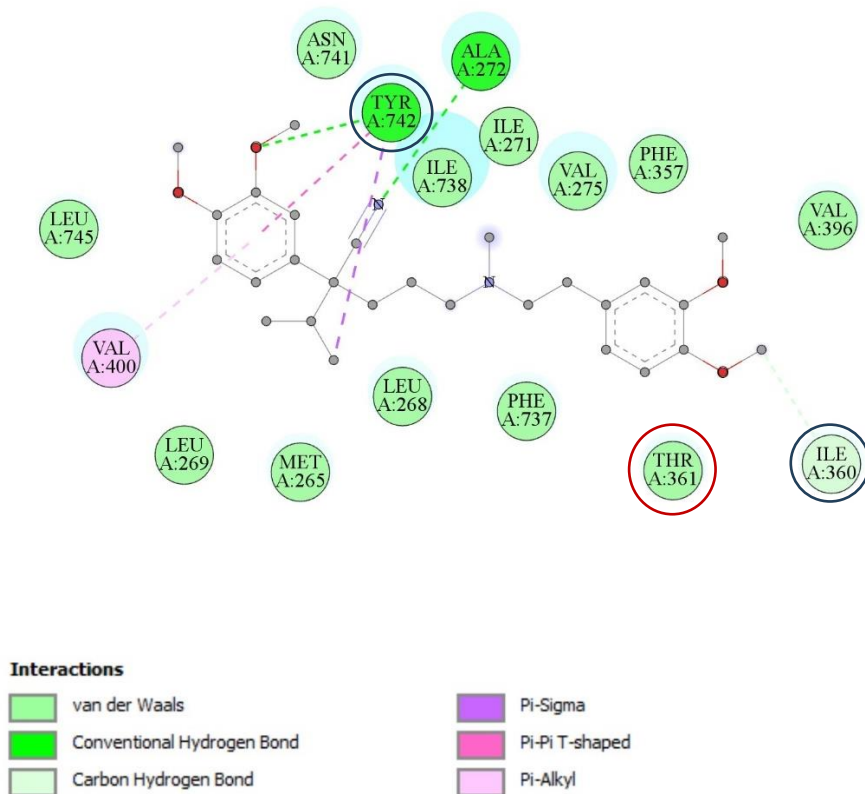
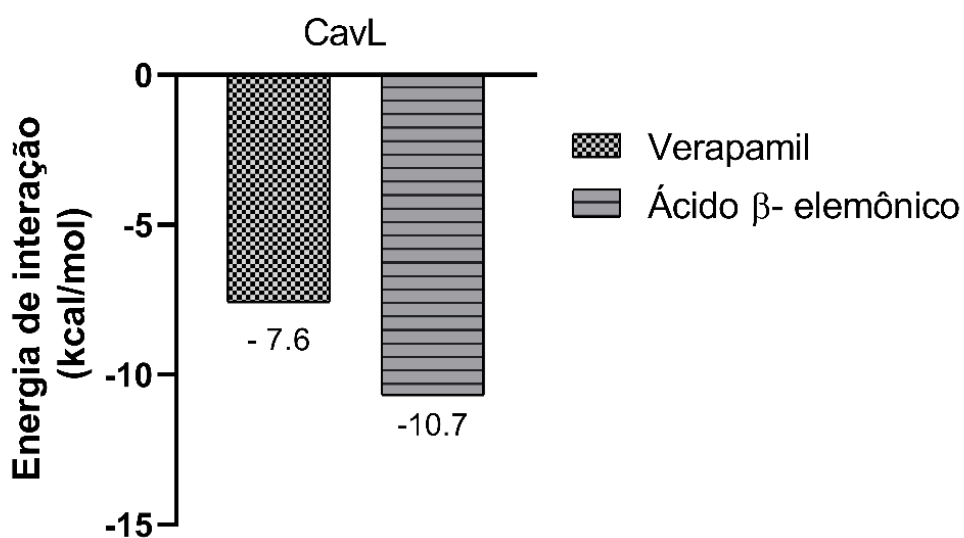


FIGURA 31: Energia livre de interação dos ligantes verapamil e ácido β -elemônico em CavL.



Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observado que a fração ácida obtida da resina de Almécega possui efeito sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos, provavelmente pelo envolvimento de canais de cálcio em consequência de um vasorrelaxamento dependente de concentração com possível participação de canais de potássio. Os resultados obtidos com este estudo demonstraram ainda que a fração tem ação hipoglicemiante reduzindo os níveis de glicose sanguínea de maneira dose dependente, não apresentou toxicidade a nível celular e obteve boa interação entre seu constituinte majoritário e os aminoácidos da proteína alvo.

Para investigar o possível efeito citotóxico da F.A.R.A. foi empregado o método colorimétrico do MTT comumente empregado para avaliar a viabilidade celular, permitindo análises quantitativas e comparativas da proliferação celular em novas substâncias ou fármacos (Costa, 2023; Chang *et al.*, 2023).

Assim, investigou-se o impacto da F.A.R.A. em células-tronco mesenquimais. Os resultados demonstram que não houve evidência de citotoxicidade nos diferentes períodos de incubação da fração (FIGURA 14). Observou-se ainda que a taxa média de viabilidade celular foi maior nas concentrações de 81 a 750 µg/mL uma vez que expressaram maior absorvância após o intervalo de tempo teste, 72 horas, em contato com a fração ácida, período esse que as células apresentaram um aumento progressivo na sua viabilidade.

As MSCs (células-tronco mesenquimais), são células multipotentes que podem ser derivadas da medula óssea e do tecido adiposo apresentando capacidade de se diferenciar em vários outros tipos de células, incluindo cardiomiócitos e células endoteliais. São caracterizadas pela capacidade de autorrenovação, diferenciação e reconstituição funcional de determinados tecidos inclusive o cardíaco (Alves *et al.*, 2019).

O MTT pode ser utilizado em MSCs para avaliar as suas diretrizes e critérios em resposta a diversas condições de cultivo, tratamentos ou estímulos. Isso é importante em estudos de pesquisa para compreender como essas células reagem às alterações ambientais, testar a eficácia de compostos ou terapias nessa linhagem celular e também verificar a sua vitalidade durante o cultivo em exposição a determinadas substâncias (Costa, 2023).

As MSCs possuem efeitos benéficos no tratamento das DCVs, apresentando redução de lesão tecidual em infarto do miocárdio (IM), arritmias, doenças arteriais coronarianas (DAC) e aterosclerose. Além disso, essas células exercem ainda atividade relacionada a síntese de novos vasos sanguíneos (angiogênese), reduzindo a fibrose e promovendo remodelação miocárdica principalmente após o infarto do miocárdio (Nogueira *et al.*, 2023).

Em nosso grupo de pesquisa Mendes (2019) realizou o ensaio de MTT em células de macrófagos de murinos com o óleo essencial obtido de *Protium heptaphyllum*. Os resultados obtidos demonstram que em 24 horas as concentrações de 100 a 800 µg/mL demonstraram interferência na viabilidade celular e diminuição da atividade mitocondrial, sendo consideradas moderadamente citotóxicas. O que não foi evidenciado no ensaio de MTT realizado com a fração ácida da resina de Almécega.

Em ensaio de MTT Lima (2014), utilizou uma linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) para avaliar o potencial citotóxico da resina obtida de *Protium heptaphyllum* e seus terpenos constituintes. Foi observado em seu estudo que a resina apresentou, substâncias triterpênicas associadas a atividade citotóxica em frações enriquecidas com α - e β -amirina. Além disso, verificou-se a atividade pro-apoptótica, aumento da atividade da caspase-3 e diminuição nos níveis de TNF- α e da ECA após tratamento com a resina e suas frações.

Ademais, Melo (2017) evidenciou que na amostra trabalhada em seu estudo a mistura de triterpenos α,β -amirina foi o principal constituinte da resina de *Protium heptaphyllum* (almecegueira). O efeito da α,β -amirina sobre a viabilidade em linhagem de células de fibroblastos de camundongo (células 3T3-L1) foi avaliado pelo método MTT. As células foram incubadas com α,β -amirina em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL por um período de 24). O teste do MTT mostrou que apenas concentrações mais altas de α,β -amirina, 200 e 400 µg/mL, causaram redução na viabilidade das células.

Esses resultados divergem dos achados realizados nesta pesquisa, em que não houve a presença de efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, podendo ser justificado devido a particularidade de a fração estudada ser constituída por Triterpenos ácidos em que a presença desses compostos é influenciada por determinadas condições da vida do vegetal. As plantas estão constantemente sujeitas

a influências bióticas e abióticas dentro do ambiente natural. Os bióticos podem incluir: competição por recursos (nutrientes e espaço para crescer) interferência de outras plantas ou interações com animais (principalmente na polinização por insetos ou pássaros); os abióticos podem incluir: temperatura, umidade, disponibilidade água no solo e luz solar. Juntos esses fatores são fundamentais para o crescimento saudável do vegetal e influenciam diretamente a síntese de metabolitos secundários (Alba, 2019; Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

Os metabolitos secundários mais abundantes em angiospermas são os terpenos. Existem mais de 55.000 moléculas de terpenos identificadas, tornando-os uma das maiores e mais diversas classes de produtos naturais conhecidos. Eles são amplamente distribuídos na natureza e desempenham papéis fundamentais em muitos processos biológicos (Borges; Amorim, 2020).

