



**Universidade Federal do Piauí  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Ponto Focal- Universidade Federal do Piauí**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E CARDIOVASCULAR DO ÓLEO  
ESSÊNCIAL DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand LIVRE E  
COMPLEXADO COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

**MARCELO BEZERRA MENDES**

**TERESINA-PI  
2019**

**MARCELO BEZERRA MENDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E CARDIOVASCULAR DO ÓLEO  
ESSÊNCIAL DE *Protiumheptaphyllum* (Aubl.) Marchand LIVRE E  
COMPLEXADO COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia RENORBIO-PI, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA EM RECURSOS NATURAIS.

**ORIENTADOR (A): PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA**

**TERESINA – PI**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

M538a Mendes, Marcelo Bezerra.  
Avaliação do potencial toxicológico e cardiovascular do óleo  
essencial de *Protiumheptaphyllum* (Aubl.) Marchand Livre e  
complexado com  $\beta$ -Ciclodextrina / Marcelo Bezerra Mendes. –  
2019.  
154 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de  
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.  
"Orientadora: Profª. Drª. Aldeídia Pereira de Oliveira".

1. Óleo Essencial. 2. Hipertensão. 3. *Protiumheptaphyllum*.  
I. Título.

CDD 615.1

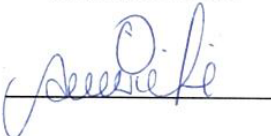



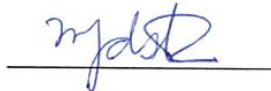
**FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE**

**ALUNO:** MARCELO BEZERRA MENDES

**TÍTULO DO PROJETO:** “Avaliação do potencial toxicológico e cardiovascular do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand livre e complexado com *beta-ciclodextrina*.”

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira

**BANCA EXAMINADORA:**

	<b>CONCEITO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa- UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 30 de Abril de 2019.

**HORÁRIO:** 15h

**LOCAL:** Auditório do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais(NPPM/CCS/UFPI)

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço a minha professora orientadora Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira, pelo apoio, dedicação, paciência e ensinamento, que contribuindo durante todo o processo de orientação tanto no mestrado quanto no doutorado.
- Aos professores (a) Fernanda Regina de Castro Almeida, Guilherme Barroso Langoni de Freitas, Rita de Cássia Meneses Oliveira, Amilton Paulo Raposo Costa e Maria José dos Santos Soares, que participaram da banca examinadora.
- Ao Professor Sidney Gonçalo de Lima, Fernando Aécio de Amorim Carvalho e Débora Rejane Fior Chadi que contribuíram por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.
- Aos colegas Daniel Dias Rufino Arcanjo, Márcio Edivandro Santos, Alessandra Maria Braga Ribeiro, Julianne Viana Freire Portela, Fabiana de Moura Souza, Carla Kelly Barroso Sabino, Benedito Pereira de Sousa Neto, Michel Muálem de Moraes Alves, Pedro Simão da Silva Azevedo, Gabriela Dantas Carvalho, Marcio Rocha e Aline Nunes que de alguma forma contribuíram nessa caminhada.
- Aos meus pais, Rosangela de Paula, Lee Lu de Paula e Akira de Paula pelo apoio.

## RESUMO

Efeito Hipotensor e anti-hipertensivo do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand livre e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina em ratos. MENDES, M.B. Tese de Doutorado, RENORBIO, UFPI-2019

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae), utilizada popularmente como analgésico, cicatrizante contém uma resina exudada do caule composta de uma mistura de terpenos, porém não encontrado na literatura científica a utilização da mesma como anti-hipertensiva. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos e cardiovasculares do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (OEPH) livre e do complexo com  $\beta$ -ciclodextrina (OEPH- $\beta$ CD) em ratos normotensos e hipertensos (SHR e L-NAME). Realizaram-se a análise toxicológica aguda de acordo com a OECD 2003. Ratos fêmeas tratadas por via oral OEPH (2000 mg/kg) não apresentaram alteração significativa no consumo de água, alimento, avaliação ponderal, mas apresentaram alteração no parâmetro bioquímico de AST e albumina. No teste de viabilidade celular (*in vitro*) utilizou-se o ensaio MTT em células macrófagos de murinos e os resultados obtidos demonstram que em 24 horas a viabilidade apresentou-se acima de 50% com  $CI_{50}$  de 69,33  $\mu$ g/mL. Na verificação do efeito do OEPH sobre o sistema cardiovascular, foram utilizados ratos machos. O OEPH nas doses (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, VI) induziu hipotensão (-18,66 $\pm$ 1,39\*; -30,42 $\pm$ 2,16\*; -35,62 $\pm$ 0,67\* mmHg, respectivamente, \*p<0,05 vs OEPH), reduziu a frequência cardíaca nas maiores doses 6,25 e 12,5 mg/kg (-36,59  $\pm$  9,05\*; -28,95 $\pm$ 9,99\* bpm, respectivamente, \*p<0,05 vs OEPH). A participação dos receptores muscarínicos foi verificada através da atropina 2mg/kg (IV) e observou que a resposta hipotensora do OEPH foi atenuada na menor e na maior dose e a bradicardia foi abolida, efeito semelhante foi obtido na presença do hexametônio. A participação dos receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), foi realizada na com a utilização dos antagonistas prazosina e ioimbina, respectivamente. E os resultados demonstram que OEPH induz uma atenuação da hipotensão e uma redução da FC em todas as doses utilizadas. O envolvimento dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos foi verificado na presença do propranolol (1,5mg/kg, IV) e observou-se que o OEPH aboliu de maneira significativa tanto a (Pressão arterial média) PAM como a (Frequência Cardíaca) FC em todas as doses testadas. Na avaliação anti-hipertensiva do OEPH no modelo SHR observou-se que o OEPH nas doses (3,125; 6,25 e 12,5) por via venosa, promoveu uma redução da PAM e da FC. Nestes animais, o bloqueio com ioimbina atenuou de maneira significativa os valores pressóricos e da FC. No modelo de hipertensão L-NAME utilizou-se OEPH livre e o  $\beta$ -ciclodextrina por via oral. A dose de OEPH (25 mg/kg) aumentou a PAM em relação ao controle após 20 minutos  $\Delta$ PAM (2,13  $\pm$  0,87\* mmHg). A dose de OEPH (50 mg/kg) promoveu elevação da PAM (5,17 $\pm$ 0,14\* mmHg) em relação ao controle após 30 minutos seguido de uma diminuição do  $\Delta$ PAM (-4,7  $\pm$  1,07\* mmHg) após os 40 minutos, efeito bifásico. A dose do OEPH (100 mg/kg) aumentou  $\Delta$ PAM (1,72  $\pm$  0,59\* mmHg) em relação ao controle após 20 minutos. O complexo na mesma dose OEPH- $\beta$ CD (100 mg/Kg) não promoveu alteração da PAM quando comparado ao controle, porém na administração do OEPH- $\beta$ CD (200 mg/kg) aumentou a PAM em relação ao controle após 40 minutos, tendo um aumento do  $\Delta$ PAM (15  $\pm$  1,97 mmHg). Enquanto a administração a dose de OEPH- $\beta$ CD (300 mg/Kg) diminui a PAM após 50 minutos ( $\Delta$ PAM -9,8  $\pm$  2,63\* mmHg). Conclui-se que o OEPH administrado por via venosa induziu efeito hipotensor e bradicárdico envolvendo a participação dos receptores muscarínicos,  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos ratos normotensos e efeito anti-hipertensivo em ratos SHR. O OEPH- $\beta$ CD nas doses de demonstrou efeito bifásico (200 e 300 mg/Kg), com atividade anti-hipertensiva em ratos hipertensos (L-NAME).

CEUA:069/2014

Palavra-chave: hipertensão, óleo essencial, *Protium heptaphyllum*.

## Abstract

Hypotensive and antihypertensive effect of the essential oil of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand free and complexed with  $\beta$ -cyclodextrin in rats. MENDES, M.B. Doctoral Thesis, RENORBIO, UFPI-2019

The species *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae), popularly used as analgesic, healing contains a resin exuded from the stem composed of a mixture of terpenes, but not found in the scientific literature to use it as antihypertensive. The objective of this study was to evaluate the toxicological and cardiovascular effects of the essential oil of free *Protium heptaphyllum* (EOPh) and the complex with  $\beta$ -cyclodextrin (EOPh- $\beta$ CD) in normotensive and hypertensive rats (SHR and L-NAME). Acute toxicological analysis was performed according to OECD 2003. Female rats treated orally EOPh (2000 mg/kg) did not present significant alteration in water consumption, food, weight evaluation, but presented a change in the biochemical parameter of AST and albumin. In the cell viability test (*in vitro*) the MTT assay was used in murine macrophages cells and the results demonstrated that in 24 hours the viability was above 50% with IC 50 of 69.33  $\mu$ g/mL. In checking the effect of EOPh on the cardiovascular system, male rats were used. At the doses (3.125, 6.25 and 12.5 mg/kg, IV), hypotension induced ( $-18.66 \pm 1.39^*$ ,  $-30.42 \pm 2.16^*$ ,  $-35.62 \pm 0.67^*$  mmHg, respectively,  $*p < 0.05$  vs OEPh), reduced heart rate at the highest doses 6.25 and 12.5 mg/kg ( $-36.59 \pm 9.05^*$ ;  $-28.95 \pm 9.99^*$  bpm, respectively,  $*p < 0.05$  vs EOPh). The participation of the muscarinic receptors was verified through atropine 2mg/kg (IV) and observed that the hypotensive response of the EOPh was attenuated in the lowest and the highest dose and bradycardia was abolished, a similar effect was obtained in the presence of hexamethonium. The participation of the adrenergic receptors ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ), was performed with the use of the prazosin and yohimbine antagonists, respectively. And the results demonstrate that EOPh induces an attenuation of hypotension and a reduction of HR at all doses used. The involvement of the  $\beta$ -adrenergic receptors was verified in the presence of propranolol (1.5 mg/kg, IV) and it was observed that the EOPh significantly abolished both the (mean arterial pressure) MAP and the (heart rate) HR in all the doses tested. In the antihypertensive evaluation of the EOPh in the SHR model, it was observed that the EOPh at doses (3.125, 6.25 and 12.5) intravenously promoted a reduction in MAP and HR. In these animals, blockade with yohimbine significantly attenuated blood pressure and HR. In the L-NAME hypertension model, free EOPh and oral  $\beta$ -cyclodextrin were used. The dose of EOPh (25 mg/kg) increased the MAP over the control after 20 minutes  $\Delta$ PAM ( $2.13 \pm 0.87^*$  mmHg). The dose of EOPh (50 mg/kg) promoted an increase in MAP ( $5.17 \pm 0.14^*$  mmHg) in relation to the control after 30 minutes followed by a decrease in  $\Delta$ PAM ( $-4.7 \pm 1.07^*$  mmHg) after 40 minutes, biphasic effect. The dose of EOPh (100 mg/kg) increased  $\Delta$ PAM ( $1.72 \pm 0.59^*$  mmHg) relative to the control after 20 minutes. At the same dose EOPh- $\beta$ CD (100 mg/kg) did not promote MAP alteration when compared to the control, but in the administration of EOPh- $\beta$ CD (200 mg/kg), MAP increased in relation to the control after 40 minutes, increased  $\Delta$ PAM ( $15 \pm 1.97^*$  mmHg). While the dose of EOPh- $\beta$ CD (300 mg/kg) decreases MAP after 50 minutes ( $\Delta$ PAM  $-9.8 \pm 2.63^*$  mmHg). It was concluded that intravenous EOPh induced a hypotensive and bradycardic effect involving the participation of muscarinic receptors,  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenergic normotensive rats and antihypertensive effect in SHR rats. EOPh- $\beta$ CD at doses of demonstrated a biphasic effect (200 and 300 mg/kg), with antihypertensive activity in hypertensive rats (L-NAME).

Key words: hypertension, essential oil, *Protium heptaphyllum*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A ativação do Sistema renina angiotensina-aldosterona.

Figura 2 - Fotografia da espécie *Protiumheptaphyllum* March

Figura 3 - Sistema de aferição da pressão arterial e frequência cardíaca.

Figura 4 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos

Figura 5 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com atropina.

Figura 6 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com hexametônio.

Figura 7 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com ioimbina.

Figura 8 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com prazosina.

Figura 9 - Efeito do OEPh sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com propranolol.

Figura 10 - Estrutura molecular e tamanho da  $\beta$ -ciclodextrina

Figura 11: Compostos majoritários presentes no OEPh- $\beta$ CD

Figura 12 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do Limoneno

Figura 13 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do 1,8-Cineol

Figura 14 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do  $\alpha$ -Terpineol



## LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 – Efeito do OEPH sobre a viabilidade celular através do ensaio MTT.

Gráfico 2 - Espectros de infravermelhos com transformada de Fourier,  $\beta$ CD; OEPhe  
OEPH- $\beta$ CD

Gráfico 3 - Cromatograma da análise do OEPH e OEPH- $\beta$ CD

Gráfico 4 - Comparação dos valores de pressão arterial Média e Frequencia Cardíaca entre animais SHR e WKY

Gráfico 5 – Efeito do óleo essencial *Protiumheptaphyllum* (OEPH)sobre a pressão arterial media (mmHg) em ratos hipertensos com L-NAME administração via oral.

Gráfico 6: Efeito do OEPH- $\beta$ CD, sobre a pressão arterial media (mmHg) em ratos hipertensos com L-NAME administração via oral.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação da pressão arterial

Quadro 2 – Modelo de hipertensão arterial de origem genética ou renal

Quadro 3 – Modelos de hipertensão arterial de origem química; obstrutiva ou por lesão neuronal.

Quadro 4 – Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular segundo categorias de toxicidade dos materiais.

Quadro 5 – Princípios dos métodos de avaliação de toxicidade aguda oral OECD 420, 423 e 425.

Quadro 6 – Parâmetro para avaliação clínica de ratas para observação de toxicidade aguda.

Quadro 7 – Valores de efeitos dos óleos essenciais na pressão artéria de ratos não anestesiados.

Quadro 8 - Constituintes do OEPH- $\beta$ CD

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *P.heptaphyllum*, OEPH.

Tabela 2 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático, após administração oral em dose única de OEPH, em ratos fêmeas.

Tabela 3 – Médias ( $\pm$  desvio padrão) das massas corporais de ratos fêmeas (n=3) tratados via oral com 2000 mg/kg de OEPH antes da exposição, sete e quatorze dias após exposição.