De fato, essas moléculas apresentam diversas atividades associadas ao sistema digestório, inflamatório, atividade antitumoral, efeito hipoglicemiante, hipolipemiante e ações sobre o sistema cardiovascular como: vasorrelaxamento, diminuição da frequência cardíaca e hipotensão. Assim, muitas plantas possuem compostos que exercem uma grande atividade farmacológica associada ao sistema cardiovascular (Saljoughian *et al.*, 2018).

Após triagem com testes citotóxicos, que descartaram o possível efeito lesivo da F.A.R.A. a nível celular, buscou-se avaliar as propriedades farmacológicas da mesma sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em modelos animais diferentes (normotensos e hipertensos).

Neste estudo foram comparados os efeitos da fração ácida da resina de almécega em animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), em relação à pressão arterial sistólica (PAS) e à frequência cardíaca (FC). O captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, ECA, (Ribeiro; Albergaria 2021) foi utilizado como controle, uma vez que, Lima (2014) demonstrou em seu estudo que o uso da resina da Almécega tem atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina.

Nos animais normotensos, a fração apresentou um efeito hipotensor, dose-dependente, em comparação com o grupo controle (salina) e o grupo tratado com captopril. As doses de 50 mg/kg e 100mg/kg da fração reduziram significativamente a pressão arterial sistólica em comparação com o grupo controle, sendo que a dose de

50 mg/Kg demonstrou uma resposta semelhante à administração do captopril 10 mg/Kg; já a dose de 100 mg/kg da fração teve uma atenuação mais evidente, sugerindo um efeito hipotensor maior nessa dose específica. Na verificação dos efeitos da F.A.R.A. sobre a frequência cardíaca não houveram diferenças entre os grupos tratados com os grupos controle e captopril (FIGURA 15). Esses resultados serviram para demonstrar que além de apresentar efeito hipotensor, o metabolismo de primeira passagem não inibe a ação dos terpenos constituintes da fração, desencadeando uma resposta hipotensora, permitindo inferir ainda que determinadas doses da F.A.R.A. ao atuarem sobre esses parâmetros cardiovasculares (PAS e FC) apresentam uma resposta comparável ao fármaco padrão (captopril) em reduzir a pressão arterial.

A regulação da pressão arterial é um processo que envolve mecanismos fisiológicos em que a pressão arterial é controlada por uma série de sistemas e processos, incluindo o fluxo sanguíneo, a resistência dos vasos periféricos, modulação do tônus vascular, sistema nervoso e também a participação do rim.

O rim desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial, por meio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Nesse sistema a enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha um papel regulador da pressão arterial. Ela está presente na superfície vascular e sua atividade ocasiona vasoconstrição através da síntese de angiotensina II. Porém a presença de alterações (como aumento da atividade da ECA ou fatores genéticos) nesse sistema podem gerar desequilíbrios levando a consequências como a hipertensão arterial (Silva, 2021).

Neste estudo os resultados evidenciaram que a fração ácida da resina de almécega (F.A.R.A) teve um efeito atenuante sobre os índices pressóricos dos animais hipertensos (SHR), sendo que a dose de 25 mg/kg mostrou uma breve redução da pressão arterial quando comparada ao grupo controle que recebeu apenas o veículo. Além disso, as doses de 50 e 100 mg/kg tiveram uma resposta semelhante ao efeito do captopril na dose administrada, sugerindo que essas doses da F.A.R.A. tiveram um efeito comparável ao do fármaco em termos de redução da pressão arterial (FIGURA 16).

A avaliação em modelos SHR revelou ainda que a fração promoveu uma redução na frequência cardíaca (efeito bradicárdico) em todas as doses testadas (FIGURA 16). Além disso, observou-se que a dose de 25 mg/kg apresentou uma

resposta bradicárdica maior quando comparada à dose de 50 mg/kg, e obtendo uma resposta semelhante à dose de 100 mg/kg em termos de redução da frequência cardíaca.

Esses resultados sugerem que a fração ácida tem um efeito bradicárdico que não é diretamente proporcional à dose administrada em modelos hipertensos. Assim, a dose mais baixa (25 mg/kg) foi mais eficaz na redução da frequência cardíaca do que a dose intermediária (50 mg/kg), mostrando uma relação não linear entre a dose administrada e o efeito observado na frequência cardíaca. Essa informação é relevante para compreender como diferentes doses da F.A.R.A. afetam a frequência cardíaca e pode ser útil para estabelecer doses terapeuticamente eficazes para reduzir a frequência cardíaca em contextos específicos, como em modelos animais com hipertensão arterial. Ademais, em nosso grupo de estudo Nunes (2018) ao realizar testes com o monoterpeneo α -terpineol (um terpeno presente no óleo essencial de *P. heptaphyllum* (Mendes, 2019) evidenciou que o mesmo apresentou efeitos hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos com a possível participação de receptores muscarínicos, bem como efeito anti-hipertensivo em modelos animais hipertensos do tipo L-NAME.

É importante destacar que ao se trabalhar com produtos naturais, extratos ou frações, os efeitos terapêuticos de uma substância não podem ser atribuídos apenas aos seus constituintes majoritários. Muitas vezes, compostos presentes em menor proporção, podem desempenhar papéis significativos nos efeitos observados (o que pode justificar melhor o efeito bradicárdico maior na dose de 25mg/Kg). Assim, é importante salientar que a combinação de vários compostos em uma substância ou fração pode produzir efeitos que não seriam alcançados por nenhum desses componentes se administrados isoladamente (sinergismo). Dessa maneira a interação entre esses constituintes de metabolitos secundários de plantas é comum em óleos essenciais, extratos vegetais e outras substâncias obtidas de espécies vegetais (Bandoni, 2008; Montanari, 2010).

A hipertensão é responsável por ocasionar uma série de danos sobre o sistema cardiovascular (aterosclerose, aneurisma, acidente vascular cerebral, sobrecarga renal) e a existência de métodos que possam amenizar de forma significativa esses danos são de importante relevância e amplamente buscadas (Gralak; Marra, 2020).

As plantas medicinais têm desempenhado um papel importante na saúde e no bem-estar das pessoas, possuindo ligação com o modo de vida da população oferecendo uma abordagem natural e mais acessível para o tratamento de várias condições de saúde. Além disso, as plantas medicinais fornecem uma alternativa aos medicamentos convencionais, o que pode ser especialmente significativo em áreas onde o acesso a cuidados de saúde é limitado (Badke Mr *et al.*, 2019).

Assim, é justificável buscar ações de plantas medicinais e seus potenciais benefícios para doenças do sistema cardiovascular como alternativas terapêuticas. Estudos sobre plantas medicinais têm demonstrado alguns efeitos positivos em condições cardiovasculares incluindo a redução da pressão arterial e a melhoria da saúde do coração (Alves; Mattos, 2021; Romana, 2022; Baratieri *et al.*, 2023). Essas pesquisas exploram o potencial das plantas medicinais como uma abordagem complementar ou alternativa no manejo da hipertensão que pode apresentar-se associada a outras doenças.

A hipertensão arterial e o elevado nível de glicose no sangue, frequentemente observados em indivíduos com diabetes, tendem a agir de forma sinérgica, aumentando os perigos associados à saúde. De forma geral a diabetes não controlada, pode afetar órgãos como rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. O controle adequado da pressão arterial e dos níveis de glicose sanguínea são essenciais para reduzir esses riscos e evitar possíveis complicações (Duarte *et al.*, 2023).

A presença simultânea da hipertensão e diabetes mellitus potencializa significativamente os riscos de complicações vasculares refletindo na saúde cardiovascular. Essa associação aumenta o risco de mortalidade cardiovascular (morte relacionada a problemas do coração e vasos sanguíneos), doença coronariana (como angina e infarto do miocárdio), insuficiência cardíaca congestiva (incapacidade do coração bombear sangue suficiente para o resto do corpo), doença cerebrovascular (como acidente vascular cerebral - AVC) e doença vascular periférica (circulação nos membros inferiores) (Capeletti; Salla, 2016).

As complicações da vasculatura são uma das principais causas de mortalidade em pacientes com diabetes podendo levar a ataques cardíacos, AVC, doença renal e amputações nos membros inferiores devido a síndrome do pé diabético (Correia *et al.*,

2022). A ausência ou controle da hipertensão estão associadas a melhores estimativas de vida e a um aumento na sobrevivência de indivíduos diabéticos.

A redução significativa das concentrações glicêmicas, após a administração das doses da F.A.R.A., em comparação com o grupo controle, destaca o efeito hipoglicemiante de maneira dose dependente da fração testada em ratos Wistar (FIGURA 17).

Na avaliação da concentração glicêmica em animais SHR a F.A.R.A. apresentou atenuação dos valores basais a partir dos 15 primeiros minutos após administração, efeito que se manteve até os 60 minutos. A partir de 75 minutos a mesma promoveu redução dos índices glicêmicos dos animais de maneira dose dependente, semelhante com o resultado encontrado em animais normotensos, entretanto em um intervalo de tempo maior (FIGURA 18). Isso sugere que essa substância pode ter propriedades hipoglicemiantes independentemente do status de hipertensão dos animais, o que é promissor.