Tabela 4 – Consumo de água e ração dos ratos durante o teste de toxicidade aguda. Tratados com doses de 2000 mg/kg de OEPH, via oral.

Tabela 5 – Médias ( $\pm$  desvio padrão) da massa absoluta dos órgãos de ratos fêmeas (n=3) tratados via oral com 2000 mg/kg de OEPH após quatorze dias de exposição.

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos obtido do soro de ratos tratados com dose única de 2000 mg/kg de OEPH e controle com veículo (salina com tween 80; 0,05%). Após 14 dias.

Tabela 7 - Teor de OEPH complexado em  $\beta$ -ciclodextrina.

Tabela 8 - Resultados das injeções do padrão interno (Limoneno)

Tabela 9 - Resultados das injeções do padrão interno (1,8-Cineol)

Tabela 10 - Resultados das injeções do padrão interno ( $\alpha$ -Terpineol)

Tabela 11 - Teor dos analitos expresso em mg de cada analito em 100mg de complexo de inclusão.

Tabela 12 – Efeito anti-hipertensivo do OEPH (venoso) em ratos hipertensos SHR e ratos normotensos WKY

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - alanina aminotransferase  
ANG - Angiotensinogênio  
ANOVA – Análise de variância  
ANS - Atividade nervosa simpática  
AST - aspartato aminotransferase  
AVE - Acidente vascular encefálico  
Bili-D – Bilirrubina direta  
Bili-T – Bilirrubina total  
Bpm – batimento por minuto  
CD - Ciclodextrina  
DAP - Doença arterial periférica  
DCV - Doença cardiovascular  
DMAPP - Dimetilalil pirofosfato  
DRC - Doença renal crônica  
DS-Rato Dahl sal-sensível  
DXP - 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato  
DXR - Enzima DXP redutoisomerase  
EC50 - Concentração efetiva que causa mortalidade a 50 % do organismo-teste  
ECA - Enzima conversora de angiotensina  
FC - Frequência cardíaca  
HA - Hipertensão arterial  
HAS - Hipertensão arterial sistêmica  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
HMGR - Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase  
IAM - Infarto agudo do miocárdio  
IC - Insuficiência cardíaca  
*IPP - pirofosfato de isopentenila*  
IV - Intravenosa  
IV-TF - Infravermelho com transformada de *Fourrier*  
L-NAME - N<sup>W</sup>-nitro-arginina-metil-ester  
MEP - 2C-metil-Deritritol-4-fosfato  
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2-il-2,5-difeniltetrazólio  
MVA - Via do ácido mevalônico  
NO - Óxido nítrico  
NTS - Núcleo do trato solitário  
OE - Óleos essenciais  
OECD- Organização para Economia Cooperação e Desenvolvimento  
OEPH - Óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand  
OEPH-  $\beta$ CD - Complexo óleo essencial *Protium heptaphyllum* com  $\beta$ -ciclodextrina  
PA - Pressão arterial  
PAM - Pressão arterial media  
PE - Cateteres de polietileno  
PKA- Proteína quinase A  
RPS - Resistência periférica sistêmica  
RTA - Reflectância Total Atenuada  
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos  
SNA - Sistema nervoso autônomo

SNC - Sistema nervoso central  
SR- Rato Dahl sal-resistente  
SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona  
VO – via oral  
WKY – Ratos Wistar Kyoto  
 $\beta$ CD -  $\beta$ -ciclodextrina  
 $\Delta$ PAM- variação da pressão arterial media

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1 Controle fisiológico da pressão arterial.....	17
3.2 Hipertensão arterial.....	22
3.3 Modelos de hipertensão arterial .....	26
3.4 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial.....	29
3.5 Óleos essenciais.....	34
3.6 Considerações sobre <i>Protiumheptaphyllum</i> (Aubl.) March....	35
3.7 Terpenos .....	38
3.8 Ciclodextrina.....	40
4 REFERÊNCIAS .....	43
CAPITULO I - Toxicidade aguda do óleo essencial de <i>Protiumheptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand.	58
RESUMO.....	59
2 INTRODUÇÃO.....	60
3 OBJETIVO.....	64
3.1 Objetivo geral .....	64
3.2 Objetivo específico .....	64
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.1 Material vegetal.....	65
4.2 Avaliação da toxicologia <i>in vivo</i> .....	65
4.3 Toxicologia aguda .....	65
4.3.1 Observação dos sinais de toxicidade ( <i>screening</i> hipocrático)	66
4.3.2 Consumo de água, alimento e avaliação ponderal.....	68
4.3.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos. ....	68
4.4 Avaliação da citotoxicidade do OEPH em células de mamíferos.	69
4.4.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT	69

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
6 RESULTADOS .....	71
6.1 <i>Screening</i> hipocrático .....	71
6.2 Massa corporal dos animais e massa absoluta dos órgãos.....	72
6.3 Exames laboratoriais (hemograma e provas bioquímicas séricas).....	73
6.4 Avaliação da CI <sub>50</sub> .....	75
7 DISCUSSÃO.....	76
8 CONCLUSÕES.....	80
9 REFERÊNCIA .....	81
CAPÍTULO II - Atividade hipotensora do óleo essencial de <i>Protiumheptaphyllum</i> Marchand Aubl.: possível envolvimento de adrenoceptores e receptores muscarínicos	87
 RESUMO.....	 88
2 INTRODUÇÃO.....	89
3 OBJETIVO.....	90
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	91
4.1 Procedimentos gerais de experimentação.....	91
4.1.1. Material vegetal.....	91
4.1.2 Extração do óleo essencial.....	91
4.1.3 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa	91
4.1.4 Animais.....	92
4.1.5 Drogas e reagentes.....	92
4.1.6 Grupos experimentais .....	93
5 ANALISE ESTATÍSTICA.....	95
6 RESULTADOS.....	95
6. 1 Extração do óleo essencial .....	95
6.2 Resultados obtidos com o óleo essencial do <i>Protiumheptaphyllum</i> Marchand	95
6.3 Verificação da participação dos receptores muscarínicos na resposta cardiovascular induzida por OEPH em ratos normotensos não anestesiados.	97

6.4 Envolvimento do bloqueio ganglionar autonômico na resposta hipotensora e bradicardia induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados	99
6.5 Envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados	101
6.6 Envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_1$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados	103
6.7 Envolvimento da participação dos receptores $\beta$ -adrenérgico na resposta hipotensora e bradicardia induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados	105
6 DISCUSSÃO.....	107
7 CONCLUSÃO .....	112
8 REFERENCIAS .....	113
CAPÍTULO III - Efeito anti-hipertensivo do óleo essencial de <i>protiumheptaphyllum</i> livre em ratos SHRedocomplexocom $\beta$ -ciclodextrina em ratos hipertensos L-NAME.	118
RESUMO.....	119
2 INTRODUÇÃO .....	120
3 OBJETIVO.....	122
3.1 Objetivo geral.....	122
3.2 Objetivos específicos .....	122
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	123
4.1 Material vegetal.....	123
4.2 Extração do óleo essencial .....	123
4.3 Animais.....	123
4.4 Preparo do complexo de inclusão por Spray Dryer do OEPH/ $\beta$ CD	124
4.5 Extração dos constituintes complexados na $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD)	124

4.5.1 Extração do óleo complexado.....	124
4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	125
4.7 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas	125
4.8 Parâmetros de validação .....	125
4.9 Modelo de indução da hipertensão arterial por meio do L-NAME	128
4.10 Verificação da pressão arterial média dos animais.....	128
4 ANALISE ESTATÍSTICA.....	128
5 RESULTADOS.....	129
5.1 Espectroscopia de Infravermelho.....	129
5.2 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas	131
5.3 Condições analíticas e curvas de calibração – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas	133
5.4 Efeitos do OEPH sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos SHR e seu controle normotenso WKY por administração IV e verificação do envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH.	137
5.5 Efeitos do OEPH sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos com L-NAME por administração VO.	140
5.6 Efeitos do OEPH- $\beta$ CD sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos com L-NAME por administração VO.	141
6 DISCUSSÃO .....	142
7 CONCLUSÃO .....	146
8 REFERENCIAS.....	147
9 CONCLUSÕES.....	150
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA.....	151
ANEXO.....	152



## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais, extratos e óleos essenciais têm sido empregados na medicina tradicional por séculos, especialmente na América do Sul, África e Ásia. Estima-se que 60% das espécies de plantas com sementes são utilizadas em práticas terapêuticas em diferentes doenças como obesidade, artrite reumatoide, diabetes, malária e distúrbios neurológicos. A composição do óleo essencial é amplamente estudada por seus potenciais benefícios terapêuticos como: prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças inflamatórias, infecções bacterianas e ainda, como agente gastroprotetor, antioxidante e anticonvulsivante (GEBREYOHANNES, 2013; JAMSHIDI-KIA et al, 2018).

O uso e cultivo de plantas como forma medicinal é de grande importância não só por resgatar o patrimônio nativo e cultural, mas também para estimular a população para um maior aproveitamento dos recursos terapêuticos de origem natural e preservar a biodiversidade existente, através do cultivo (RIBEIRO et al., 2017). O próprio conceito de biodiversidade é definido como sendo um “repositório químico, biológico e genético”, uma diversidade considerada incomensurável com possíveis aplicações científicas e tecnológicas em diversas áreas, como por exemplo, na indústria de medicamentos e alimentos. Especificamente a flora tem vastas aplicabilidades em relação à saúde, principalmente como recurso terapêutico direto para as populações, já que é muito comum utilizá-las como insumos medicinais (ZAPPI et al., 2015).

A aplicação do uso das plantas era, até recentemente, baseada apenas na continuidade social e étnica e nas descobertas empíricas, porém, atualmente criaram-se estratégias de pesquisa e validação científica para o estudo das plantas medicinais, com fases clínicas e pré-clínicas de pesquisa (LUNDSTROM et al, 2017; PESSOA et al, 2010).

Estudos e rastreio dos possíveis efeitos medicamentosos das plantas pode ser feito por triagem fitoquímica, podendo revelar diversas estruturas químicas bioativas que produzem ação fisiológica definida no corpo humano ou nos agentes causadores de doenças (LUNDSTROM et al, 2017; PESSOA et al, 2010).

Devido à presença de substâncias fitoquímicas a utilização destas plantas no tratamento tradicional pode ser explicada cientificamente (ZEMAN et al., 2015), por meio de ensaios biológicos em modelos experimentais, evidências etnobotânicas e relatórios de atividades biológicas da planta, levando a possibilidade de descoberta de moléculas, substâncias ou produtos medicinais (EKWUEME et al., 2015). Enquanto os constituintes fitoquímicos primários compreendem aminoácidos, proteínas, clorofila e açúcar, as substâncias fitoquímicas secundárias são compostos bioativos armazenados em estruturas secretórias, isto é, tricomas glandulares, cavidades secretoras e canais de resina encontradas em plantas medicinais, que trabalham para atuar como um sistema de defesa contra doenças, que possam ocorrer nas plantas (GU et al., 2014; EKWUEME et al., 2015; PRAKASH et al., 2015).

O óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae) (OEPH) é um composto que se apresenta líquida à temperatura ambiente, de aspecto oleoso, levemente amarelado, rico em monoterpenos voláteis, possuindo baixa estabilidade quando exposto ao ar, umidade, luz, calor. A sua instabilidade térmica, menor solubilidade em água e sua elevada volatilidade dificultam sua aplicabilidade tecnológica (ALBINO et al., 2017).

Baseado nesta propriedade, diversos óleos essenciais e compostos voláteis passaram a ser complexados com ciclodextrinas, aumentando sua estabilidade, solubilidade aquosa, fotoestabilidade e estabilidade térmica, além de protegê-los da oxidação, diminuir a volatilidade e reduzir efeitos fisiológicos indesejados (SIQUEIRA-LIMA et al., 2017).

Assim, as características do OEPH podem ser melhoradas através da formação do complexo de inclusão do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* com  $\beta$ -Ciclodextrina.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Investigar *iv vivo*, o efeito hipotensor, anti-hipertensivo, adversos e tóxicos do óleo essencial da *Protium heptaphyllum* (OEPh) e do óleo complexado com  $\beta$ -ciclodextrina (OEPh-  $\beta$ CD).

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do OEPh em ratos fêmeas.
- Estimar a citotoxicidade do OEPh em macrófagos de camundongos
- Pesquisar o efeito do OEPh na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos.
- Verificar a participação dos receptores muscarínicos, receptores ganglionares,  $\alpha$ -adrenérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos no efeito do OEPh sobre a PAM e FC de ratos normotensos;
- Caracterizar o efeito anti-hipertensivo do OEPh e do complexo OEPh-  $\beta$ CD sobre a PAM e FC de ratos hipertensos L-NAME.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Controle fisiológico da pressão arterial

O sistema cardiovascular conduz o sangue através dos vasos com o propósito de troca de oxigênio, gás carbônico, nutrientes nos tecidos periféricos e nos pulmões (DAMPNEY, 2016; OSZTHEIMER; FÜLÖP, 2010). Esse sistema é composto pelo coração e dois sistemas vasculares: as circulações sistêmica e pulmonar. O coração, por sua vez, possui os ventrículos direito e esquerdo que funcionam como bombas em série, ejetando sangue através de dois sistemas vasculares – a circulação pulmonar de baixa pressão, onde ocorre a troca gasosa, e a circulação sistêmica que distribui sangue aos órgãos individuais, suprimindo as suas demandas metabólicas. O fluxo e a pressão sanguínea estão sob intenso controle do sistema nervoso autônomo (JOYNER et al, 2016; MARTELLI et al, 2013). Embora uma diminuição do fluxo ocasione uma ameaça imediata para a vida, à elevação contínua da pressão arterial que ocorre com a hipertensão é um contribuinte para a morte prematura por conta de seus efeitos sobre o coração, vasos sanguíneos e rins, por isso, a pressão sanguínea é provavelmente uma das funções do corpo mais variáveis e melhor reguladas (DAMPNEY, 2016; MARTELLI et al, 2013).

A Pressão arterial (PA) depende de fatores físicos como volume sistólico, que é o volume total de sangue ejetado pelo ventrículo durante uma sístole, frequência cardíaca e a resistência periférica, podendo ser definida como a força exercida pelo sangue por unidade de área da parede vascular que é a interação do débito cardíaco (DC) com a resistência periférica sistêmica (RPS), sendo que a manutenção da força motriz da circulação garante perfusão tecidual apropriada (TORTORA ET AL, 2014).

A pressão arterial média (PAM) pode ser definida como sendo o produto entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular sistêmica (RVS) sendo considerado o melhor valor de medida para o grau da pressão de perfusão de um órgão (JOYNER et al 2016; SPEERS-ROESCH et al., 2012). Por causa da maior duração da diástole, o PAM não é a média aritmética da pressão arterial sistólica

(PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), ela está ligada por uma fórmula empírica:  $PAM = 2/3 PAD + 1/3 PAS$  (EHRMANN et al, 2009).

Em geral, a PA é controlada através de um complexo sistema regulatório inter-relacionado, incluindo mecanismos de regulação autonômica central e reflexa comandados pelos ramos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo (SNA), estes sistemas fisiologicamente opostos atuam em conjunto para regular os níveis de PA, modificando a função cardíaca e a vascular, e são controlados pelo centro vasomotor do cérebro (PARATI et al., 2013).

O SNA é integrante do controle e regularização do sistema cardiovascular, sendo este predominantemente eferente, exceto para algumas fibras aferentes que inervam seios carotídeos e os barorreceptores, que são receptores de estiramento, situados nas arborizações terminais das fibras aferentes, que inibe rapidamente o fluxo simpático para o coração e os vasos sanguíneos, estimulando o fluxo cardíaco vagal por meio de vias centrais no tronco encefálico e na medula espinhal (DAMPNEY, 2016). Portanto, um decréscimo na taxa de alimentação dos barorreceptores resulta em um aumento do reflexo na atividade vasomotora simpática, que aumenta a resistência vascular total e um aumento na atividade cardíaca simpática, acompanhado da diminuição da atividade vagal cardíaca, que juntos resultam em um aumento na frequência e contratilidade cardíaca (CLEMSON et al., 2014).

As ações dos nervos autonômicos são mediadas pela liberação de neurotransmissores que se ligam a receptores cardíacos e receptores vasculares específicos. Independentemente da localização anatômica, os barorreceptores funcionam para fornecer os sinais aferentes em um circuito de *feedback* negativo na medula que mantém a PAM em níveis normais (DALY et al, 2012; MOHRMAN; HELLER, 2018). Em um paradigma simplificado, o aumento da PAM leva à estimulação dos barorreceptores, o que, em última instância, leva a atenuação da descarga simpática para os vasos periféricos e para o coração (KOUGIAS et al., 2010). Isso, por sua vez, restaura a PAM para níveis normais. Por outro lado, uma diminuição na PAM descarrega os barorreceptores e leva ao aumento da descarga simpática, podendo variar a resistência periférica e, portanto, a PA, da seguinte forma: a atividade nervosa simpática (ANS) em pequenas artérias e arteríolas provocam vasoconstrição e aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, aumentando a PA, enquanto a constrição mediada pelo SNA de algumas artérias maiores, e

especialmente das veias, age como reservatórios aumentando o retorno venoso para elevar o débito cardíaco (DAMPNEY, 2016).

Os barorreceptores são inervados pelos nervos que fazem sinapse no núcleo do trato solitário (NTS), que é uma área dentro do bulbo raquidiano que regula a PA através da modulação da transmissão parassimpática e simpática (DAMPNEY, 2016). No caso o aumento da PA, promove estimulação dos barorreceptores aórticos e carotídeos, desencadeando uma inibição da descarga simpática, isto estimula a ativação de neurônios simpáticos que se originam no NTS e fazem sinapses na parede arterial externa, ou adventícia. A ativação desses neurônios simpáticos induz a vasoconstrição por meio da liberação de noradrenalina e subsequente ativação de Gq e da via de transdução do sinal  $IP_3$  (GORDAN et al, 2015).

Os terminais barorreceptores não são estimulados somente pelo aumento da PA, são mecanorreceptores que respondem às alterações de estiramento da parede arterial, causadas pelas alterações de pressão dentro dos vasos sanguíneos (MARTELLI et al, 2013; WALLBACH et al., 2016). O principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a deformação mecânica das terminações neurais, decorrente da distensão da parede vascular determinada pela onda de pulso, funcionando como mecanorreceptores (JACOB et al, 2011; WALLBACH et al., 2016).

O sistema colinérgico participa de diversas funções homeostáticas: regulação da pressão arterial; transporte de hormônios reguladores a seus órgãos – alvo; regulação da temperatura corporal e está envolvido em ajustes de estados fisiológicos alterados (HAMPEL et al., 2018).

Existem dois tipos de receptores colinérgicos, os nicotínicos e os muscarínicos. Encontramos os receptores muscarínicos em todas as células alvos do sistema nervoso parassimpático. Já os nicotínicos são encontrados nas sinapses entre os neurônios pré e pós-ganglionares (HAMPEL et al., 2018).

Os receptores colinérgicos nicotínicos (RCN) pertencem à família de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons  $Na^+$  e  $K^+$ . Quando comparado à transmissão sináptica induzida por receptores muscarínicos, nota-se que os RCN medeiam uma transmissão excitatória rápida (VENTURA et al., 2010).

Os receptores muscarínicos estão presentes em vários órgãos e tecidos na periferia (tecido do coração, músculo liso e glândulas exócrinas) e no interior do sistema nervoso central, podem ser classificados como:  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  e  $M_5$  (NEMEROFF, 2004; ROBINSON-DRUMMER et al, 2017). Estes receptores pertencem à superfamília chamados receptores acoplados a proteína G. A ativação dos receptores  $M_1$ ,  $M_2$  e  $M_5$  leva à ativação de proteínas Gs, com a consequente produção do segundo mensageiro AMPc por estimulação de uma ou várias isoformas da enzima adenil ciclase, localizada em uma membrana celular (TELSER, 2002; ROBINSON-DRUMMER et al, 2017). Tem sido relatado, também no SNC, que a ativação dos receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  induzem a produção de outros segundos mensageiros: trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG), por estimulação de uma fosfolipase C (PLC), que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-difosfato ( $PIP_2$ ), um fosfolípido presente na membrana celular (TELSER, 2002; ROBINSON-DRUMMER et al, 2017).

A ativação dos receptores  $M_2$  e  $M_4$  acoplados a proteínas  $G_i/G_o$  inibe a adenilil ciclase diminuindo a formação de AMP cíclico e a cascata da Proteína quinase A (PKA) (NEMEROFF, 2004). Estes receptores quando localizado no terminal pré-sináptico controlam negativamente a liberação de neurotransmissores (GABA, glutamato e acetilcolina) através da ativação dos canais de potássio que hiperpolariza a célula inibindo a ativação de canais de cálcio, necessário para a excitação dos neurotransmissores (RAINE C. S., 2006).

Os receptores  $M_2$  são expressos no coração, especialmente no tecido nodal e atrial. A ligação da acetilcolina aos receptores  $M_2$  leva à diminuição da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) (KRUSE et al., 2014), conseguindo diminuir a taxa de despolarização, bem como, reduzir a velocidade de condução através do nó atrioventricular (GORDAN et al, 2015).

A ativação dos receptores  $M_2$  reduz o débito cardíaco geral e leva à diminuição da força da contratilidade miocárdica (efeito inotrópico negativo). Além disso, a estimulação do sistema parassimpático contribui para a inibição da velocidade de condução do nó átrio-ventricular (efeito dromotrópico negativo) e diminuição da excitabilidade do coração (efeito batmotrópico negativo). É importante notar que a maioria dos vasos sanguíneos no corpo não tem inervação parassimpática, mas os receptores  $M_3$  são principalmente expressos no endotélio vascular (GORDAN et al, 2015; KRUSE et al., 2014). O efeito predominante da

ativação do receptor  $M_3$  é a dilatação dos vasos, estimulando a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais vasculares (GORDAN et al, 2015).

Os adrenoceptores pertencem a uma superfamília de receptores de membrana estritamente relacionados e acoplados às proteínas G (SAENGSAWANG; RASENICK, 2015). A proteína Gs ativada pela ligação do agonista ao receptor  $\beta$ -adrenérgico, além de estimular a adenilil ciclase induzindo a produção de AMPc, atua também diretamente nos canais de  $Ca^{2+}$  do sarcolema, promovendo aumento da permeabilidade de  $Ca^{2+}$  (OLDHAM; HAMM, 2008).

A quinase de proteína A (PKA), ativada pelo AMPc, promove fosforilação dos canais de  $Ca^{2+}$  do sarcolema, da troponina I e da fosfolambano. A atuação da proteína Gs, diretamente nos canais de cálcio do sarcolema, e a fosforilação dos canais de cálcio, via AMPc, promovem aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol, resultando em efeito inotrópico positivo *retículo* (OLDHAM; HAMM, 2008; RAYMOND et al., 1990; SAENGSAWANG; RASENICK, 2015).

A fosforilação da fosfolambano promove desinibição, ativa a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, acarretando maior e mais rápida recaptação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo, o que promove melhora do relaxamento. No entanto, é importante lembrar que a fosforilação da fosfolambano ocorre também pela  $Ca^{2+}$ -calmodulina quinase, enzima que é ativada quando ocorre elevação da concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol. Já a fosforilação da troponina I promove diminuição da sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio, o que induz ao aumento da velocidade de relaxamento celular (OLDHAM; HAMM, 2008; RAYMOND et al., 1990; SAENGSAWANG; RASENICK, 2015; SILVA et al, 2010; MISHRA; LAMBRIGHT, 2016).

Quando a ação  $\beta$ -adrenérgica é exercida sobre o nó sinusal, ela promove efeito cronotrópico e dromotrópico. O efeito cronotrópico, que corresponde a aumento da velocidade de geração de estímulos, é traduzido por aumento do número de batimentos cardíacos, enquanto o dromotrópico, que significa aumento da velocidade de condução do impulso (HELIN; DHANAK, 2013; SAENGSAWANG; RASENICK, 2015).

No sistema cardiovascular existem receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  expressos no coração (a relação  $\beta_1/\beta_2$ -adrenérgico é de cerca de 60 a 70%: 40 a 30% nos átrios e cerca de 70 a 80%: 30 a 20% nos ventrículos) (BRODDE; MICHEL, 1999). O sistema nervoso simpático inerva todo o coração, podendo resultar os seguintes efeitos no mesmo: efeito cronotrópico



positivo (elevação da frequência cardíaca), efeito inotrópico positivo (aumento da contratilidade), efeito dromotrópico positivo (aumento da condução) e efeito batmotrópico positivo (aumento da excitabilidade cardíaca) (KAREMAKER, 2017).

Os receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos são expressos na musculatura lisa vascular proximal e estimulam a vasoconstrição. As fibras nervosas simpáticas liberam, de forma total, a noradrenalina, que ativa os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos e  $\beta_2$ -adrenérgicos nos vasos sanguíneos, proporcionando assim o tônus vascular basal (MOHRMAN; HELLER, 2018).

Como há maior distribuição de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos do que  $\beta_2$ -adrenérgicos nas artérias, a ativação dos nervos simpáticos causa vasoconstrição e aumenta a resistência vascular sistêmica principalmente via ativação do receptor  $\alpha_1$ . Os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos são expressos em músculo liso distal dos terminais nervosos simpáticos. Sua ativação também provoca vasoconstrição (JI et al., 2016; MOHRMAN; HELLER, 2018).

### 3.2 Hipertensão arterial

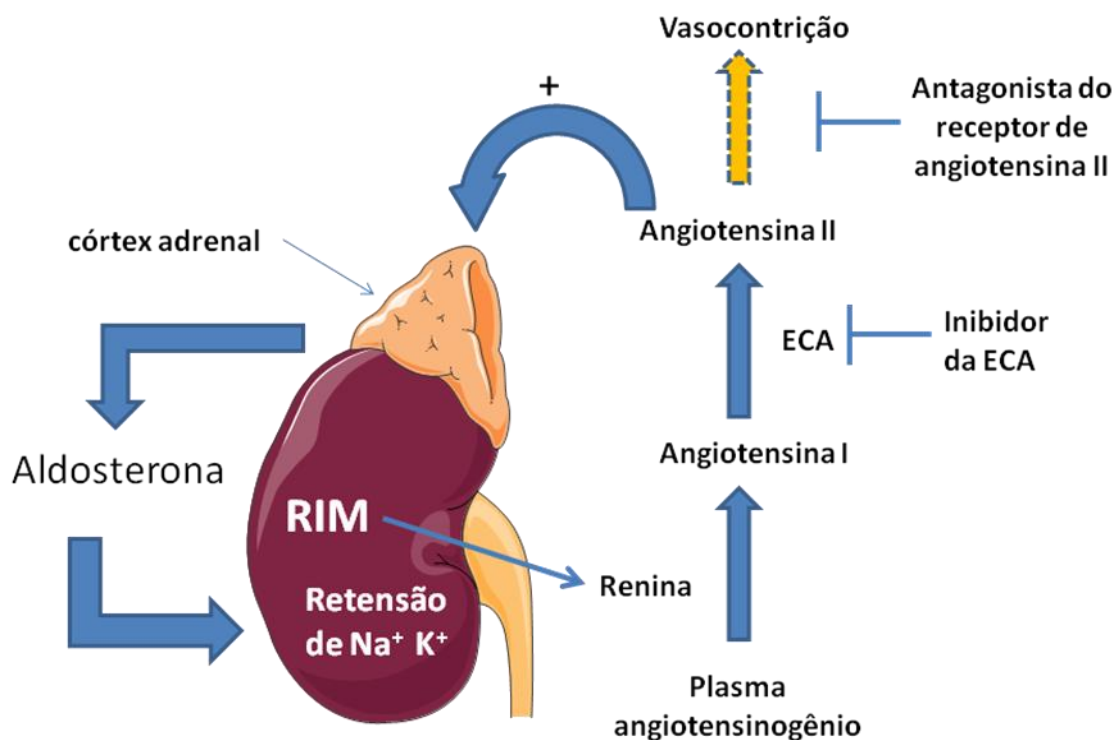
Como citado anteriormente a PA é determinada pela resistência vascular periférica e débito cardíaco, e a sua regulação fisiológica é muito complexa, dependente de um contínuo de ações dos sistemas cardiovascular, neural, renal e endócrino. A alteração dessa regulação pode ocasionar fatores responsáveis pelo desequilíbrio da PA, ocasionando anormalidades precedentes do aumento da PA (JACOB et al, 2011). A melhora na compreensão dos mecanismos subjacentes à hipertensão arterial (HA) e especialmente àqueles que regulam a PA em toda a sua área devem facilitar os avanços na prevenção e tratamento da hipertensão (PADMANABHAN et al, 2015).