Santos e colaboradores (2012) evidenciaram que camundongos tratados com α , β -amirina (isômeros triterpenoides que ocorrem naturalmente em vários oleorresinas de espécies de *Protium* (Burseraceae), 10, 30 e 100 mg/kg, ou glibenclamida (10 mg/kg) reduziram significativamente os aumentos induzidos por estreptozotocina na glicose sanguínea, colesterol total e triglicerídeos séricos. Os resultados evidenciaram que a partir da dose de 100mg/Kg a α , β -amirina apresentaram efeito hipolipidêmico. Além disso, a α , β -amirina reduziram os níveis elevados de glicose no plasma durante o teste oral de tolerância à glicose. No mesmo estudo foi evidenciado ainda que o nível plasmático de insulina e a análise histopatológica do pâncreas revelaram o efeito benéfico da amirinas na preservação da integridade das células beta pancreáticas.

Outro estudo realizado com a espécie *Protium heptaphyllum* com o uso das folhas para obtenção de extrato etanólico bruto (EE) e da fração de acetato de etila (EA) evidenciou que após sete dias de tratamento com o EE e EA os níveis glicêmicos dos animais diminuíram o que pode ser devido a um possível efeito hipoglicemiante da planta, além de apresentar atividade antioxidante no tecido renal, em que a fração EA recuperou a atividade da enzima Glutathione S-Transferase e os níveis de glutathione foram restaurados pelo EE e o EA (Sinhorin *et al.*,2020).

A observação do efeito hipoglicemiante, dose-dependente da F.A.R.A, obtido neste estudo corrobora com demais estudos encontrados na literatura que investigaram o efeito hipoglicemiante da espécie vegetal. A partir disso é demonstrado que ao possuir capacidade de reduzir os níveis de glicose circulante no sangue, a fração pode ser um indicativo positivo no potencial terapêutico da hiperglicemia, especialmente considerando a relação entre diabetes e hipertensão.

Indivíduos diabéticos podem manifestar problemas nos vasos sanguíneos ao longo do tempo. Esse efeito é conhecido como angiopatia diabética. Essa doença pode desencadear alterações em pequenos vasos (microangiopatia) ou em grandes vasos sanguíneos (macroangiopatia), promovendo aterosclerose levando a obstrução dos principais vasos sanguíneos, o que explica o maior risco desses portadores da doença apresentarem complicações cardíacas como a isquemia miocárdica (Aje *et al.*, 2009; Cole; Florez, 2020).

A hipertensão compromete o equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores, aumentando a pressão no interior dos vasos sanguíneos, podendo ocasionar lesões em órgãos vitais como o coração (Ferreira *et al.*, 2017).

De fato, os vasos sanguíneos (veias e artérias) são um dos principais mecanismos de regulação homeostática da pressão arterial, através de ajustes que acontecem de momento a momento em seu diâmetro e da força exercida pela passagem do sangue em seu interior esses órgãos medeiam as diferentes respostas pressóricas em um indivíduo.

A circulação eficiente do fluxo de sangue pelos vasos é fundamental para a manutenção da pressão arterial, é a resistência nos vasos sanguíneos a passagem do sangue que determina a pressão exercida pelas paredes desses vasos (Brito *et al.*, 2021). Quando ocorre uma interrupção na homeostase, podem surgir problemas de pressão arterial (hipertensão ou hipotensão), os quais podem afetar a saúde cardiovascular e outros sistemas do organismo.

Assim, a busca por substâncias que modulem a regulação da atividade dos vasos sanguíneos têm sido objeto de estudo para a criação de novos medicamentos. Pois, o controle da resposta vascular (seja por vasodilatação, vasoconstrição ou inibição de enzimas ou receptores específicos) é essencial para tratar diversos problemas de saúde, tais como hipertensão, doenças cardiovasculares, distúrbios

circulatórios e outras condições em que o fluxo de sangue pode ser comprometido (Teixeira, 2020).

A fim de verificação se o possível efeito anti-hipertensivo e hipotensor da F.A.R.A. seria mediado por uma possível redução da resistência vascular, foram realizados estudos em anéis de artéria aorta torácica de ratas SHR. A fenilefrina foi utilizada como contracturante pois é um agonista dos receptores α 1-adrenérgicos que quando ativados, promovem contração nas células musculares lisas vasculares. Essa sequência de sinalização contrátil está associada a ativação desses receptores que por sua vez ativam a proteína-G, levando a formação de segundos mensageiros como Inositol Trifosfato (IP3) e o Diacilglicerol (DAG). O IP3 atua ativando os canais de cálcio no retículo sarcoplasmático, liberando íons Ca^{2+} para o citoplasma celular. Enquanto isso, o DAG ativa a PKC (proteína cinase C), que, por sua vez, pode ativar outros processos na célula, proporcionando a execução da maquinaria contrátil celular (Llancahuen *et al.*, 2023).

Os anéis também foram incubados com Acetilcolina a fim de verificar a presença do endotélio vascular e verificar se a presença dessa camada celular poderia influenciar na possível resposta vasodilatadora induzida pela F.A.R.A. O papel do óxido nítrico (NO) no endotélio vascular é fundamental na regulação do tônus vascular. Quando as células endoteliais são estimuladas, produzem óxido nítrico, que tem um efeito vasorrelaxante. A produção do NO é mediada por meio das células endoteliais, após ser produzido ele se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas vasculares adjacentes ativando a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) levando ao relaxamento das células musculares lisas (Antão, 2021).

Os resultados obtidos evidenciaram que uma F.A.R.A (induziu vasorrelaxamento em anéis de artéria aorta. Esse efeito relaxamento foi observado tanto nos com endotélio e na ausência do endotélio, FIGURA 19, o que sugere que a ação vasorrelaxante da fração é independente dos fatores de relaxamento derivados do endotélio vascular. Na análise deste efeito relaxante os anéis sem endotélio preservado, obtiveram uma maior pD_2 quando comparados com anéis que apresentavam endotélio, FIGURA 19, sem diferenças que fossem consideradas significativas.

Assim, esses resultados apontam para um possível mecanismo de ação direto da fração sobre o músculo liso vascular envolvendo a utilização de concentrações maiores para uma resposta desejada, sem a necessidade da ação endotelial. De acordo com Chen e colaboradores (2009) um vasodilatador que não depende do endotélio vascular, pode ter vias de ação que afetam o influxo intracelular de cálcio. Tais substâncias podem promover o bloqueio do influxo de Ca²⁺ através dos canais de cálcio presentes na membrana que são vitais para a contração muscular. Um vasodilatador pode bloquear esses canais, impedindo a entrada de cálcio nas células musculares lisas vasculares ou promover a inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares e desencadear a inibição da contração muscular.

O cálcio desempenha um papel crucial na contração das células musculares lisas vasculares. Existem diferentes tipos de canais de cálcio que estão envolvidos na regulação da entrada de cálcio para essas células, sendo dois deles os canais de cálcio tipo L (Ca_vL) e os canais de baixa voltagem tipo T. Os Ca_vL têm um papel significativo na regulação da entrada de cálcio para a contração das células musculares lisas vasculares. Ao serem ativados, permitem a entrada de cálcio nas células lisas, desempenhando um papel importante na vasoconstrição ao aumentar a concentração intracelular de cálcio, o que leva à contração dessas células. Já os canais de baixa voltagem, tipo T, também estão envolvidos na entrada de cálcio nas células musculares lisas vasculares, porém com maior significância nos vasos renais (Cribbs, 2006; Lozano et al., 2020; Silva et al., 2022).

Dessa forma, após verificar que o efeito vasorrelaxante da fração é independente do endotélio vascular e de seus produtos foi verificado se a F.A.R.A. possui efeito direto sobre esses canais (Ca_vL), influenciando o influxo de cálcio. Para isso foi utilizado como agonista desses canais o S-(-)-Bay K8644 conhecido por ser um agonista dos canais de cálcio do tipo L (Ca_vL). Esses canais são importantes na regulação do influxo de íons de cálcio para dentro das células, especialmente em células musculares, incluindo as células musculares lisas vasculares, aumentando a entrada de cálcio através dos Ca_vL quando as células são despolarizadas por potássio 20mM FIGURA 20 (Barrús et al., 1996; Catterall et al., 2021; Arruda, 2022).

Os resultados mostraram que a F.A.R.A. promoveu relaxamento do músculo liso vascular contraído pelo Bay K8644. Isso significa que a substância testada causou

relaxamento nas contrações que foram induzidas pela abertura de canais de cálcio ativados (FIGURA 21).

Além disso, observou-se que o relaxamento induzido pela F.A.R.A. foi potencializado, ou seja, aumentou significativamente a sua capacidade inibidora sobre as contrações induzidas pelos canais Ca_vL acionados pelo Bay K8644, especialmente na concentração de 243µg/mL (FIGURA 22). Esses resultados sugerem que a fração ácida pode estar bloqueando os canais Ca_vL na membrana plasmática. Isso é significativo, pois indica um potencial mecanismo pelo qual a F.A.R.A. exerce seus efeitos, interferindo diretamente no influxo de cálcio através desses canais específicos e, conseqüentemente, modulando a contração muscular vascular. Assim, a inibição do influxo de Ca²⁺ por meio de Ca_vL pode ser o mecanismo pelo qual a F.A.R.A. exerce sua atividade vasorrelaxante.

Os canais iônicos desempenham um papel vital na regulação da pressão sanguínea. Eles são essenciais para o funcionamento normal das células, permitindo o fluxo controlado de íons através das membranas celulares. Nos canais de cálcio é a subunidade alfa-1C, que ao ser ativada, leva à entrada de íons cálcio (Ca²⁺) na célula, aumentando a concentração do íon citoplasma da célula muscular lisa vascular desencadeando uma série de eventos intracelulares, resultando na contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos levando à vasoconstrição (Santos Júnior *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos com a realização de testes *in vitro/ex vivo* (que demonstram o efeito vasorrelaxante da fração) corroboram com o trabalho realizado por Silva e colaboradores (2015). Nesse trabalho, os pesquisadores demonstraram que o *p-cimeno* (um terpeno constituinte do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*) apresentou ação vasorrelaxante, de forma concentração dependente, em anéis de artéria aorta de ratos independente da presença do endotélio vascular, conforme também foi evidenciado na realização desta pesquisa com a F.A.R.A. Os achados de Silva *et al.*, (2015) demonstraram ainda que na utilização de um bloqueador não seletivo dos canais de potássio, o cloreto de césio, o efeito relaxante do *p-cimeno* foi atenuado.

Portanto, moléculas que bloqueiam ou atenuam os canais de cálcio (Ca²⁺) desempenham um papel importante no controle da pressão arterial ao promoverem o vasorrelaxamento. Quando esses canais são bloqueados, ocorre uma diminuição na

entrada de íons cálcio para as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, levando a uma redução na contração dessas células. Isso resulta em uma dilatação dos vasos o que diminui a resistência vascular periférica, levando a uma redução na pressão arterial.

Canais de cálcio voltagem-dependentes (VDCC) presentes na membrana plasmática sofrem modulação pela ação de alteração de voltagem, principalmente quando esta é mediada através do efluxo de potássio (K^+). A ativação do canal de potássio (K^+) desencadeia um eficiente efluxo de íons o que promove uma hiperpolarização da membrana. Esse processo desempenha um papel importante na contração muscular lisa, pois promove o fechamento dos VDCC resultando na inibição do influxo de íons Ca^{2+} extracelular, levando ao relaxamento vascular (Haam *et al.*, 2022).

Neste estudo, os resultados obtidos evidenciaram que o bloqueio não seletivo dos canais de potássio em aorta (FIGURA 23) promoveu atenuação da ação vasorrelaxante induzida pela F.A.R.A. com um aumento de tempo na ação vasorrelaxante da fração (FIGURA 24) seguido de uma redução do valor de E_{max} (FIGURA 25). Esses resultados indicam que o efeito vasorrelaxante da fração pode ter influência por meio da ativação de canais de K^+ presentes na membrana.

Esse mecanismo molecular é essencial para modular a excitabilidade celular e regulação do tônus vascular, destacando a importância dos canais de potássio na homeostase fisiológico, pois, com a abertura de canais de K^+ , ocorre difusão deste cátion para o meio extracelular promovendo hiperpolarização e conseqüentemente relaxamento do músculo liso vascular (Haam *et al.*, 2023; Barbosa, 2015). Essas interações eletrofisiológicas fornecem uma base fundamental para compreender os processos de sinalização intracelular e as respostas celulares obtidas com o uso da substância teste, proporcionando ainda realização de outros ensaios que proporcionem análises mais detalhadas das interações moleculares obtidas entre a F.A.R.A. com proteínas-alvo, como os ensaios *in silico* por exemplo.

Nas análises *in silico* a ancoragem é a abordagem voltada para simular a interação entre duas moléculas, baseando-se no conceito proposto por Emil Fischer 1894, onde substrato se encaixa no sítio ativo ou cavidade de ligação da enzima ou receptor para que a reação biológica possa acontecer (Tripathi *et al.*, 2017). Dessa maneira a ancoragem molecular, é uma ferramenta usada na pesquisa farmacêutica

e química medicinal pois simula interações entre moléculas e seus alvos, disponibilizando padrões de interação entre uma proteína (receptor) e um ligante por meio de uma metodologia específica de cada software (Spadeto, 2022).

As estruturas das proteínas alvos são obtidas a partir de bancos de dados de estruturas tridimensionais, ou podem ser modeladas por meio de modelagem comparativa quando estão disponibilizadas em forma incompleta (Berman, *et al.*, 2000).

Neste estudo os resultados da modelagem da proteína de canal de cálcio evidenciaram um bom índice de similaridade entre as proteínas alvo (modelo, e modelada) com uma distância entre si menor que 1 Angstrom (FIGURA 26) quando comparada com a proteína molde. O que foi confirmado com o gráfico de ramachandra (FIGURA 27) demonstrando que na avaliação da qualidade do modelo desenvolvido foi obtido um padrão de similaridade entre as oscilações das hélices, intersecções entre as cadeias principais e os obstáculos de torção das cadeias laterais (Heo; Feig, 2018). Com isso o gráfico de Ramachandran demonstra ser adequada a modelagem viabilizando o uso da proteína para cálculos posteriores.

Na ancoragem molecular deste trabalho, evidenciamos que a interação do ácido β -elemônico ocorre em aminoácidos próximos ao sítio ativo de CavL (FIGURAS 28 a 30), os resultados indicam um possível bloqueio desse canal, podendo ser modulado pelo terpeno a partir dessas interações, uma vez que os ensaios *in vitro* demonstram possível participação desses canais na resposta vasorrelaxante. A ancoragem molecular é um procedimento que visa prever a conformação bioativa de uma molécula (ligante) no sítio de uma macromolécula, seguido pela avaliação e classificação do modo de ligação proposto. O acoplamento molecular prevê a conformação ideal do complexo proteína-ligante, neste caso, envolvendo o CavL como proteína alvo e o terpeno majoritário da fração como ligante capaz de promover resposta por interação com canal. Com base nisso, podemos sugerir que o composto em nossa pesquisa apresenta uma ligação com o canal, pois interage com aminoácidos presentes na proteína ligante (Saddala *et al.*, 2017).

A energia livre de interação é um indicador para avaliar a espontaneidade de uma reação. Essa energia desempenha um papel fundamental na análise de processos celulares, pois quanto mais baixa for seu valor indica maior probabilidade de uma reação acontecer (Rietman *et al.*, 2020). Nesta pesquisa, evidenciou-se que

a energia livre de interação do terpeno majoritário (ácido β- elemônico) apresentou um aumento em comparação a energia de interação do controle positivo (verapamil), indicando uma maior espontaneidade na interação entre o ligante e a proteína alvo (Ca_vL), pois quanto mais negativos são os valores de energia, mais favorável é a interação (Du *et al.*, 2016).

Este resultado (FIGURA 31) sugere uma influência relevante do terpeno majoritário na afinidade e estabilidade da complexação entre o ligante e a proteína alvo, favorecendo a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes. A avaliação da energia livre de interação é usada para a compreensão dos processos biofísicos das proteínas, bem como as interações entre proteínas e seus ligantes, e assim desempenha um papel crucial na descoberta de possíveis fármacos, especialmente durante as fases de geração e aprimoramento de compostos com potencial atividade terapêutica (Araújo; Azevedo, 2020). Com base nisso, considera-se a importância da F.A.R.A. para o sistema cardiovascular e o consequente planejamento de novos inibidores, pois trata-se de um composto que apresenta moléculas reativas e próximos do sítio ativo da proteína alvo.

Ademais, Santos (2018) ao realizar análises de ancoragem molecular com p-cimeno (terpeno presente no óleo essencial de *P. heptaphyllum*) investigou a interação entre o terpeno e canais de cálcio específicos (Ca_v1, Ca_v2.1, Ca_v2.2). Os resultados revelaram valores negativos de energia para os complexos formados, indicando uma ligação favorável. Quanto mais negativo o valor, mais favorável é a interação, sugerindo a ocorrência da reação. Corroborando com os achados desta pesquisa.

Dessa maneira os achados deste estudo sugerem que a fração ácida da resina de almécega possui ação sobre o sistema cardiovascular, apresentando efeito hipotensor e anti-hipertensivo, bem como promovem vasorrelaxamento de maneira independente de endotélio vascular, o que diante dos resultados obtidos reforça um bloqueio do influxo de cálcio por meio dos Ca_vL, com participação de canais de K⁺. Além disso não apresentou efeito citotóxico quando incubada em culturas celulares de células tronco mesenquimais e apresentou boa energia de interação do terpeno majoritário em CavL. Esses resultados inferem que a fração testada até o presente momento modula a resposta pressórica sem promover efeito tóxico a nível celular, apresentando certa margem de segurança em sua utilização.