O desenvolvimento da HA ocorre quando um dos mecanismos que mantêm a pressão sanguínea em valores considerados saudáveis, deixa de desempenhar a sua função reguladora e está relacionada a vários fatores como predisposição genética e a fatores ambientais sendo considerada a principal causa de doenças cardiovasculares, com eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca (IC), doença arterial periférica (DAP) e doença renal crônica (DRC) fatal e não fatal (KOHAN et al., 2011).

As substâncias que atuam nos receptores  $\alpha$  adrenérgicos modulam a pressão arterial, possuindo subtipos como os receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos que estimulam a liberação de noradrenalina dos terminais nervosos simpáticos, enquanto os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos inibem a liberação de noradrenalina, atuando como mecanismo de retroalimentação para modular sua liberação a partir dos terminais nervosos simpáticos (BRODDE; MICHEL, 1999).

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) em resposta a uma queda na pressão arterial, leva à liberação de renina a partir do aparelho justaglomerular no rim (FERRARIO; MULLICK, 2017; MUÑOZ-DURANGO et al., 2016). A renina cliva o angiotensinogênio (ANG), que sofre nova clivagem para produzir o vasoconstritor altamente potente, a angiotensina 2 (ANG 2) que se liga ao receptor acoplado a proteína G ligado à membrana, o receptor 1 da ANG 2 (AT1), induz a vasoconstrição diretamente através da potenciação da liberação de noradrenalina a partir de terminais nervosos simpáticos nas paredes dos vasos sanguíneos. A inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) bloqueia a produção de ANG 2 e, portanto, exibe efeitos anti-hipertensivos (FERRARIO; MULLICK, 2017). A ANG 2 pode agir indiretamente, estimulando a secreção de vasopressina da glândula pituitária e, estimulando o aumento da liberação de aldosterona do córtex adrenal. Tanto a vasopressina como a aldosterona aumentam a reabsorção de água no rim, aumentando assim o volume sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão sanguínea conforme figura 1 (MUÑOZ-DURANGO et al., 2016).

Figura 1 - A ativação do Sistema renina-angiotensina-aldosterona



Legenda: A ativação do SRAA em resposta a uma queda na pressão arterial estimula a liberação de renina do rim. Isto leva à produção do potente vasoconstritor, angiotensina 2. A angiotensina 2 também induz a liberação de aldosterona do córtex adrenal, desencadeando aumento da reabsorção de água. Juntos, esses mecanismos combatem a diminuição da pressão arterial. Abreviaturas: ECA - enzima conversora de angiotensina. Fonte: Adaptação do esquema de (MUÑOZ-DURANGO et al., 2016).

Segundo a Whelton et al 2017, durante anos a hipertensão foi classificada como uma leitura da PA de 140/90 mmHg ou mais, mas a diretriz atualizada classifica a hipertensão como uma leitura de PA de 130/80 mmHg ou superior como mostrado no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação da pressão arterial

<b>Categoria de PA</b>	<b>Sistólica</b>	<b>Diastólica</b>
Normal	<120 mmHg	<80 mmHg
Elevado	120-129 mmHg	<80 mmHg
Hipertensão estágio 1	130-139 mmHg	80-89 mmHg
Hipertensão estágio 2	≥140 mm Hg	≥90 mm Hg
Hipertensão de urgência	>180 mm Hg	>120 mm Hg
Hipertensão de emergência	>180 mm Hg + dano ao órgão alvo	>120 mm Hg + dano ao órgão alvo

Fonte: WHELTON et al., 2017.

A maioria dos eventos cardiovasculares ocorre em indivíduos com alterações leves dos fatores de risco que, se deixados sem tratamento por muitos anos, podem produzir uma doença manifesta. Vários estudos epidemiológicos e ensaios clínicos já demonstraram a drástica redução da morbidade e mortalidade cardiovascular com o tratamento da hipertensão arterial (GRASSI, 2016a).

Os fenótipos resultantes podem ser modulados por vários fatores ambientais, alterando assim a gravidade da elevação da pressão arterial e o momento do início da hipertensão (MENGUES et al, 2016).

Muitos fatores fisiopatológicos têm sido atribuídos à gênese da hipertensão arterial: aumento da atividade do sistema nervoso simpático, relacionado à maior exposição ou resposta ao estresse psicossocial; superprodução de hormônios e vasoconstritores de retenção de sódio; ingestão elevada de sódio em longo prazo; ingestão dietética inadequada de potássio e cálcio; aumento da secreção de renina, com aumento da produção de ANG 2 e aldosterona; deficiências de vasodilatadores, tais como prostaciclina, óxido nítrico (NO) e peptídeos natriuréticos; alterações na expressão do sistema caliceína-cinina que afetam o tônus vascular e o manuseio renal de sais; anomalias de resistência de vasos, incluindo lesões seletivas na microvasculatura renal; resistência à insulina; obesidade; aumento da atividade de fatores de crescimento vascular; alterações nos receptores adrenérgicos que influenciam a frequência cardíaca, as propriedades inotrópicas do coração e o tônus vascular (MUÑOZ-DURANGO et al., 2016).

### 3.3 Modelos de hipertensão arterial

Atualmente existem vários modelos experimentais utilizados para mimetizar a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Quadros 2 e 3), como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que têm sido amplamente utilizados como um modelo de HAS (CUMMINS et al., 2001).

Nos ratos SHR a resposta hipertensiva inicia-se com o avanço da idade começando por volta das 5-6 semanas de idade, sendo associada a um aumento da resistência periférica total e um DC normal que começa a ser comprometido, quando, começa a reduzir-se em função de uma insuficiência cardíaca, desenvolvendo uma progressiva hipertrofia cardíaca (ATANUR et al., 2010; THOMAS et al., 1997).

Um dos aspectos mais interessantes do SHR é o desarranjo do metabolismo do cálcio. A redução no transporte ativo de cálcio pelo intestino e perda excessiva pela urina podem levar à hipocalcemia (ATANUR et al., 2010).

Os ratos Wistar-Kyoto (WKY) são animais normotensos endogâmicos, derivados da mesma estirpe de rato ancestral que os SHR, foram originalmente derivados de gerações, e mostram diferenças genéticas marcantes. Esse grau de divergência genética entre as duas cepas torna inútil qualquer estudo comparativo (SCHULZ; KREUTZ, 2012). Os WKY têm sido utilizados como o controle genético mais próximo para o SHR, portanto, em todos os estudos os ratos WKY normotensos são usados como controle para o SHR (ATANUR et al., 2010; SAGVOLDEN et al., 2009). Este é considerado um modelo adequado para o estudo dos mecanismos, fisiopatológicos e tratamento de hipertensão arterial essencial ou primária, pois a hipertensão se desenvolve inicialmente sem lesões de órgãos e com alterações hemodinâmicas devido à resistência vascular periférica (PINTO et al., 1998).

Ratos tratados com L-NAME, um potente inibidor da síntese de óxido nítrico, por via oral em até oito semanas, constitui um modelo amplamente utilizado de hipertensão arterial sistêmica (BAYLIS et al., 1992; RAMANATHAN; THEKKUMALAI, 2014). Muitas vezes, a PA é elevada após quatro semanas de tratamento com L-NAME. A administração a longo prazo de inibidores da oxido nítrico sintase (NOS), como o L-NAME, fornece uma nova forma de hipertensão com

dano em órgão-alvo. Estudos descrevem que a hipertensão induzida por L-NAME tem sido associada à lesão endotelial, danos cardíacos e aórticos graves, vasculares e fibrose glomerular (LEONG et al, 2015).

Outro modelo de hipertensão sistêmica seria a utilização de cepas dos ratos Dahl sensíveis ao sal (Dahl-SS), que possuem função anormal dos barorreceptores, mesmo antes dos animais se tornarem hipertensos, possuem também defeito na resposta vasodilatadora renal que acompanha a sobrecarga salina (FINK et al., 1980; GORDON; MARK, 1984).

Os rins de ratos Dahl-SS não têm capacidade de vasodilatar integralmente, apresentando defeito na resposta vasodilatadora renal, desenvolvendo uma hipertensão arterial sistêmica após serem submetidos a uma dieta rica em cloreto de sódio (NaCl 8%). Os ratos Dahl sal-resistente (SR) conseguem manter os níveis pressóricos dentro da normalidade, mesmo submetidos à mesma dieta rica em sódio (DAHL; HEINE, 1961).

O modelo de hipertensão renovascular, pode ser realizado pela constrição de apenas uma artéria renal na presença do rim contralateral, hipertensão de Goldblatt tipo 2 rins e 1 clipe (2R1C), que tem maior atividade de renina plasmática do que ratos hipertensos 1R1C ou por hipertensão produzida pela constrição de uma artéria renal associada à remoção do rim contralateral (hipertensão de Goldblatt tipo 1 rim, 1 clipe: 1R1C). Esses dois modelos elevando a PA devido aos níveis plasmáticos aumentados de renina e ANG 2. (CUMMINS et al., 2001; RAKUAN et al., 2010).

O modelo renopriva, que é feito com uma nefrectomia bilateral; a perinefrítica que decorre da indução de fibrose renal pelo envolvimento do rim com um abrasivo contido por um tecido e liberação do pedículo renal após algumas horas de oclusão total. O modelo de constrição da aorta abdominal examina os fatores mecânicos e neuro-humorais na elevação da pressão arterial (POLLOCK et al., 1993; SALGADO et al 1997).

Entre os modelos de hipertensão neurogênica podemos citar aqueles que envolvem a lesão do núcleo do trato solitário (NTS), e o da deafferentação sino-aórtica, associada, ou não, à desnervação das aferências cardiopulmonares (CUMMINS et al., 2001).

Quadro 2 – Modelo de hipertensão arterial de origem genética ou renal

<b>Modelo</b>	<b>Início da hipertensão</b>	<b>Peculiaridade</b>
Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR)	Inicia após 5 semanas de vida. A hipertensão é influenciada com a idade e fatores ambientais.	O modelo SHR deve ser realizado paralelamente com os controles normotensos ratos Wistar Kyoto (WKY), pois as características distintas de cada linhagem podem mudar.
Ratos da cepa Dahl-SS	Desenvolvem hipertensão arterial após serem submetidos a uma dieta hipersódica.	A hipertensão só se desenvolve após dieta hipersódica.
Hipertensão Experimental de Goldblatt	Desenvolve após obstrução da artéria renal.	A hipertensão pode ser revertida pela remoção do clipe da artéria renal.
Hipertensão perinefrítica	A elevação da pressão arterial ocorre três a cinco semanas após o procedimento cirúrgico.	Não encontrado
Hipertensão renopriva	Desenvolve após nefrectomia bilateral.	Não encontrado

Fonte: FAZAN; SALGADO, 1997

Quadro 3 – Modelos de hipertensão arterial de origem química; obstrutiva ou por lesão neuronal.

<b>Modelo</b>	<b>Início da hipertensão</b>	<b>Peculiaridade</b>
Ratos hipertensos tratados com L-NAME	Observa-se uma instalação rápida da hipertensão já nos primeiros dias de tratamento e, dependendo da dose de L-NAME administrada.	A hipertensão pode ser revertida apenas parcialmente pela interrupção do tratamento.
Hipertensão dependente de mineralocorticóides	A hipertensão inicia após tratamento cronicamente com acetato de desoxicorticosterona.	Observa-se uma reduzida atividade da renina plasmática.
Coartação da aorta	Inicia após a constrição parcial da aorta.	Não encontrado
Hipertensão neurogênica	Inicia após a lesão neuronal.	Induz, em ratos, uma hipertensão fulminante com a morte dos mesmos por edema agudo de pulmão e insuficiência cardíaca.

Fonte: FAZAN; SALGADO, 1997

### 3.4 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial

O tratamento farmacológico da HA é feito atualmente com drogas que podem ser agrupadas em seis classes principais, os diuréticos, inibidores de ação central,  $\beta$ -bloqueadores, os bloqueadores de canais de cálcio, os inibidores da enzima conversora de angiotensina e os bloqueadores dos receptores de angiotensina 2.

Os diuréticos são fármacos que promovem a produção e excreção de urina, compreendendo quatro grupos principais com base em seu local de ação nos rins, incluem agentes que atuam no túbulo proximal, como inibidores da anidrase



carbônica, que têm eficácia anti-hipertensiva limitada; diuréticos de alça; tiazídicos e agentes poupadores de potássio (SHAH et al 2004).

Os Inibidores de ação central são agentes simpatolíticos que exercem uma profunda inibição da descarga neural simpática (sem afetar a função barorreflexa). Eles podem atuar estimulando os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pré-sinápticos no sistema nervoso central, reduzindo o tônus simpático, como a  $\alpha$ -metildopa, que é convertida a  $\alpha$ -metildopamina e posteriormente a  $\alpha$ -metilnorepinefrina. A  $\alpha$ -metilnorepinefrina, assim como a norepinefrina, age como potente agonista dos receptores  $\alpha_2$ . Esse agonismo aos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pré-sinápticos inibe a liberação de norepinefrina, o que posteriormente impede a transmissão nervosa, diminuindo o efluxo simpático para a periferia (BOUSQUET et al, 1984; GRASSI, 2016b; XU et al., 2017).

A clonidina, um derivado imidazolínico, quando administrada por via endovenosa, pode ocasionar uma rápida elevação da pressão arterial, seguida de queda pressórica muito mais prolongada (BOUSQUET et al 1984; GRASSI, 2016b; XU et al., 2017). Essa ação hipertensora inicial ocorre devido à estimulação periférica dos receptores adrenérgicos. Ao passar à barreira hematoencefálica, a clonidina age na medula cerebral pelo mesmo mecanismo de ação da metildopa. Podendo também se ligar aos receptores imidazolínicos, os quais também podem mediar à ação hipotensora. O guanabenz é outro composto que apresenta forte agonismo pelos receptores  $\alpha_2$ . Os inibidores dos receptores imidazolidínicos, como a moxonidina, apesar de também apresentar agonismo aos receptores  $\alpha_2$ , exibe maior afinidade com os sítios de ligação dos receptores imidazolínicos do subtipo I1. Este particular confere a essa droga menos efeitos indesejáveis que a clonidina (GRASSI, 2016a).

Os  $\beta$ -bloqueadores são grupo de fármacos que diminuem o efluxo simpático por antagonizar a ação das catecolaminas nos receptores beta no sistema nervoso central e na periferia. Essencialmente, existem três classes de betabloqueadores: os que bloqueiam os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  não seletivos (propranolol, nadolol), aqueles que bloqueiam preferencialmente os receptores  $\beta_1$  aos  $\beta_2$  (metoprolol, atenolol) e aqueles que apresentam atividade simpatomimética intrínseca (pindolol, acebutolol) (JI et al., 2016; XU et al., 2017).