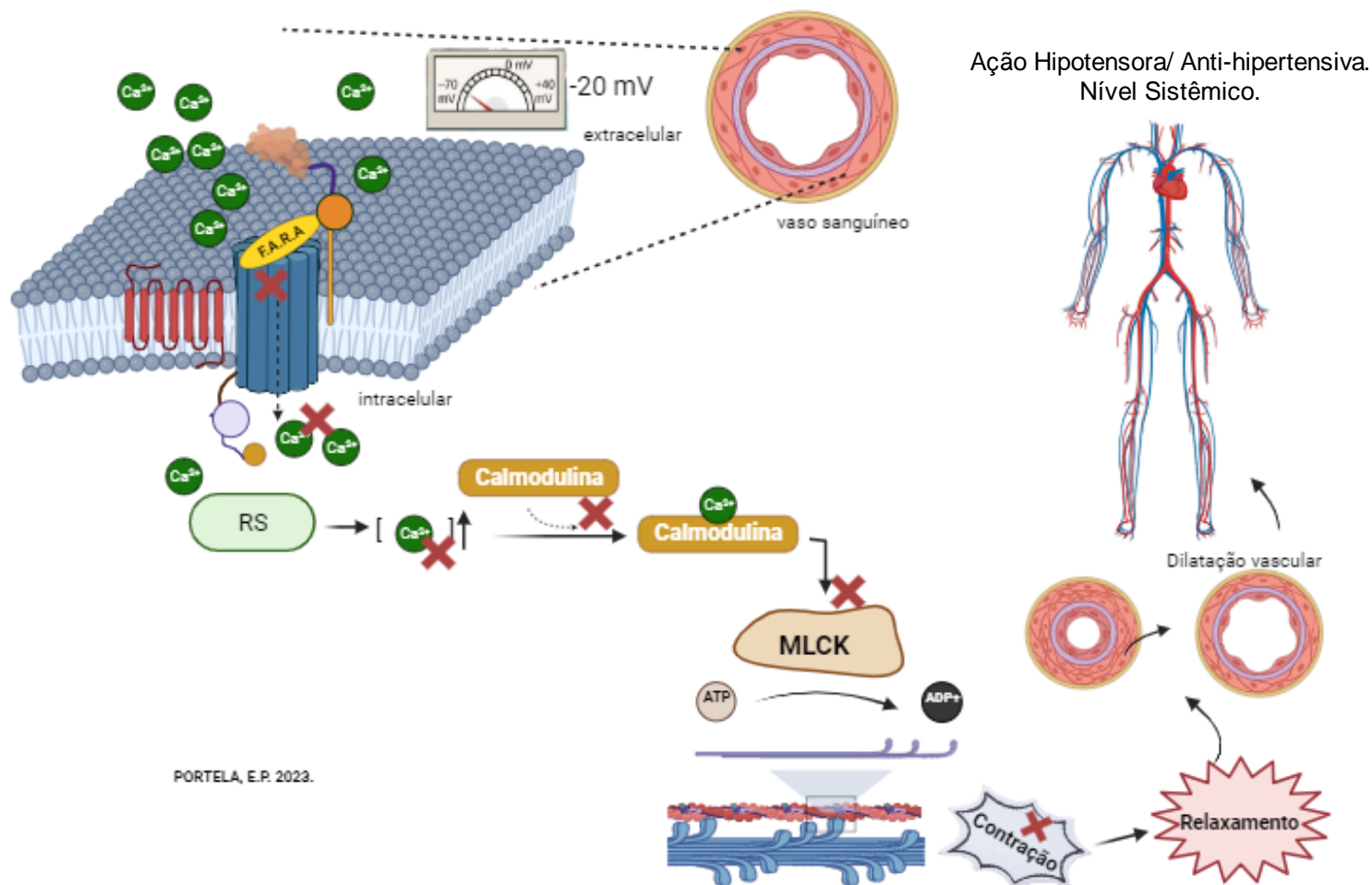
Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através de abordagens, in vivo, ex vivo e in vitro demonstraram que:

- ✓ A Fração Ácida da Resina de Almécega não apresenta ação citotóxica em células tronco mesenquimais, aumentando o efeito proliferativo das células em todos os intervalos de tempo testados no MTT;
- ✓ O efeito hipotensor da F.A.R.A foi evidenciado em modelos animais normotensos de maneira dose dependentes, sem alterações na frequência cardíaca;
- ✓ Em modelos animais SHR a Fração apresentou efeito anti-hipertensivo e bradicárdico, onde este foi melhor evidenciado na dose de 25mg/Kg;
- ✓ Em ambos os modelos animais a substância teste reduziu os níveis glicêmicos dos animais;
- ✓ O efeito vasorrelaxante da Fração é independente de endotélio vascular e envolve o bloqueio de canais de cálcio do tipo;
- ✓ O efeito vasorrelaxante da F.A.R.A. é atenuada no bloqueio de canais de K⁺
- ✓ O terpeno majoritário apresenta boa energia livre de interação com CavL por interações com aminoácidos próximos ao sítio ativo.

FIGURA 32: Representação esquemática do mecanismo de ação vasorrelaxante induzido pela F.A.R.A em Ca_vL presente em célula de músculo liso vascular de aorta isolada de rata SHR.



Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

- Realizar análise para caracterização dos constituintes fitoquímicos presentes na F.A.R.A.
- Avaliar o efeito do tratamento prolongado com a F.A.R.A. sobre o sistema cardiovascular de ratos hipertensos.
- Investigar o possível efeito toxicológico da F.A.R.A em modelos animais através da administração crônica por 7 dias através de gavagem.

Referências

9 REFERÊNCIAS:

ABDULAZEEZ, M.; AJIBOYE, O., WUDIL, A.; ABUBAKAR, H. Partial Purification and Characterization of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Alkaloids and Flavonoids from the Leaves and Seeds of *Moringa oleifera*. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**. 2016.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: Regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **Journal of Anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 232–242, 2007.

ALBA, T. M. Química, farmacologia e etnobotânica de *Anredera cordifolia* (Basellaceae): fatores de influência sobre os compostos fenólicos e atividade antioxidante. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2019.

ALVES, S. C.; FERRO, C. A.; SANTOS, J. A.; SANTOS, K. F.; CIPRIANO, D. Z O USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS TRONCO The therapeutic use of stem cells Suelen **Revista Saúde em Foco**. 2019.

ALVES, F., M.; MATTOS, S. F. O uso de plantas medicinais no auxílio do tratamento da hipertensão arterial sistêmica atrelado a atuação educadora do enfermeiro. *Revista Recien - Revista Científica de Enfermagem*, [S. l.], v. 11, n. 36, p. 462–471, 2021.

ALVES, M. J. Q. F; et al. Diuretic and hipotensive activity of aqueous extract of parsley seeds (*Petroselinum sativum Hoffm.*) in rats. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**. 19 (1A): 41-45, jan./mar. 2009.

ALMONFREY, F.B.; SEPULVIDA, M.C.; MIRANDA, R. D. No cenário atual, qual o papel dos betabloqueadores no tratamento da hipertensão? **Rev Bras Hipertensão**.;Vol.27(3):85-91. 2020

ARRUDA, A. V. Participação dos canais para cálcio nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo indol-3-carbinol em ratos. Dissertação de Mestrado Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros. Universidade Federal da Paraíba. 2021

ARAÚJO, L.L. C.; AZEVEDO, F. H. C. Study of the beta-lactamase enzyme and its relationship with antibiotic resistance. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e663974594, 2020

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

ALEXANDRE A, PINTADO A, PUERRO M. Alpha 2-adrenoceptor-mediated contractions in the rabbit aorta treated with BAY K 8644. *Eur J Pharmacol.* 1992 Oct 6;221(1):129-34.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v.219., p-1698-1705. 1970.

ATANUR, S. S. et al. The genome sequence of the spontaneously hypertensive rat: Analysis and functional significance. **Genome Research**, v.20, n.6, p.791-803, 2010.

AJE TO, MILLER M. Cardiovascular disease: A global problem extending into the developing world. *World J Cardiol.* 2009; 1(1): 3–10.

ARRUDA T. A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 307-311, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 10, de 9 de Março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 de Março de 2010.

BARRÚS, M. T., REVIRIEGO, J., MARÍN, J., Effect of the Ca(2+)-channel agonist Bay K 8644 on the contractile responses in human placental veins. **J. Auton Pharmacol.**, V.16: 161-167, 1996.

BAKER, E. H. Ion channels and the control of blood pressure. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 185–198, 2000.

BARROS, R. F. M.; AGUIAR, L. C. G. G. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do Cerrado Piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, Vol. 14. n 3: p. 419-434, 2012.

BARLOW, C. A.; ROSE, P.; PULVER-KASTE, R. A.; LOUNSBURY, K. M. Excitationtranscription coupling in smooth muscle. *The Journal of Physiology*, v. 570, p. 59- 64, 2006.

BANDONI, A. L. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento Industrial Para a Produção de Aromas e Sabores**. 1 ed. EDUFES: Vitória, Brazil, 2008. p. 345–367.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

BASTOS, J. F. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 331-337, 2009.

BERMAN. H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000.

BRESSIANI, J. G.; NESELLO, H. R.; FREISLEBEN, E. V.; DE SOUZA, M. A.; BASTIAN GIROLDI, C. R.; NARDI, A. Mecanismos de regulação da pressão arterial. **Ação Odonto** 2017.

BRITO, S.F., SALAZAR, A.S., JUNIOR, F.S., FERNANDES, F.E., CAVALCANTE, C.R., SANTIAGO, R.F., CARVALHO, R.M., & CARVALHO, G.D. Mecanismos de regulação da pressão arterial. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.5, p. 43969-43986, 2021.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E.; **Ecology** 1993, 74, 1778
BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020 .

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>> Acesso em: 14 de nov. de 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. **Fitoterápicos**. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2863748&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=fitoterapicos&inheritRedirect=true> Acesso em: 01 de Janeiro de 2024.

BARATIERIJ. L.; BADKEM. R.; MENDESN. B.; OLIVEIRAG.; CORDEIROP. H.; COGOS. B.; SCHIMITHM. D. Propriedades terapêuticas das plantas medicinais nas doenças cardiovasculares. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 6, p. e12670, 19 jun. 2023

BARBOSA, R. L. Efeito vasorelaxante do p-cimento em artéria mesentérica isolada de rato / Renata Lisboa Barbosa ; orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos. Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

BADKE MR, et al. Meanings of the use of medicinal plants in self-care practices. *Revista da Escola de Enfermagem*,; 53. 2019

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 179 - 208, 2017.

CABANDUGAMA, P.K.; GARDNER, M.J.; SOWERS, J.R. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension Roles in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. **Medical Clinics of North America**, v. 101, p. 129–137, 2017.

CARBONE, L. Estimating mouse and rat use in American laboratories by extrapolation from Animal Welfare Act-regulated species. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

BENOWITZ, N. L. Fármacos cardiovasculares e renais. In: KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J (Orgs.). **Farmacologia Básica e Clínica**. Tradução por Ademar Valadares Fonseca et al. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2014. p.169-191

CAPELETTI, A.P., SALLA, L.F. - Congresso Gaúcho de Clínica Médica, 2016

CAPELLA V.; RIVERO R. E.; LIAUDAT, A.C.; IBARRA, LUIS E.; ROMA, D. A.; ALUSTIZA,F.; MAÑAS F.; BARBERO, C.A.; BOSCH, P.; RIVAROLA, C.R., RODRIGUEZ, N.Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel **Heliyon.**, v 5., 2019.

CALZERRAA, N. T. M.; GOMES, C. F.; QUEIROZ, T.M. Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. **Acta Brasiliensis** 2(2):69-73, 2018.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. Voltagegated calcium channels (Cav) in GtoPdb v. 2021.3. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE, v. 2021, n. 3, 2021.

CARUGO, O. PONGOR, S. How root-mean-square distance (r.m.s.d.) values depend on the resolution of protein structures that are compared *J. Appl. Cryst.* 2003.

CAPURSO, A.; CAPURSO, C. Hemostasis and Thrombosis. Elsevier Inc. All rights reserved. **Copyright.** 2020

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

CARVALHO, S. H. R.; FERNANDES, G. V. R.; SILVA, F. A. S.; DE PAIVA, N. C. N.; CARNEIRO, C. M.; ISOLDI, M. C.; NATALI, A. J.; LOCATELLI, JAMILLE.

Parâmetros histológicos cardíacos e renais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos ao treinamento em natação. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 32577-32593, 2020

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Oxido Nítrico. Revisão. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 17 (6) 417. 2002.

CHANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; GUAN, X.; LIU, R. Mitochondrial disorder and treatment of ischemic cardiomyopathy: Potential and advantages of Chinese herbal medicine. **Biomed Pharmacother.** 2023.

CHEN, S. L. et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chinese Medicine**,. Londres. v. 11, n. 1, p. 1-10, dez. 2016.

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

CRIBBS L. L. T-Type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Biologic**. V.40. p. 221-230. 2006.

COLLIER, J.; VALLANCE, P. Physiological importance of nitric oxide. *BMJ*, London, v. 32, p. 1289-1290, 1991.

COWLEY, A. W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v.7, n. 11, p. 829-840, 2006

CORREIA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, 1984, vol. 1, p. 89
COSTA, E.A.D. **Estudo do modo de interação do fármaco cloroquina com o DNA e seu efeito em células**. Dissertação (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p. 34. 2023.

COLE, J.B.; FLOREZ, J.C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature Reviews Nephrology**, v.16: p.377-390, 2020.

CORREIA, E. de F.; SANTOS, W. C. F.; CUNHA, B. P. V. da .; SOUZA, S. L. da S.; RAPOSO, B. R. da C.; QUEIROZ, L. K. L. de .; SILVA, J. M. da .; FEITOSA, A. de O.; ZAIDAN, Y. L.; NASCIMENTO, J. W. A. do . Main risk factors for lower limb amputation in patients with diabetic foot: a systematic review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. e59511831599, 2022.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

CONN, P. M. Animal Models for the Study of Human Disease: Second edition. 2. ed. [s.l: s.n.]. 2017.

CUNHA, G. B.; RAMALHO, I. S.; NEUMANN, K. R. da S. A EFICIÊNCIA/ EFICÁCIA DO USO DAS PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA GASTRITE POR H. PYLORI. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2023.

CUMMINS, T. R. et al. Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. **The Journal of neuroscience**, v.15, n.21, p.5952-5961, 2001.

DOLINSKY TJ, CZODROWSKI P, LI H, NIELSEN JE, JENSEN JH, KLEBE G, BAKER NA. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic Acids Res.** 2007

DU, X., LI, Y., XIA, Y.-L., AI, S.-M., LIANG, J., SANG, P., JI, X.-L., LIU, S.-Q., Insights into Protein–Ligand Interactions: **Mechanisms, Models, and Methods**. Int. 2016.

DUARTE, M. G.; ABREU, N. M. de; SANTOS, A. T. O.; KOKUDAI, R. L. N. Diabetes no Brasil, fatores associados a suas complicações e tratamentos. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2023.

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

FERRARIO, C.N. New physiological Concepts of the Renin-Angiotensin System from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. **Hypertension**, v. 55, n. 2, 445-452, 2010.

FARIA, A. N. et al. Tratamento de Diabetes e Hipertensão no Paciente Obeso. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 137-142, Apr. 2002.

FERREIRA, S. C. H. A atenção farmacêutica ao paciente portador de hipertensão arterial sistêmica. *Mostra Científica da Farmácia*, [S.l.], v. 3, n. 1, jul. 2017 Disponível em: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/1207/975>>. Acesso em: 15 Dec. 2023.

FERREIRA, L. R. D., DA SILVA, A. F., DA SILVA SIQUEIRA, J., DA CONCEIÇÃO SANTOS, R., DA SILVA LIMA, V., DE OLIVEIRA, A. M., DA SILVA, G. C. Estudo do

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos citotóxicos do rizoma da *Microgramma Vacciniifolia*. **Brazilian Journal of Health Review** 2020.

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 11, p. 923–928, 2017.

FRAME, M.D.S, Regulation of capillary perfusion by small arterioles is partially organized. **Circ Res** 1993;73:155-63)

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

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

GRALAK, E. Z., MARRA, M. B. Eficácia de novas moléculas anti-hipertensivas com alvo no sistema purinérgico em modelos pré-clínicos. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Cardoso. Universidade Federal da Fronteira Sul. Chapecó. 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRIGORIADIS, D. E.; HOARE, S. R.; LECHNER, S. M.; SLEE, D. H.; WILLIAMS, J. A. Drugability of extracellular targets: discovery of small molecule drugs targeting allosteric, functional, and subunit-selective sites on GPCRs and ion channels. *Neuropsychopharmacology Reviews*, v. 34, n. 1, p. 106-125, 2009.

GNECCHI M, HE H, LIANG OD, MELO LG, MORELLO F, MU H. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11(4):367-8.

GROSS, P.L.; AIRD, W.C. The endothelium and thrombosis. **Seminars in Thrombosis Hemostasis**, v. 26, n.5, p. 463- 478, 2000.

HAAM, C.E.; BYEON, S.; CHOI, S.; OH, E.Y.; CHOI, S.K.; LEE, Y.H. Vasorelaxant Effect of *Trachelospermi caulis* Extract on Rat Mesenteric Resistance Arteries. **Molecules**. Aug 19;27(16):5300. 2022.

HANWELL MD, CURTIS DE, LONIE DC, VANDERMEERSCH T, ZUREK E, HOOFT RW, SANDER C, VRIEND G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. **Comput Appl Biosci**. 1997.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

HENDRIKS, H.; ANDERSON-WILDEBOER, Y.; ENGELS, G.; BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; **Planta Med.** 1997, 63, 356.

HEO, L., FEIG, M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, , **115**, 13276–13281. 2018

HU, J. et al. Thromboxane A₂ is involved in the development of hypertension in chronic kidney disease rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 909, p. 125–134, 2021.

HUTCHISON GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform.** 2012.

IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M. Controle Fisiológico da Pressão Arterial pelo Sistema Nervoso. **Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão**. V.8, n.1,p.6-100, 2005.

JACKSON, W. F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 89–144, 2017.

JUNIOR, Valdir, F. V. , PINTO, Angelo, C. , MACIEL, Maria, A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. Rio de Janeiro. v 28. n 3. p. 519-528, fev., 2005.