Há, no entanto, outra classe de beta bloqueadores, que apresenta antagonismo  $\alpha_1$  concomitante (labetalol, carvedilol, nebivolol) (JI et al., 2016; XU et al., 2017). Seu mecanismo anti-hipertensivo envolve diminuição inicial do débito cardíaco, redução da secreção de renina, readaptação dos barorreceptores e diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas. Betabloqueadores de geração mais recente (terceira geração) como o carvedilol e o nebivolol, diferentemente dos  $\beta$ -bloqueadores de primeira e segunda gerações também proporcionam vasodilatação, que no caso do carvedilol decorre em grande parte do efeito de bloqueio concomitante do receptor  $\alpha_1$  adrenérgico e, no caso do nebivolol, de aumento da síntese e liberação endotelial de óxido nítrico (DE CREE et al., 1992; JI et al., 2016).

Os bloqueadores  $\alpha_1$  adrenérgicos desse grupo diminuem a pressão arterial por meio do bloqueio dos receptores  $\alpha_1$  nas arteríolas e vênulas. Em consequência, espera-se maior redução pressórica quando na posição ortostática. A alta seletividade apresentada pelos receptores  $\alpha_1$  parece explicar a menor taquicardia causada por esses agentes quando comparados à fentolamina, um alfa bloqueador não-seletivo. A retenção hídrica e salina ocorre quando esses agentes são usados como monoterapia exemplos de alfa bloqueadores  $\alpha_1$ : prazosin, doxazosin e terazosin (GRASSI, 2016a).

A ação anti-hipertensiva dos antagonistas dos canais de cálcio, como o verapamil e diltiazem, decorre da redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. Apesar do mecanismo final comum, esse grupo é dividido em três subgrupos, com características químicas e farmacológicas diferentes: fenilalquilaminas, benzotiazepinas e diidropiridinas. São anti-hipertensivos eficazes e reduzem a morbidade e mortalidade cardiovasculares. Deve-se dar preferência aos bloqueadores dos canais de cálcio de longa duração de ação intrínseca ou por formulação galênica que permita uma liberação prolongada. Estudo de desfecho reafirmou a eficácia, tolerabilidade e segurança do uso dessa classe de medicamentos no tratamento da hipertensão arterial de pacientes com doença coronariana (LUBSEN et al., 2005).

Um dos fármacos utilizados eficazmente na maioria das emergências hipertensivas é o nitroprussiato de sódio, sendo um poderoso vasodilatador misto

(venoso e arterial) exercendo um efeito direto a nível dos vasos periféricos, de forma autônoma do sistema nervoso vegetativo, levando a uma diminuição quase imediata da pressão arterial. O período de ação ocorre em até 30 segundos sendo as alterações hemodinâmicas visíveis segundos após sua administração. Este apresenta também uma reversibilidade imediata da vasodilatação induzida e após sua interrupção ou redução da velocidade de perfusão, o pico de efeito hipotensivo ocorre em até dois minutos (VEIGA et al., 2016; WEBSTER et al., 2010). Outro fármaco utilizado na emergência hipertensiva é o trimetafan bloqueador ganglionar usado quando se houver intolerância ao NPS (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; VEIGA et al., 2016).

Outro grupo de medicamentos utilizados na hipertensão são os bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona que podem atuar como inibidores de renina, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), antagonistas do receptor AT1 e antagonistas do receptor de mineralocorticóide (MR). A primeira vista, o mecanismo de ação parece simples: eles reduzem a formação ou bloqueiam os efeitos da aldosterona e da Angiotensina 2, evitando assim os efeitos deletérios cardiovasculares destes dois compostos (TE RIET et al., 2015). Outra ação importante da diminuição na produção de angiotensina 2 seria a redução na atividade simpática, justificando a ausência de taquicardia reflexa e a manutenção do débito cardíaco, apesar da significativa queda pressórica. Recentemente, admite-se que a diminuição de angiotensina 2 determinaria também supressão na produção endógena de endotelina e melhora na disfunção endotelial. Atualmente, os inibidores da ECA contribuem de forma importante para o controle da hipertensão e para reduzir a mortalidade na insuficiência cardíaca congestiva (MUSTONEN et al., 2004).

Vários fármacos são produtos naturais ou derivados deles, por exemplo: o primeiro fármaco sintético, o ácido acetil salicílico, inspirado na salicina, um glicosídeo natural isolado de *Salix alba* e usado desde os tempos de Hipócrates como anti-inflamatório, a síntese de analgésicos locais como a procaína, um produto derivado da cocaína, cloroquina, um potente medicamento antimalárica desenvolvido durante a 2ª guerra mundial, morfina, codeína e tebaína extraída da flor da papoula (*Papaver somniferum*) (DUARTE, 2005); Captopril, desenvolvido a partir de uma substância encontrada no veneno da jararaca, utilizado como anti-

hipertensivo (ONDETTI et al., 1971); Atropina, que é extraída da *Atropa belladonna*, usada como antiespasmódico (LOPES et al, 2015); Efedrina, que é extraída da *Ephedra sinica*, e é usada como broncodilatador e descongestionante (FORTE et al., 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Como todos os medicamentos, os fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia, dos riscos de seu uso, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (GARTLAND; GARTLAND, 2018). Esses produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (TOLEDO, et al., 2016).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal que possui uma variedade de moléculas complexas que constituem os metabólitos secundários, é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (RAQUEL; MONTEIRO, 2008).

Apesar da existência de vários fármacos para o tratamento de hipertensão, cada vez se busca novas drogas, em vista que esta doença é uma das principais causas de morte em adultos. Os produtos naturais têm uma grande importância na produção desses fármacos por serem mais acessíveis, eficazes e menos tóxicos. Portanto, torna-se necessário investir em novos estudos para identificar substâncias eficazes que possam oferecer novas ações anti-hipertensivas.

### 3.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são compostos bioativos complexos, de baixo peso molecular, hidrofóbicos, raramente coloridos e caracterizados por possuírem um forte odor de substâncias aromáticas voláteis (AKHTAR et al, 2014). Essas substâncias possuem um papel importante na proteção da fitodiversidade como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o seu apetite para tais plantas (BAKKALI et al., 2008; MURTHY et al., 2016). Contudo podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir os insetos indesejáveis. Normalmente são lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com uma densidade geralmente inferior à da água (MURTHY et al., 2016).

Os OE podem ser produzidos em toda a planta e armazenados em células secretórias, cavidades e canais como células epidérmicas, tricomas glandulares, glândulas, pêlos glandulares, dutos de óleo, dutos de resina e geralmente eles podem ocorrer em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira, seiva ou casca (AKHTAR et al, 2014; MURTHY et al., 2016). Existem vários métodos de extração de óleos essenciais, sendo a destilação (hidrodestilação, destilação a vapor, hidrodifusão), a extração de solventes, enfleurage e a prensagem a frio, métodos mais ou menos tradicionais e geralmente utilizados para extração de óleos essenciais (RASSEM et al, 2016; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 10% são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e perfumaria (MURTHY et al., 2016). Quimicamente, OEs podem constituir entre 20 a 100 metabolitos secundários pertencentes a uma variedade de classes químicas (CARSON; HAMMER, 2010). Entre estas temos os terpenoides e fenilpropanoides, que formam os constituintes principais dos óleos essenciais, apresentam também alguns constituintes aromáticos e alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos, benzenoides (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Na maioria das vezes, as bioatividades de um OE particular são exercidas por um ou dois dos seus principais componentes (BAKKALI et al., 2008; RAUT;

KARUPPAYIL, 2014). Mas, por vezes, a atividade global não pode ser atribuída a qualquer dos principais constituintes e a presença de uma combinação de moléculas modifica a atividade para exercer um efeito significativo (ISMAN et al, 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

### 3.6 Considerações sobre *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

Muitas espécies vegetais possuem variadas substâncias triterpenoídicas, presentes nos seus órgãos, as quais devem desempenhar diferentes papéis. Alguns gêneros da família Burseraceae são produtores de resinas oleosas (*Elaphrium*, *Icica*, *Canarium* e *Protium*). Estas resinas são constituídas de triterpenos tetracíclicos, como os ácidos elemadienólico e elemadienônico, e pentacíclicos, como  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, maniladiol e breína entre outros (MAGALHÃES MAIA et al., 2000).

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (figura 2), Burseraceae, é conhecida como almécega, breu branco, almíscar, almécega do Brasil, goma-limão. Originada na América do Sul, pode ser encontrada em toda a região amazônica e segrega uma resina oleosa, composta de uma mistura de triterpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (ALBINO et al., 2017).

A família Burseraceae é uma conhecida fonte de exsudatos e resinas ricas em substâncias aromáticas que são utilizadas para fins medicinais e industriais. Na medicina popular, gomas, óleos e resina de espécies de *Protium* são usados para vários fins, como por exemplo, tônico, estimulante, antiulcerosos, analgésico, cicatrizante e anti-inflamatórios (MAGALHÃES MAIA et al., 2000; SIANI et al., 1999).

Com base no levantamento bibliográfico referente ao estudo químico dos componentes voláteis das espécies de *Protium*, observou-se que a espécie desse gênero botânico tem sido investigada quanto à sua ação anti-inflamatória, antioxidante, acaricida, citotóxica, antimicrobiana, antinoceptiva e contra o trematódeo causador da esquistossomose, ansiolítico, sedativo e efeito vasorelaxante (ARAGÃO et al., 2006; MAGALHÃES MAIA et al., 2000; SIANI et al., 1999; STETCIURA et al., 2014).

Figura 2 - Fotografia da espécie *Protium heptaphyllum* March



Fonte: DALY et al, 2012

Particularmente *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, é rica em triterpenos, que na amostra analisada incluem de forma majoritária:  $\alpha$ -felandreno, que possui efeitos que atenuam a inflamação e tem ação antinociceptiva (LIMA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2016); *p*-cimeno, que possui efeitos vasorrelaxantes em aorta de rato (SILVA et al., 2015);  $\beta$ -limoneno, possui efeito que atenua a pressão arterial e ação antioxidante (SUN, 2007). Da Silva et al (2016) investigaram a ação do  $\alpha$ -terpineol, que induz a retenção gástrica de líquidos inibindo as vias parassimpáticas vagais em ratos, possuindo também efeito hipotensor (SABINO et al., 2013).

Os constituintes químicos do óleo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (OEPH) utilizado na pesquisa estão listados na Tabela 1 abaixo. Dentre eles existem alguns monoterpenos com atividades no sistema cardiovascular como: *p*-cimen-8-ol,

$\beta$ -limoneno; *p*-cimeno,  $\beta$ -pineno, 4-terpineol e Eucaptol (SANTOS et al., 2011; SOARES et al., 2005).

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *P. heptaphyllum*, OEPH.

Constituintes	IK*	Área (%) OEPH - Com. Resinas
$\alpha$ -tujeno	924	0,19
$\alpha$ -pineno	932	0,71
Sabineno	969	0,48
$\beta$ -pineno	971	0,29
$\alpha$ -felandreno	1002	1,42
3-careno	1008	5,11
<i>p</i> -cimeno	1019	17,04
Limoneno	1023	34,51
Eucaliptol	1025	20,64
$\beta$ -linalol	1095	0,83
Oxido limoneno	1132	0,35
<i>trans</i> -pinocarveol	1135	Nd
Cânfora	1141	Nd
4-terpineol	1174	1,12
<i>p</i> -cimen-8-ol	1179	1,50
Criptona	1183	0,80
$\alpha$ -terpineol	1186	9,75
<i>trans</i> -carveol	1215	1,21
Cuminal	1238	0,40
Carvona	1239	1,63
Piperitona	1249	0,73
Espatulenol	1577	Nd
$\beta$ -sinensal	1755	1,29

A identificação dos constituintes foi realizada comparando o índice de retenção (IR) e o padrão de fragmentação dos espectros de massa com os dados da literatura e com o banco de dados do sistema de análise. \* Índice teórico de Kovat.

nd = não detectado ou baixa abundância relativa.

Fonte: MOBIN et al., 2017.



### 3.7 Terpenos

Os terpenos distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Representam a segunda maior classe de metabólitos secundários com maior número de constituintes ativos (ADLARD, 2010). Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (MCANDREW et al., 2011).

São sintetizados no citoplasma e plastídios de células vegetais pela via do ácido mevalônico (MVA), e através da ação da enzima IPP-isomerase, pode produzir o dimetilalil pirofosfato (DMAPP). O DMAPP, por meio de duas rotas metabólicas distintas – via do mevalonato e via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP) – originam os diferentes terpenos (KITAOKA et al., 2015). Dessa forma, os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que sua estrutura possui e pelo grau de ciclização da molécula, ou seja, como acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos (Figura 2) (DEWICK, 2002; KRIVORUCHKO; NIELSEN, 2015).

Os monoterpenos e sesquiterpenos, com estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam volatilidade acentuada. Essa característica, por sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2011). Por outro lado, moléculas de tamanho superior aos sesquiterpenos, devido ao tamanho da cadeia, praticamente não contribuem com o aroma, embora o catabolismo de tetraterpenos (C<sub>40</sub>) possa fornecer norisoprenoides de 10 e 13 carbonos de importante contribuição para o aroma de alguns produtos de origem vegetal (BERGER, 2007).

As classes di- e triterpenos são tidas como um dos componentes principais de oleorresinas – uma secreção constituída basicamente de óleo essencial e resina – obtida de diferentes tipos de plantas. No que diz respeito aos tetraterpenos ou carotenoides, esses compostos são pigmentos de ampla distribuição na natureza, responsável por conferir a coloração de diferentes plantas, vegetais e alimentos. Existe uma extensa variedade de tetraterpenos descritos,

sendo os mesmos divididos em carotenos (terpenos) e xantofilas (terpenoides) (GU et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; PRAKASH et al., 2015).

Os triterpenóides constitui a segunda maior classe de metabolitos secundários, com mais de 100 esqueletos de carbono, identificados em organismos vivos, terrestres e marinhos e possuem maiores números de substâncias ativas, incluindo uma grande diversidade estrutural. Esta classe de produtos naturais, incluindo triterpenos, esteróides, limonóides, quassinoides e saponinas triterpenoidais, consistem em mais de 30.000 compostos isolados e identificados (SANDJO; KUETE, 2013). A maioria dos esqueletos triterpênicos são tetracíclos, contendo três anéis de seis membros e um de cinco membros, e pentacíclos, quer com quatro anéis de seis membros e cinco de cinco membros ou cinco anéis de seis membros. No entanto, as estruturas acíclicas, mono-, di-, tri- e hexa- cíclicos também foram isolados e identificados a partir de fontes naturais (SANDJO; KUETE, 2013; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os esteroides possuem uma estrutura de ciclopenta fenantreno parcialmente ou parcialmente reduzido, por vezes com grupos metilo em C-10 e C-13. No entanto, a espinha dorsal da cadeia lateral em C-17, o seu comprimento e a estereoquímica de alguns dos seus centros quirais levam a diferentes esqueletos de esteroides (SANDJO e KUETE, 2013).

Vários terpenos possuem potencial efeito no sistema cardiovascular, podendo promover entre outras ações, vasorrelaxamento, diminuição da frequência cardíaca e hipotensão. Assim, estes terpenoides podem ser úteis como agentes para prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2011).

A descoberta de novos medicamentos esta diretamente ligada às inovações científicas e tecnológicas. Os avanços expressivos da Química e Biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas fisiológicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de formulações terapêuticas notáveis (GUIDO et al, 2010).

A biotecnologia tem aplicação em diversos setores industriais e de serviços como na indústria farmacêutica, no setor químico, além da área de nanotecnologia e saúde (RAMOS et al, 2008). A utilização e desenvolvimento da nanotecnologia envolvida na indústria farmacêutica é uma nova opção tecnológica

que apresenta caminhos inovadores para a ampliação da eficácia terapêutica de fármacos. Há um crescente estudo destas estruturas nanométricas devido às inúmeras vantagens em relação aos sistemas farmacêuticos convencionais (DE OLIVEIRA et al., 2012). A ciclodextrina (CD), que é uma nanopartícula, é atualmente um dos carreadores de moléculas mais estudados, atraindo a atenção de investigadores tanto no campo de pesquisa como no campo de tecnologias aplicadas (VENTURINI et al., 2008).

### 3.8 Ciclodextrina

No ano de 1891, o cientista francês A. Villiers isolou pela primeira vez ciclodextrina (CD) como produto de degradação enzimática bacteriana de amido e denominou esta dextrina de "celulosina". Em 1903, o microbiologista austríaco Franz Schardinger, foi o primeiro a detalhar a produção da ciclodextrina, identificando dois compostos cristalinos (A, B) semelhantes à celulosina a partir da digestão bacteriana do amido de batata e substituiu o nome "celulosina" por  $\alpha$ -dextrina e  $\beta$ -dextrina. Estes foram mais tarde conhecidos como  $\alpha$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina. Após 1935, Freudenberg e Cramer sugeriram a existência da  $\gamma$ -ciclodextrina (DAS et al., 2013).

A CD é um polímero de estrutura cíclica constituída de unidade D-glucopiranoose, estabelecendo ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4), atóxico, com cavidade interna lipofílica e superfície exterior hidrofílica. A sua cavidade interna possui capacidade de formar composição de inclusão, que confere propriedades únicas (capacidade de solubilização aumentada) e, pode ser utilizadas como solubilizantes de fármacos pouco solúveis em formas de dosagem líquidas ou sólidas (JONES et al., 2016).

As CD naturais obtidas com maior rendimento são as  $\alpha$ CD;  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD, com respectivamente 6, 7 e 8 unidades de glicose. Devido à formação de cadeias de unidades de glucopiranoose, as moléculas de ciclodextrina têm a forma de cones, com grupos hidroxilo secundários, que se estendem a partir da borda mais larga e os grupos primários da borda mais estreita, dando às moléculas de CDs uma superfície exterior hidrofílica, enquanto a lipofilidade da sua cavidade central é comparável a uma solução etanólica aquosa (LAI et al, 2017). As CD tem solubilidade aquosa limitada devido à forte ligação intermolecular de hidrogênio no

estado cristalino, têm biodisponibilidade oral muito baixa (abaixo de 4%) e são metabolizados no trato gastrointestinal, principalmente por digestão bacteriana, para formar oligossacarídeos, monossacarídeos e gases, como: hidrogênio, dióxido de carbono e metano (ANDRADE et al., 2017; JONES et al., 2016). Sabe-se que a taxa de degradação de CD no trato gastrointestinal pode ser prejudicada pela formação de complexos de inclusão. O  $\alpha$ -CD natural e  $\beta$ -CD, ao contrário do  $\gamma$ -CD não podem ser hidrolisados por saliva humana e amilases pancreáticas; embora todos os três sejam submetidos à fermentação pelo microrganismo intestinal (JAMBHEKAR; BREEN, 2016; JONES et al., 2016; LIN et al., 2014).

A CD natural e os seus derivados são utilizados em formulações tópicas e orais, mas apenas  $\alpha$ -CD e os derivados hidrofílicos de  $\beta$  e  $\gamma$ -CD podem ser utilizados em formulações parentéricas. A  $\gamma$ -CD forma agregados visíveis em solução aquosa e não é adequada para formulações parentéricas (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Devido à sua nefrotoxicidade, a  $\beta$ -ciclodextrina não pode ser utilizada em formulações parentéricas (LIN et al., 2014). Em soluções aquosas, as CD são capazes de formar complexos de inclusão com muitos fármacos, hospedando estas moléculas do fármaco ou alguma parte lipofílica da molécula, na cavidade central (ERDOĞAR; BILENSOY, 2014). Nenhuma ligação covalente é formada ou quebrada durante a formação do complexo, e as moléculas do fármaco no complexo estão em rápido equilíbrio com as moléculas livres (LAI et al, 2017).

As forças motrizes para a formação do complexo incluem liberação de moléculas de água rica em entalpia da cavidade, ligação de hidrogênio, interação de Van der Waals, interação de transferência de carga, ligações hidrofóbicas, interações eletrostáticas. As propriedades físico-químicas da molécula de ciclodextrina livre diferem das do complexo. Variedades de moléculas orgânicas podem ser incluídas nas cavidades de CD, uma vez que têm uma forma de cone truncada. Os complexos de inclusão são formados devido à associação entre agente ativo e ciclodextrina. Na cavidade hidrofílica da CD, as moléculas de água estão no ambiente que é energeticamente desfavorável. Quando essas moléculas de água são substituídas por uma molécula convidada com tamanho, forma e polaridade adequada para estrutura de CD, complexo de inclusão são formados (SUVARNA et al, 2017).

Este processo energeticamente favorável leva a melhoria da estabilidade do complexo porque traz uma mudança em entalpia e reduz a energia total do sistema. A CD pode formar complexos de inclusão com moléculas de solubilidade aquosa fraca, tal como fitoquímicos, melhoram solubilidade, protegem compostos bioativos de vários estresses ambientais, como temperatura, pH, luz., diminui as concentrações do composto necessário para alcançar um efeito terapêutico desejado e podem retardar ou prolongar a taxa de entrega e modificar o comportamento das moléculas. Podem também eliminar as ações toxicológicas ou irritantes das substâncias ativas e podem também substituir excipientes como solventes orgânicos, substâncias solubilizantes (BRAGAN; CARVALHO, 2014; SUVARNA et al 2017).

Os óleos essenciais e terpenos complexados com CD melhoraram a biodisponibilidade, a solubilidade e aumentaram a eficiência da dose, tendo assim uma melhor eficácia farmacológica. Estes são provavelmente os benefícios mais promissores deste tipo de droga (LIMA et al., 2016).

Apesar da atividade farmacológica do OEPH já ser descrita, seu uso acaba sendo limitado devido à alta instabilidade, volatilidade e a baixa solubilidade em água. Dentre as técnicas de encapsulação usadas para aumentar a estabilidade e solubilidade em água de substâncias voláteis como os monoterpenos, que são os principais constituintes dos óleos essenciais, as que têm se mostrado mais efetivas são as que empregam as CD, que diminuem também a sublimação e volatilização do óleo (DAVIS; BREWSTER, 2004; RUNGSARDTHONG et al., 2011).

Baseado nesta propriedade, o OEPH complexado com CD, pode aumentar sua estabilidade, solubilidade aquosa, fotoestabilidade e estabilidade térmica, além de protegê-lo da oxidação, mascarar ou reduzir efeitos fisiológicos indesejados, bem como reduzir sua volatilidade e melhorar a absorção dos dos metabolitos secundários.

## 4 REFERÊNCIAS

ADLARD, E. R. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. **Chromatographia**, 2010.

AKHTAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v.2, n.1, p.1-7, 2014.

ALBINO, R. C. et al. Oxidation of monoterpenes in Protium heptaphyllum oleoresins. **Phytochemistry**, v. 136, p. 141-146, 2017.

ANDRADE, T. A et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.89, 2017.

ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.85, n.4, 2006.

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

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n.2, p.446-475, 2008

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, n.1, p.278-281, 1992.

BERGER, R. G. Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability, 2007.

BOUSQUET, P; FELDMAN, J; SCHWARTZ, J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.230, n.1, p.232-236, 1984.

BRAGAN, L.; CARVALHO, D. E. **Uso de Ciclodextrina na Formação de Complexos de Inclusão com o Hormônio Masculinizante 17-A-Metiltestosterona**. Dissertação (dissertação em agroquímica), Lavras-MG, p.32, 2014.

BRODDE, O E; MICHEL, M C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacological reviews**, v.51, n.4, p. 651-690, 1999.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. **Lipids Essent. Oils as Antimicrob. Agents**, 2010.

CLEMSON, P. T. et al. Action of the sympathetic and parasympathetic nervous system on cardiovascular dynamics revealed by blocking drugs. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/6847587>> acesso em 04/04/2019.

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.

DA SILVA, M. T. B. et al.  $\alpha$ -Terpineol induces gastric retention of liquids by inhibiting Vagal parasympathetic pathways in rats. **Planta Medica**, v.82, n.15, 2016.

DAHL, L.K.; HEINE, M. Effects of chronic excess salt feeding: Enhanced hypertensogenic effect of sea salt over sodium chloride. **The Journal of experimental medicine**, v.113, p.1067-1076, 1961.

DALY, D. C. de B.; FINE, P. V. A.; MARTÍNEZ-HABIBE, M. C. Burseraceae: um modelo para estudos da flora Amazônica. **Rodriguésia - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012. Disponível em <<https://rodriguesia-seer.jbrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/346>> Acessado em 10/03/2019

DAMPNEY, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n.3, p. 283-296, 2016.

DAS, S. K.; RAJABALAYA, R.; DAVID, S.; GANI, N., KHANAM, J.; NANDA, A.; Cyclodextrins-the molecular container. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.4, n.2, 2013.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.3, n.2, 2004

DE CREE; VAN NUETEN L.; GEUKENS H.; VERHAEGEN H. Comparative cardiac haemodynamics of bisoprolol, celiprolol, carvedilol and nebivolol in normal volunteers. **Int J Clin Pharmacol Res**, v.12, n.4, p.159-163, 1992.

DE OLIVEIRA, L. C. et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2012.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v.19, n.2, 2002.

DUARTE, D. F. Opium and Opioids: A brief History. **Rev Bras Anesthesiol**, v.51, n.1, 2005.

EHRMANN, S.; LAKHAL, K.; BOULAIN, T. Pression artérielle non invasive : principes et indications aux urgences et en réanimation. **Reanimation**. v.18., n.3, p.267-273, 2009.



EKWUEME, F. N. et al. Qualitative and Quantitative Phytochemical Screening of the Aqueous Leaf Extract of *Senna mimosoides*: Its Effect in in vivo Leukocyte mobilization induced by inflammatory stimulus. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.5, p.1176-1188, 2015.

ERDOĞAR, N.; BILENSOY, E. Cyclodextrins in drug delivery. *Nanotechnol. Drug Deliv.* Vol. 1 **Nanoplatfoms Drug Deliv.**, 2014.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. History and future of food irradiation. **Trends in Food Science and Technology**. v.22, n.2-3, p.121-126, 2011

FERRARIO, C. M.; MULLICK, A. E. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacological Research**. v.125, p.57-71, 2017

FINK, G. D.; TAKESHITA, A.; MARK, A.L.; BRODY, M.J. Determinants of renal vascular resistance in the dahl strain of genetically hypertensive rat. **Hypertension**, v.2, p. 274-280, 1980.

FORTE, R. Y. Infarto do miocárdio em atleta jovem associado ao uso de suplemento dietético rico em efedrina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, n.5, p.179-181, 2006.

GARTLAND, K. M.A.; GARTLAND, J. S. Opportunities in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.282, p.38-45, 2018.

GEBREYOHANNES, G.; GEBREYOHANNES, M. Medicinal values of garlic: A review. **International Journal**, p. 401-408, 2013.

GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K; XIE, L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World Journal of Cardiology**, v.7, n.4, p.204-2014, 2015.

GORDON, F. J.; MARK, A. L. Mechanism of impaired baroreflex control in prehypertensive Dahl salt-sensitive rats. **Circulation Research**, v.54, n.4, p. 378-387, 1984.

GRASSI, G. State of the art Sympathomodulatory Effects of Antihypertensive Drug Treatment. v. 29, n. June, p. 665–675, 2016a.

\_\_\_\_\_. Sympathomodulatory Effects of Antihypertensive Drug Treatment. **American Journal of Hypertension**, v.29, n.6, 2016b.

GU, R.; WANG, Y.; LONG, B.; KENNELLY, E.; WU, S.; LIU, B.; LONG, C. Prospecting for Bioactive Constituents from Traditional Medicinal Plants through Ethnobotanical Approaches. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.6, p.903-915, 2014.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, 2010.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**. v.141, n.7, p.1917-1933, 2018

HELIN, K.; DHANAK, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. **Nature**. , v.502, n.7472, p. 480-488, 2013

ISMAN, M. B.; WILSON, J. A.; BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.1-2, 2008.

JACOB, J.J.; CHOPRA, S.; BABY, C. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.15, p.281-288, 2011.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency. **Drug Discovery Today**. v.21, n.2, 2016

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbed Pharmacology**, v.7 n.1, p 1-7, 2018.

JI, Y.; WANG et al. Oral atenolol therapy for proliferating infantile hemangioma A prospective study. **Medicine (United States)**, v.95, n.24, 2016.

JONES, D. S.; MOYA-ORTEGA M.D.; ALVAREZ-LORENZO C.; CONCHEIRO, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.68, n.5, p. 544-555, 2016

JOYNER, M. J.; WALLIN, B. G.; CHARKOUDIAN, N. Sex differences and blood pressure regulation in humans. **Experimental Physiology**, v.101, n.03, p. 349-355, 2016.

KAREMAKER, J. M. An introduction into autonomic nervous function. **Physiological Measurement**. v.38,n.5, p.89-118., 2017

KITAOKA, N.; LU X.; YANG B.; PETERS R.J. The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. **Molecular Plant**. V.8, n.1, p.6-16, 2015

KOHAN, D. E.; ROSSI, N.F.; INSCHO, E.W.; POLLOCK, D.M. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 71-77, 2011.