KOUVELAS, D.; AMANITI, E.; POURZITAKI, C.; KAPOUKRANIDOU, D.; THOMAREIS, O.; PAPAZISIS, G.; VASILAKOS, D. Baroreceptors discharge due to bilateral aortic de- nervation evokes acute neuronal damage in rat brain. **Brain Res. Bull.** v. 79, p. 142–146, 2009

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. (Orgs.). *Farmacologia básica e clínica*. 13 Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017.

KOLLROS, P.R., KONKLE, B.A. Microvascular disease in diabetes mellitus. **J Cardiovasc Risk.** 1997.

KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJ. THE PHYRE2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat Protoc.** 2015.

KREMER, C. M. S., GOMES, M. F. P., SANTOS, M. S., CARVALHO, V. C. DOS S., LAZARINI, C. A., & FRACOLLI, L. A. Percepção de hipertensos e diabéticos sobre a adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico. **Revista Saúde em Redes**, v. 8, n. 2, p. 131-143, 2022.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

KILMISTER, E.J., TAN, S. T. The Role of the Renin–Angiotensin System in the Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 69(12) 835– 847 **Stem Cell Niche** 2021.

KRIEGER, E. M.; FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, J. E. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [S. l.], v. 29, n. 2/3, p. 181-192, 1996.

LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. **General Physiology and Biophysics**, v. 24. n1, p. 1-78, 2005.

LLANCALAHUEN, F.M.; VALLEJOS, A.; ARAVENA, D.; PRADO, Y.; GATICA, S.

OTERO, C.; SIMON, F. α 1-Adrenergic Stimulation Increases Platelet Adhesion to Endothelial Cells Mediated by TRPC6. **Adv Exp Med Biol**. 2023;

LEONG, X.-F. et al. Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental Sprague-Dawley rats fed with heated vegetable oil. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 12, p. 189–197, 2010.

LIMA, E. M., ANDREWS M. NASCIMENTO A. B, DOMINIK L., SCHERERA, R. MEYRELLESB, S. S.; BOËCHATA, G. A.P.; ANDRADE, T. A, ENDRINGERA, D. C. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin – chemical composition and cytotoxicity **Rev Bras Farmacogn** . 2014.

LIMA, I. R. **Efeito do zinco na biocompatibilidade in vitro e in vivo de grânulos de zinco-apatita 5% em comparação com a hidroxiapatita**. 2016. Dissertação (Mestrado na área de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2006.

LINS, L. S. S. Avaliação dos efeitos induzidos pela 5-hidroxi flavona sobre o sistema cardiovascular de ratos. Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal da Paraíba. 2022.

LIZANNI, A. M. Docking molecular de derivados do terpinen-4-ol com potencial atividade antimicrobiana. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2023.

LOZANO, J.; YENNY, Y.; SÁNCHEZ, M.; RUTH, M Canales de cálcio como blanco de interés farmacológico **NOVA publ. cient** ; 18(34): 57-76, 2020.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

LOPES, J.P.; FIARRESGA, A.; SILVA, CUNHA P. Mesenchymal stem cell therapy in heart disease. **Rev Port Cardiol.**, n. 32., p. ,43–47. 2013.

LORENZI, H. F. MATOS, J. A. Medicinal Plants in Brazil: Native and Exotic, **Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brazil, 2008.**

LU, K. et al. Association between prevalence of hypertension and components of metabolic syndrome: the data from Kailuan community. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.37, n.4, p. 303-307, 2015.

MAGALDI, J.B. Relatório de um estudo sobre nutrição realizado sob os auspícios dos “Fundos Universitários de Pesquisa para Defesa Nacional”. **São Paulo Médico**, 207, 1944.

MARTELLI, A. Sistema Renal e sua Influência no Controle em Longo Prazo da Pressão Arterial. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2015.

MARTELLI, A. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona e Homeostase Cardiovascular. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 51-55, 2010.

MACHADO, L. C., SANTOS, J. F. D., BARROS, E. M. D. S., DE PAULA, R. A., & PIRES, J. G. P. Critérios De Escolha De Fármacos Anti-hipertensivos Em Adultos / Criteria for Choosing Anti-hypertensive Drugs in Adults. **Brazilian Journal of Health Review 2021.**

MA, L.; MA, S.; HE, H.; YANG, D.; CHEN, X.; LUO, Z.; LIU, D.; ZHU, Z. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertension Research**, v. 33, p. 446-53, 2010.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, p.429- 438, 2002.

MAGALHÃES, F.J. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de Enfermagem: estratégias de promoção da saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.67, n.3, p.394-400, 2014.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, supl. 3, p. 1-104, set.2016.

MC MURRY, J. 7º Ed. Química Orgânica - Combo. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

MELO, K. M. **Efeito da mistura de triterpenos alfa e beta-amirina, isolada de *Protium heptaphyllum*, sobre a adipogênese in vitro.** 2017. Orientadora: Profª Drª

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

Flávia Almeida SANTOS. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

MOREIRA, T.S.; TAKAKURA, A.C. Commentaries on Viewpoint: Initiating inspiration outside the medulla does produce eupneic breathing. What is the role of brain stem neurons in eupneic breathing. **AC. J. Appl. Physiol**, v. 110. p. 854-856, 2011.

MOBIN, M. et al., “MDGCMS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against candida specie,” **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, vol. 18, no. 2, pp. 531–538, 2016.

MOBIN, M. H. et al. Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry Analysis and Vasorelaxant Effect of Essential Oil from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **BioMed Research International**. 2017.

MOURA-JUNIOR, M. R. **Avaliação Temporal da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda em Ratos Submetidos à Desnutrição Protéica e a Hipertensão de Goldblatt (2R-1C)**. 2009. Orientador: Deoclécio Alves Chianca Júnior. DISSERTAÇÃO - UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR – NUPEB.

MENDES, M. B. **Avaliação do potencial toxicológico e cardiovascular do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (aubl.) marchand livre e complexado com β-ciclodextrinaquímico**. Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira. 2019. TESE – PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ, TERESINA, PIAUÍ.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. No Brasil, maioria dos pacientes com hipertensão e diabetes faz acompanhamento de saúde no SUS. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/novembro/no-brasil-maioria-dos-pacientes-com-hipertensao-e-diabetes-faz-acompanhamento-de-saude-no-sus>. Acesso em: 30 dez 2023

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel Brasil 2016**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2016_fatores_risco.pdf. Acesso em: 01 de fev. de 2024.

MILLS, K.T.; BUNDY, J.D.; KELLY, T.N. REED, J.E. KEARNEY, P.M. REYNOLDS K. Global disparities of hypertension prevalence and control. **Circulation**. 2016.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. Tese (Tese em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, MG, 2010.

NATIONAL HEALTH PORTAL. **Introduction and Importance of Medicinal Plants and Herbs**. Maio, 2016.

NINOMIYA, W.; MIZOBUCH, K.; HAYASHI, T.; OKUDE, S.; KATAGIRI, S.; KUBO, A. ; NAKANO, T. Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report. **Doc Ophthalmol** .140:279–287, 2020.

Negrão, C. E.; Rondon, U. P. B. "Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial." **Rev Bras Hipertens** 8.1 89-95. (2001).

NOGUEIRA, I. C. SILVA A. C.S. FREITAS, G.S. DIAS, D.L. Terapia regenerativa com células-tronco em pacientes pós infarto agudo do miocárdio: breve revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 6, n.5,p.26231-26251, 2023

NUNES, A.S.S. **Atividade cardiovascular da mistura de isômeros de α -terpineol (MIT) em ratos**. 2018. 98f. Dissertação de Mestrado. Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira. PPGFARM/NPPM/CCS, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI

OLIVEIRA, K.R. V. Avaliação do efeito renoprotetor induzido por alfa- terpineol em ratos SHR e infartados. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro. Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito para obtenção do grau de bacharel em Farmácia . Universidade Federal de Alagoas.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Información general sobre la hipertensión en el mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Día Mundial de la Salud. Ginebra. 2013.

OMS – World Health Organization. **A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2013. 40p.

PAULINO, E.. T. **Efeito cardioprotetor do apha-terpineol em ratos infartados**. Orientadora: Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro. 2019. TESE- PROGRAMA

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, p.45-61, 2002.

RIBEIRO, S. B.; ALBERGARIA, E. M. A. Análise quantitativa de comprimidos partidos de captopril 50 miligramas. **Revista Científica Multidisciplinar** - v. 2, n. 5, p. e25364, 2021.

PINTO, L. C. et al. Controle inadequado da pressão arterial em pacientes com diabetes melito tipo 2. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 94, n. 5, p. 651- 655, May 2010.

RAMANATHAN, V.; THEKKUMALAI, M. Role of chrysin on hepatic and renal activities of N ω -nitro-l-arginine-methylester induced hypertensive rats. **International Journal of Nutrition Pharmacology**, v.3, n.2, 2014.

RAKUAN, D. et al. Knockout of angiotensin 1-7 receptor mas worsens the course of two-kidney, one-clip goldblatt hypertension: Roles of nitric oxide deficiency and enhanced vascular responsiveness to angiotensin II. **Kidney and Blood Pressure Research**, v.33, n.6, p. 476-88, 2010.

REYNERTSON, K. A; BASILE, M. J; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, p. 025-036, 2005.

ROMANA, A.R.M. Plantas medicinais com atividade sobre a pressão arterial. Dissertação de mestrado. Orientadora Profa. Dra. Rita Santos Serrano. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas Universidade de Lisboa -Portugal

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311– 318, 2011.

RIETMAN, EA, TAYLOR, S, SIEGELMANN, HT, DERIU, MA, CAVAGLIA, M TUSZYNSKI, JA. Using the Gibbs Function as a Measure of Human Brain Development Trends from Fetal Stage to Advanced Age. *Int J Mol Sci*, 21(3),1116. 2020)

SANTOS-JÚNIOR, A. .; OLIVEIRA, C.; CANTO, M.; SILVA, J. Comparação do bloqueio de canal de cálcio vascular promovido por verapamil e nifedipina por modelagem molecular. **Anais da Faculdade de Medicina de Olinda, [S. l.]**, v. 1, n. 7, p. 14–18, 2022. DOI: 10.56102/afmo.2022.187

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

SPADETO, J. P.M. Modelagem molecular aplicada a estudos teóricos de sistemas biológicos Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Antonio Cormanich Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de Campinas. 2022.

SADDALA, M., KANDIMALLA, R., ADI, P. Novel 1, 4-dihydropyridines for L-type calcium channel as antagonists for cadmium toxicity. **Adi, P. J.Bhashyam, S. Sri; Asupatri, U.R..** *Sci Rep* **7**, 45211 2017.

SANTOS, W. B. R. p-CIMENO reduz dor oncológica através da modulação da via de analgesia endógena e correntes de cálcio. Dissertação de mestrado. Orientadora: Profa. Dra. Adriana Gibara Guimarães. Universidade Federal de Sergipe. 2018.

Disponível em:

<https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/10160/2/WAGNER_BARBOSA_ROCHA_SANTOS.pdf
f Acesso em: 09 de fev de 2024.

SHEREEN M A, SULIMAN K, KAZMI A, BASHIR N, SIDDIQUE R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res.** 2020.

SALJOUGHIAN, S. et al. The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.58, n.10, 2018.

SHAH, S. U.; ANJUM, S; LITTLER, W. A. Use of diuretics in cardiovascular disease: (2) Hypertension, **Medical Journal**, n. 2, p. 271–276, 2004.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

SANTOS, F. A.; FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; SILVA, A. A. C. A. BRITO, G. A.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**.11:98. 2012.

SANTOS-JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, C.; CANTO, M.; SILVA, J. Comparação do bloqueio de canal de cálcio vascular promovido por verapamil e nifedipina por modelagem molecular. **Anais da Faculdade de Medicina de Olinda**, v. 1, n. 7, p. 14–18, 2022.

SAY, Y. et al. prevalence of uncoupling protein, A2-adrenergic Receptor and Angiotensin-converting Enzyme gene polymorphisms and their association with obesity traits among Malaysian cohorts of Setapak and Kampar: T2: s10. 04. **Obesity Reviews**, v. 15, p. 43-44, 2014.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

SADDALA, M., KANDIMALLA, R., ADI, P. *et al.* Novela 1, 4-dihidropiridinas para canal de cálcio tipo L como antagonistas da toxicidade do cádmio. **Sci Rep** 7 , 45211 2017.

SCHNITZLER, J. *et al.* Poplar volatiles – biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. **Plant Biology**. v.12, p.302–316. 2010.

SILVA, R. N. A influência do exercício físico em parâmetros cardiovasculares e ingestivos de animais com hipertensão renovascular (**2R1C**). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2017.

SILVA, G.B.A.D, SOUZA D.S., MENEZES-FILHO J.E.R., SILVA-NETO J.A.D., CRUZ J.D.S., ROMAN-CAMPOS D.R., QUINTANS-JÚNIOR L.J., VASCONCELOS C.M.L. (-)-Carvone Modulates Intracellular Calcium Signaling with Antiarrhythmic Action in Rat Hearts. **Arq Bras Cardiol**. Aug;119(2):294-304 2022.

SILVA, R. F. Efeito do nível de condicionamento físico nas concentrações de óxido nítrico, atividade da enzima conversora de angiotensina, pressão arterial e a relação do perfil genético em idosos hipertensos. Orientador: Prof. Dr. Anderson Saranz Zago. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências do Campus de Bauru, Universidade Estadual Paulista, 2021.

SILVA, M. C. Efeito vasorrelaxante de um novo doador de óxido nítrico em artéria aorta isolada de ratos. Trabalho de Conclusão de Curso. Orientador Professor Dr. Thyago Moreira de Queiroz. Universidade Federal de Pernambuco 2021.

SILVA, E. C. *et al.* Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e fatores associados em homens e mulheres residentes em municípios da Amazônia Legal **REV BRAS EPIDEMIOL**. n. 19 (1) p.38-51. mar. 2016.

SILVA, G. B. A. ., SOUZA, D. S., MENEZES-FILHO, J. E. R., SILVA-NETO, J. A. CRUZ, J. DOS S., ROMAN-CAMPOS, D. R., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., VASCONCELOS, C. M. L. A (-)-Carvona Modula a Sinalização de Cálcio Intracelular com Ação Antiarrítmica em Corações de Ratos. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v.119(2), p. 294–304, 2022.

SINHORIN, V. D. G., , PATIAS, N, S., MOURA, F. R. , CUNHA, A. P.S., LIMA, R. R. S., COSTA, T. B. Identification of Flavonoids by LC-MS/MS in Leaves Extract From *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March and Antioxidant Activity in Mice. **The Natural Products Journal**, , 2020.

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

SILVA, G.C.; BRAGA, B. A, F.C., LIMAC, M.P., PESQUERO, J.L. D, LEMOS, V.S. D, CORTES, S.F. Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology** 137 709–71. 2011.

SILVA, M.T.M.; RIBEIRO, F.; MEDEIROS, M. The vasorelaxant effect of p-cymene in rat aorta involves potassium channels. **Scientific World Journal**, 2015.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª ed. – Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, 2003.

SIMONETTI, G.; MOHAUPT, M. Kalzium und Blutdruck. **Therapeutische Umschau**, v. 64, n. 5, p. 249–252, 2007.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

ŚLIWKA, L. et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PLoS One**, v. 11, n. 5, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol** 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. **Arq Bras Cardiol**. 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 107, n. 3 (Supl. 3), p. 1-83, Setembro, 2016.

SOUSA, F. C. F.; et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 22 (1): 193-207, jan-feb, 2012

SOUSA, M. T., DO AMPARO SANTOS, M., DOS SANTOS PEREIRA, I., DA FONSECA, H. A. T., PEREIRA, M. L., DAS VIRGENS, C. M. B., DE QUEIROZ CARVALHO, F. L. . Ações educativas: dieta, atividade física e suas possíveis influências sobre a pressão arterial. **Brazilian Journal of Development**. 7(1), 226-242. 2021)

TRIVEDI P, TRAY N, NGUYEN T. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: Helping people sooner or later. **Stem Cell Dev**; 19: 1109–1120. 2010

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, n. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TRIPATHI, A.; BANKAITIS, V.A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. **Journal of molecular medicine and clinical applications**, 2. [5]. 2017

TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**. 2010.

TEIXEIRA, R. G. S. **Avaliação farmacológica de derivados sintéticos na reatividade vascular e na hipertensão arterial pulmonar**. 2020. 132 f. TESE (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE) – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE, FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, NITERÓI, 2020.

TE RIET, L. et al. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. **Circulation Research**. v.116, n.6, p.960-975, 2015

VALENTI, V.E.; SATO, M.A.; FERREIRA, C.; ABREU, L.C. Regulação neural do sistema cardiovascular: Centros bulbares. **Revista Neurociência**, v. 15, n. 4, p. 317-320, 2009.

VEERAMANI, C.; AL-NUMAIR, K.S.; CHANDRAMOHAN, G.; ALSAIF, M.A. PUGALENDI, K.V. Antihyperlipidemic effect of *Melothria maderaspatana* leaf extracts on DOCA-salt induced hypertensive rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 2012.

VIEIRA JUNIOR, G.M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v.28., n.2, 183-187. 2005.

WILKINSON-BERKA, J.L.; AGROTIS, A.; DELIYANTI, D. The retinal renin–angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. **Peptides**, v. 36, p. 142–150, 2012.

XU, B.; BOBEK, G.; MAKRIS, A.; HENNESSY, A. Antihypertensive methyl dopa, labetalol, hydralazine, and clonidine reversed tumour necrosis factor- α inhibited

PORTELA, E.S. Envolvimento dos Canais de cálcio tipo L (Ca_vL) no efeito cardiovascular da Resina de *Protium heptaphyllum* March em modelo de hipertensão. 2024. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI.

endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial-trophoblast cellular networks. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.44, n.3, p.421-427, 2017.

ZHANG, L. et al. Metabolism of endogenous nitric oxide during growth and development of apple fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 500 – 506, 2011.

ZHOU, B. et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **The Lancet**, v. 398, n. 10304, p. 957–980, 2021.