KOUGIAS, P. et al. Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v.16, n.1, p. 1-8, 2010.

KRIVORUCHKO, A.; NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.35, p.7-15, 2015.

KRUSE, A. C. et al. Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.13, n.7, p.549-560, 2014.

LAI, W. F.; ROGACH, A. L.; WONG, W. T. Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. **Chemical Society Reviews**. V.46, n.20, 2017.

LEONG, X. F.; CHUN Y.N.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**. v.2015, p.11, 2015

LIMA, D. F. et al. Antinociceptive activity of the monoterpene  $\alpha$ -phellandrene in rodents: Possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, n.2, 2012.

LIMA; L.A.M. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**. v.20, n.151, 2016

LIN, C.; et al. A novel oral delivery system consisting in “drug-in cyclodextrin-in nanostructured lipid carriers” for poorly water-soluble drug: Vinpocetine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.465, n.2, 2014.

LOPES, M. A.; NOGUEIRA, I. S.; OBICI, S. Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa “Estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p. 707-706, 2015.

LUBSEN, J. et al. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with symptomatic stable angina and hypertension: The ACTION trial. **Journal of Hypertension**, v.23, n.3, p. 641-648, 2005.

LUNDSTROM, K.; PHAM, H.; DINH, L. Interaction of Plant Extracts with Central Nervous System Receptors. **Medicines**, v.4, n.1, 2017.

MAGALHÃES MAIA, R.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de protium heptaphyllum March (Bourseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Quimica Nova**, v.23, n.5, 2000.

MAGNOTTA, Mary et al. Expression of deacetylindoline-4-O-acetyltransferase in Catharanthus roseus hairy roots. **Phytochemistry**, 2007.

MARTELLI, A.; GUAÇU, M., Brasil. Baroreflexes and blood pressure homeostasis. **Rev HCPA Revista HCPA**, v.14, n.4, 212-215, 2013.

MCANDREW, R. P. et al. Structure of a three-domain sesquiterpene synthase: A prospective target for advanced biofuels production. **Structure**, v.19, n.12, 2011.

MENGUE, S.S. et al. Acesso e uso de medicamentos para hipertensão arterial no Brasil. v.50, n. supl 2, p. 1–9, 2016.

MISHRA, A. K.; LAMBRIGHT, D. G. Invited review: Small GTPases and their GAPs. **Biopolymers**, v.105, n. 8, p. 431-438, 2016

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

MOHRMAN, D. E.; HELLER, L. J.. Overview of the Cardiovascular System. **Cardiovasc. Physiol.** 9e, 2018. Disponível em:

<<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=843&sectionid=48779649>> acessado em: 03/01/2019

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. v.43, n.2, **Pharmacological reviews**, 1991.

MUÑOZ-DURANGO, N.; FUENTES, C.A.; CASTILO, A.E.; KALERGIS, A.M. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system beyond blood pressure regulation: Molecular and cellular mechanisms involved in end-organ damage during arterial hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, n.7, 2016

MURTHY, K S. R. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae : A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2016.

MUSTONEN, J. et al. Angiotensin-Receptor Blockade versus Converting–Enzyme Inhibition in Type 2 Diabetes and Nephropathy. **New England Journal of Medicine**, v.351, n.19, 2004.

NEMEROFF, CHARLES B. The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 8th ed. **American Journal of Psychiatry**, v.5, n.2, 2004.

OLDHAM, W. M.; HAMM, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** , v.9, n.1, p.60-71, 2008.

ONDETTI, M. A. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors from the Venom of Bothrops jararaca. Isolation, Elucidation of Structure, and Synthesis. V.10, n.22, **Biochemistry**, 1971.

OSZTHEIMER, I.; FÜLÖP, G. Cardiovascular system. **Handb. Phys. Med. Biol.**, 2010.

PADMANABHAN, S.; CAULFIELD, M.; DOMINICZAK, A. F. Genetic and Molecular Aspects of Hypertension. **Circulation Research**. v.116, n.6, p.937-959, 2015

PARATI, G.; OCHOA, J.E.; LOMBARD, C.; BILO, G. Assessment and management of blood-pressure variability. **Nature Reviews Cardiology**. v.10, n.3, p.143-155, 2013

PESSOA, C.; MORAES, M.; MORAES, M. O., A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**. v.39, n.1, p.77-88, 1998

POLLOCK, D. M. POLAKOWSKI J.S., DIVISH B.J., OPGENORTH T.J. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**, v.21, n.5, p. 660-666, 1993.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K.. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**. v.47, p. 381-391, 2015

RAINE C. S. Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 2006. Disponível em <<https://www.elsevier.com/books/basic-neurochemistry/brady/978-0-12-374947-5>> acessado em:09/02/2019.

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.

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.

RAMOS, B. G. Z.; PASA, T. B. C.. O desenvolvimento da nanotecnologia: cen-rio mundial e nacional de investimentos. **Rev. Bras. Farm**, v.36, n.2, 2008.

RAQUEL, A.; MONTEIRO, M. Produtos à base de plantas dispensados em ervanárias para o emagrecimento: efeitos terapêuticos, toxicologia e legislação. 2008.

RASSEM, H. H. A.; NOUR, A. H.; YUNUS, Rosli M. Techniques for extraction of essential oils from plants : A review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.10, n.16, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. v.62, p.250-264, 2014

RAYMOND, J. R. Adrenergic receptors: Models for regulation of signal transduction processes. **Hypertension**, v.15, n.2, p.119-131, 1990

RIBEIRO, R.; BIESKI I.; BALOGUN S.; MARTINS D.. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. n. 205, p.69-102, **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

ROBINSON-DRUMMER, P. A.; HEROUX, N. A.; STANTON, M. E. Antagonism of muscarinic acetylcholine receptors in medial prefrontal cortex disrupts the context preexposure facilitation effect. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.143, p.27-35, 2017.



RUNGSARDTHONG R. et al. Encapsulation of Citral Isomers in Extracted Lemongrass Oil with Cyclodextrins: Molecular Modeling and Physicochemical Characterizations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.75, n.12, p.2340-2345, 2011.

SABINO, C.K.B. et al. Cardiovascular effects induced by  $\alpha$ -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, 2013.

SAENGSAWANG, W.; RASENICK, M. M. G Protein-Coupled Receptors. **Encycl. Cell Biol**, v.459, p. 356-363, 2015.

SAGVOLDEN, T. et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD - The importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology.* , v. 57, n.7-8, p.619-26, 2009

SALGADO, H. C.; FAZAN, R.; SALGADO, M. C.O. Vasopressor mechanisms in acute aortic coarctation hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.4,1997.

SANDJO, L. P.; KUETE, V. Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. **Med. Plant Res. Africa Pharmacol. Chem.**, p.135-202, 2013.

SANTOS, M.R.V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: A review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.4, 2011.

SCHULZ, A.; KREUTZ, R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. **Hypertension Research**. v.35, p. 672-694, 2012

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

SIANI, A. C. et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.1, 1999.

SILVA, A. S.; ZANESCO, A. Exercício físico , receptores  $\beta$ -adrenérgicos e resposta vascular. v. 9, n. 2, p. 47–56, 2010.

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

SIQUEIRA, H. D. S. et al.  $\alpha$ -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. v.160, p. 27-33, **Life Sciences**, 2016.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Anti-hyperalgesic effect of Lippia grata leaf essential oil complexed with  $\beta$ -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.91, p. 739-747, 2017.

SOARES, C.M.S. et al. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.3, 2005.

SPEERS-ROESCH, B. et al. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. II. Cardiovascular function and tissue metabolic responses during progressive and relative hypoxia exposures. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, p.103-114, 2012.

STETCIURA, I. Y. et al. Nanoencapsulated and microencapsulated SERS platforms for biomedical analysis. **Current Opinion in Pharmacology**, v.18, 2014.

SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**. v.12, n.3 , 2007

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.88, 2017

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

TELSER, A. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. **Shock**, 2002.

THOMAS, C. J.; RANKIN A.J.; HEAD G.A.; WOODS R.L. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.29, n.5, p.1126-32. 1997.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos : uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1, p.7-13, 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v.79, n.7, 2014.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. H. **Principles of Anatomy and Physiology**, 2014. Disponivel em:<  
[https://www.academia.edu/36004776/PRINCIPLES\\_OF\\_ANATOMY\\_AND\\_PHYSIOLOGY\\_Tortora\\_14th\\_Ed](https://www.academia.edu/36004776/PRINCIPLES_OF_ANATOMY_AND_PHYSIOLOGY_Tortora_14th_Ed)> Acessado em:04/04/2019

VEIGA, E. V.; ALMEIDA, F. A.; LIMA, E.; FEITOSA, G. S. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2016.

VENTURA, A. L. M. et al. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry** (São Paulo), v.37, n.2, 2010.

VENTURINI, C. De G.; Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**. v.31, n.2, 2008

WALLBACH, M. et al. Effects of baroreflex activation therapy on ambulatory blood pressure in patients with resistant hypertension. v. 67, n.4, p.701-709, **Hypertension**, 2016.

WEBSTER, C. S. et al. clinical assessment of a new anaesthetic drug administration system: a prospective, controlled, longitudinal incident monitoring study. **Anaesthesia**. 2010, v.65, n.5, p.490-499, 2010.

WHELTON et al. 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association T. 2017.

XU, B.; BOBEK, G.; MAKRIS, A.; HENNESSY, A. Antihypertensive methyldopa, labetalol, hydralazine, and clonidine reversed tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibited endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial-trophoblast cellular networks. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.44, n.3, p.421-427, 2017.

ZAPPI, D.; RANZATO, F.F.; LEITIMAN, P.SOUSA, V. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v.4, n.66, p. 1085-1113, 2015.

ZEMAN Č., A.; TÖRÖK, J. Comparison of cardiovascular characteristics in normotensive and hypertensive rat strains. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.59, n.4, p.361-368, 2015.

# CAPITULO I

**Toxicidade aguda do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*  
(Aubl.) Marchand.**

## RESUMO

### Efeito toxicológico e citotóxico do óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (Aubl.)

O *Protium heptaphyllum*, conhecido como breu-branco exsuda uma resina oleosa composta por uma mistura de triterpenos da  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -aminina é um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e citotoxicidade do OEPH. No estudo de toxicidade aguda os ratos foram tratados com dose oral única utilizando cânula orogástrica (gavagem) para a dose de OEPH de 2000 mg/kg/animal. O experimento foi realizado com ratas Wistar, para o estudo da toxicidade aguda, foram adotadas as metodologias preconizadas pelo Guia para Testes de Químicos da OECD 423. Foram realizadas prova bioquímica sérica de triglicerídeos, colesterol, creatinina, ureia, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, bilirrubina total, Bilirrubina direta, proteínas totais, albumina, lipoproteína de alta densidade e ácido úrico, com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas. Avaliou-se a citotoxicidade do OEPH utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2-5-difeniltetrazolio (MTT). Macrófagos de murinos foram semeados em placa de cultural de 96 poços na concentração de cerca de  $2 \times 10^5$  células por poço. As células foram cultivadas na presença de concentrações distintas dos OEPH das substâncias-teste, obtidos por 48 horas para a determinação do grau de citotoxicidade das substâncias-teste quando comparadas ao controle negativo de citotoxicidade, através do teste de MTT. Os resultados dos testes de toxicidade oral com OEPH em ratos não apresentou alteração da massa corporal e massa relativa dos órgãos dos animais. Os resultados bioquímicos de triglicerídeos, colesterol, creatinina, ureia, ALT, AST, Bili-T, Bili-D, proteínas totais, albumina, HDL e ácido úrico não tiveram alterações significativas, porém em relação a glicose observou-se um aumento significativo em relação ao grupo controle. Nos teste de viabilidade celular avaliado a citotoxicidade do OEPH pelo método metil tiazol tetrazólio (MTT). A amostra até a concentração 50  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentou citotoxicidade para as células, se comparado com o controle negativo. A porcentagem de células viáveis diminuiu a partir de 100  $\mu\text{g/mL}$  e teve uma CI50 com valor de 69,33  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, podemos concluir que o OEPH não promoveu alterações comportamentais, bioquímicas e não alterou o peso dos animais. Tendo uma citotoxicidade baixa com um IC50 acima de 50  $\mu\text{g/mL}$  considera como citotoxicidade moderada.

CEUA: 069/2014

**Palavras chave:** óleo essencial, *Protium heptaphyllum*, citotoxicidade.

## 2 INTRODUÇÃO

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand., popularmente conhecido como breu-branco, é uma árvore representativa de Burseraceae originário da América do Sul, exsuda uma resina oleosa composta por uma mistura de triterpenos da  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -aminina e um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos (LIMA et al., 2014). A alta diversidade de terpenos na resina aromática dessa espécie proporciona uma defesa eficaz contra patógenos e herbívoros. O exsudato do caule de *P. heptaphyllum* é fonte de matéria-prima para produzir medicamentos, cosméticos, produtos de higiene, perfumaria, repelentes, vernizes, incenso e velas (PALERMO et al., 2018).

O óleo essencial (OE) está entre os diversos constituintes que as plantas produzem e acumulam em estruturas secretoras específicas tendo importância no uso terapêutico, cosmético, alimentício e religião (ALI et al., 2015). Muitos fatores podem afetar a química dos OE, incluindo crescimento em ambientes variados, nutrição, secagem, armazenamento pós-colheita e variação genética (GAUTAM et al., 2014).

São metabólitos secundários presentes em quantidades menores em várias partes da planta. O método de sua extração pode ser feito por destilação, prensagem, hidrodestilação ou extração com solvente (PRAKASH et al., 2015). OEs são considerados mais potentes do que os seus constituintes isolados, devido possuir várias moléculas ativas que podem atuar de maneira sinérgica ou antagônica, portanto, afetam múltiplos alvos em uma célula, podendo exercer efeitos citotóxicos nas células eucarióticas (GAUTAM et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Geralmente os álcoois, os aldeídos e os constituintes fenólicos são responsáveis pela citotoxicidade dos OEs (BRUNI et al., 2004). Em geral os OEs são produtos normalmente de toxicidade elevada, podendo ocasionar efeitos tóxicos, tais como irritação e corrosão, sensibilização das células, absorção percutânea, toxicidade ao sistema orgânico, fototoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade (VIGAN, 2010). O perfil de toxicidade para cada OE deve ser feito, mas isso é difícil de realizar, uma vez que a toxicidade de um OE particular pode variar de acordo

com a composição, que é decidido por muitos fatores interdependentes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A toxicidade aguda ocorre devido a uma única exposição (dose única) ou múltiplas exposições com o agente tóxico, num intervalo de tempo inferior a 24h, avaliando a mortalidade ou a imobilidade dos organismos, influência em reações bioquímicas, metabolismo, entre outros. Os efeitos aparecem de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo duas semanas (DO AMARAL et al., 2007). A partir do teste de toxicidade aguda é possível determinar a dose letal (DL50) (COSTA, et al., 2008). A DL50 é definida como a quantidade de substância, que quando ingerida em dose única por via oral, expressa em mg de substância por massa do organismo em kg, causa a morte de 50% dos animais expostos a substância, dentro de um período de 14 dias (COSTA et al., 2008).

Desde 2000, a Organização para Economia Cooperação e Desenvolvimento (OECD) para químicos, pesticidas e produtos biotecnológicos concluiu que a OECD 401 passaria a não ser preconizada e as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, foram definitivamente adotadas e recomendadas (BOTHAM, 2004). O quadro 5, mostra as diferenças entre os métodos das diretrizes 420, 423 e 425 da OECD (VALADARES, 2006).

Os métodos *in vitro* apresentam várias vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002). As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida (SASAKI et al., 1992).



Quadro 4 – Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular segundo categorias de toxicidade dos materiais.

<b>Citotoxicidade</b>	<b>Viabilidade celular (%)*</b>
Não-citotóxico	>90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

\*percentagem em relação ao controle negativo de toxicidade

Fonte: SA; SA, 2009

Quadro 5 – Princípios dos métodos de avaliação de toxicidade aguda oral OECD 420, 423 e 425.

	<b>Dose fixa</b>	<b>Classe toxica</b>	<b>“up and down”</b>
<b>Nível de dose</b>	Dose fixa de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg 5 animais por dose.	Dose fixa de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg 3 animais por dose	Dose inicial estimada (175 mg/kg), fator de progressão de 3, 2 e 1 animal.
<b>Princípio</b>	Identificar menor dose que cause toxicidade evidente.	Identificar menor dose que cause mortalidade.	Estimar a DL <sub>50</sub>
<b>Dados obtidos</b>	Faixa estimada da DL <sub>50</sub> , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.	Faixa estimada da DL <sub>50</sub> , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.	Estimar a DL <sub>50</sub> , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.

Fonte: VALADARES, 2006.

As padronizações utilizando culturas celulares foram utilizadas para avaliar a toxicidade de biomateriais, estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias

celulares (ROGERO et al., 2003). A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura temos:

- 1) A Citotoxicidade pelo método MTT é avaliada com ajuda do um corante vital, o (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a inibição de 50% do crescimento celular. Este teste não se aplica a produtos insolúveis em água. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em um formazano roxo insolúvel por clivagem do anel de tetrazólio por succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. O produto formazan é impermeável às membranas celulares e, portanto, se acumula nas células saudáveis (MOSMANN, 1983).
- 2) A Citotoxicidade pelo método de vermelho neutro utiliza-se uma cultura de células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem (SIRC CCL) 60, adicionadas ao corante vermelho neutro ou MTT. A captação do corante pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria através de um leitor automático de microplacas. Este método pode ser utilizado para todo tipo de formulação, exceto aquelas que possuam propriedades fixadoras, como as formulações alcoólicas (BUNEL et al., 2014; MORGAN et al., 1991). As células vivas ocupam o vermelho neutro, que está concentrado nos lisossomos das células (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).
- 3) Citotoxicidade pela difusão em gel de agarose é indicado para emulsões e géis com fase contínua aquosa. A aplicação desses produtos na superfície de um gel agarose em contato com as células do tecido conjuntivo de camundongo gera um halo. O diâmetro do halo corresponde a citotoxicidade do produto testado e a sua capacidade de se difundir no gel agarose. Como indicador, utiliza-se um corante vital como o MTT ou Vermelho Neutro (ROGERO et al., 2003).

A viabilidade celular foi dividida nas categorias listadas no quadro 4.

Considerando que a espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand é utilizada pela população no tratamento de várias doenças e a inexistência de estudos de toxicidade com esta espécie, os resultados deste trabalho são úteis por avaliar a segurança de seu uso popular como planta medicinal.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade aguda do OEPH em ratos fêmeas e citotoxicidade em macrófagos de murinos.

#### 3.2 Objetivo específico

- Avaliação clínica dos animais após a administração do OEPH
- Determinar a variação na massa corporal em diversos momentos ao longo do experimento e massa relativa dos órgãos ao final dos testes.
- Avaliar os parâmetros bioquímicos séricos (triglicerídeos, colesterol, creatinina, ureia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (Bili-T), Bilirrubina direta (Bili-D), proteínas totais, albumina, lipoproteína de alta densidade (HDL) e ácido úrico) dos animais.
- Determinar a citotoxicidade do OEPH utilizando o ensaio de MTT em macrófagos de camundongos

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

As amostras de resina foram adquiridas no mercado central da Teresina-PI em fevereiro de 2016 (resina comercial) manteve-se em refrigeração até o momento da extração por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado. O OEPH foi fornecido pelo Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Sidney Gonçalo de Lima. A identificação das espécies ocorreu no Herbário Graziela Barroso na Universidade Federal do Piauí – Brasil e o modelo de voucher foi registrado sob o número 28730.

### **4.2 Avaliação da toxicologia *in vivo***

Na preparação das soluções o OEPH foi diluído em solução de água desmineralizada / Tween 80 (0,5% volume/volume) e administrado na concentração de 2000 mg/kg, via oral no grupo para análise toxicológica aguda. O grupo controle recebeu via oral água desmineralizada / Tween 80 (0,5% volume/volume). O Tween 80 (Dinâmica, São Paulo, Brasil) nas concentrações utilizadas não mostrou efeito quando comparado com salina.

Para o estudo da toxicidade aguda, foram adotadas as metodologias preconizadas pelo Guia para Testes de Químicos da OECD 423 (OECD, 2001). Testou-se a dose mais alta recomendada pelo protocolo, 2000 mg/kg para substâncias não testadas (OECD, 2002).

### **4.3 Toxicologia aguda**

No estudo de toxicidade aguda os ratos foram tratados uma única vez com o OEPH na dosagem de 2000 mg/kg por via oral. O experimento foi realizado com 03 ratas Wistar saudáveis, com idade de 90 dias e com variação máxima de peso de 15% ( $270 \pm 40$  g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram alocados individualmente em caixas de

polipropileno, em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Os animais ficaram em jejum por 10 horas anteriormente à administração do OEPh, com acesso livre apenas água, e a ração foi permitida 3 horas após a administração. O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração do OEPh, no 7º e no 14º dia pós-administração (OECD, 2002).

A administração do OEPh foi realizada em dose oral única utilizando cânula orogástrica (gavagem) para a dose de 2000 mg/kg/animal.

#### **4.3.1 Observação dos sinais de toxicidade (*screening* hipocrático)**

Para as observações das alterações comportamentais e dos sinais de toxicidade os animais foram colocados em arena. Foram realizadas observações dos parâmetros comportamentais, tais como atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, reflexo auricular, reflexo corneal e piloereção) (quadro 6). As observações foram realizadas em diferentes períodos durante o dia, após a administração dos compostos, que foi de 0, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos e a cada 24 h por 14 dias (MALONE & ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977).

Quadro 6 – Parâmetro para avaliação clínica de ratas para observação de toxicidade aguda.

<b>Observações gerais</b>	<b>Descrição dos sinais de toxicidade</b>	<b>Escores</b>
Atividade geral	Verificar a atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo; entende-se como atividade geral, dentre outros comportamentos, a presença de locomoção, levantar, farejar e/ ou parado.	0= ausência do sinal; 1= raros sinais; 2= poucos sinais; 3=sinais moderados; 4=sinais intensos.
Frênio vocal	Observar se há emissão de som sem nenhuma estimulação ou toque	
Irritabilidade	Assoprar e tocar levemente para examinar reação.	
Resposta ao toque	Pegar, tocar num intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar resposta	
Aperto de cauda	Apertar a região próxima a ponta da cauda com bastante intensidade	
Reflexo auricular	Estalar dos dedos uma vez e analisar reflexo. logo após estalar várias vezes seguidas e observar o reflexo	
Reflexo corneal	Aproximar uma pinça, lentamente, até os olhos do animal, sem encostar, e verificar se o animal tem reflexo de fechá-los.	
Piloereção	Observar se os pelos estão eretos e sua intensidade	

MALONE & ROBICHAUD, 1962.

### **4.3.2 Consumo de água, alimento e avaliação ponderal**

Avaliou-se o consumo de água e ração pelos animais por 14 dias após dose única de 2000 mg/kg de OEPH. Diariamente era colocado 250 g de ração e mamadeiras graduadas de 500mL de água nas gaiolas. Sempre no dia seguinte era registrado e contabilizado a quantidade de água e ração consumida pelo animal e a pesagem do animal era realizada semanalmente.

Após 14 dias os animais sobreviventes foram sacrificados por superdosagem de anestésico cetamina (300 mg/kg). Foram feitas a análise macroscópica dos órgãos e a pesagem do fígado, coração e do baço para determinar seus pesos relativos. O cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal foi realizado dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta, e multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi expresso em g/100 g de peso vivo (g/100g peso/vivo).

### **4.3.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos.**

Decorridos 14 dias da administração da dose única de 2000 mg/kg VO. do OEPH, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas em período diurno no final de cada experimento e anestesiados com uma solução de xilazina e cetamina de no máximo 0,10 mL/100 g de massa corpórea, na proporção de 8,75 mL de cetamina e 1,25 mL de xilazina. Foram coletadas amostras de sangue em tubos com gel separador, através da coleta direta na artéria aorta nos ratos, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Em seguida foram realizadas as análises bioquímicas do sangue (MELO et al., 2012).

As análises laboratoriais foram executadas no Núcleo de Pesquisas de Plantas Mediciniais – UFPI (NPPM). Para cada prova bioquímica sérica realizada: triglicerídeos, colesterol, creatinina, ureia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (Bili-T), Bilirrubina direta (Bili-D), proteínas totais, albumina, lipoproteína de alta densidade (HDL) e ácido úrico foram utilizados reagentes comerciais padronizados (Labtest®, Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa – MG), com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas, em

temperatura de 37° C, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro semiautomático UV/Vis, T80 Pg instruments.

#### **4.4 Avaliação da citotoxicidade do OEPH em células de mamíferos.**

##### **4.4.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT**

Avaliou-se a citotoxicidade do OEPH utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2-5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 e cerca de  $2 \times 10^5$  macrófagos por poço. Essas células foram incubadas sob atmosfera de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h para adesão celular. Após esse tempo foi feito duas lavagens com RPMI 1640 para retirada de células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 suplementado com soluções do OEPH diluídas com 2 µL de DMSO nas concentrações testadas (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 µg/mL).

As células ficaram incubadas com os tratamentos durante 48 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Acrescentou-se MTT (5 mg/ml) e voltou a ser incubado por 1 h. Após esse período o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada para agitação (5000 rotações por minuto) por cerca de 30 minutos em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a medida da absorbância dos resultantes da redução do MTT num leitor automático modelo EL 800 de placas de cultura a um comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativamente à absorbância determinada nas células controle (VALADARES, 2006).



## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos dados obtidos aplicaram-se os testes de análise de variância (ANOVA one-way) para o MTT, seguido de teste de Tukey. Para a comparação entre os dois grupos de ratos fêmeas, utilizou-se o teste t de Student, em software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Consideraram-se valores significativos para  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 *Screening* hipocrático

Os valores médios observados no *screening* hipocrático do OEPH, na dose de 2000 mg/kg via oral estão demonstrados no Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros relacionados ao *screening* hipocrático, após administração oral em dose única de OEPH, em ratos fêmeas.

Parâmetros avaliados	Grupo	Tempo (h)							Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	24	3	7	10	14
Atividade Geral	R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta ao toque	R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta ao aperto da cauda	R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Irritabilidade	R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Reflexo corneal	R1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	R2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Piloereção	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frênito vocal	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	R1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	R2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Legenda: Ratos fêmeas administração VO na dose de 2000 mg/kg de OEPH (R2). O controle (R1) recebeu solução salina com tween 80 (0,5% v/v) por gavagem. Score: 3: sinais evidentes e contínuos/intenso; 2: sinais evidentes/moderado; 1: raros sinais/leve e 0: ausente de sinais

## 6.2 Massa corporal dos animais e massa absoluta dos órgãos

A relação da média das massas corporais dos animais testados, com a dose de 2000 mg/kg do OEPH, administrado por via oral, não teve diferença significativa com o do grupo controle, como demonstra a Tabela 3.

A relação percentual entre a massa absoluta dos órgãos e a massa corporal manteve-se bem próximas, sem diferença significativa entre animais testados e os controles (Tabela 4).

O consumo de água e ração de ratos, tratados com doses de 2000 mg/kg de OEPH, via oral não tiveram alterações significativas quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 3 – Médias ( $\pm$  desvio padrão) das massas corporais de ratos fêmeas (n=3) tratados via oral com 2000 mg/kg de OEPH antes da exposição, sete e quatorze dias após exposição.

Dias	Controles	2000 mg/kg
<b>0</b>	267,5 $\pm$ 45,9	218 $\pm$ 14,8
<b>7</b>	274,5 $\pm$ 39,3	231 $\pm$ 19,7
<b>14</b>	272 $\pm$ 59,4	234 $\pm$ 4,9

Legenda: Valores expressos como Média  $\pm$  E.P.M. (n= 3 animais em cada grupo).

Tabela 4 – Consumo de água e ração dos ratos durante o teste de toxicidade aguda. Tratados com doses de 2000 mg/kg de OEPH, via oral.

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
<b>Controle</b>	55,8 $\pm$ 2,5	25,6 $\pm$ 2,1
<b>2000 mg/kg</b>	56,1 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 1,8

Legenda: Valores expressos como Média  $\pm$  E.P.M. (n= 3 animais em cada grupo).

Tabela 5 – Médias ( $\pm$  desvio padrão) da massa absoluta dos órgãos de ratos fêmeas (n=3) tratados via oral com 2000 mg/kg de OEPH após quatorze dias de exposição.

Grupos	Controle	OEPH
<b>Coração</b>	0,95 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,11
<b>Fígado</b>	11,5 $\pm$ 1,9	11,7 $\pm$ 1,5
<b>Baço</b>	0,99 $\pm$ 0,1	1,03 $\pm$ 0,2
<b>Rins</b>	1,25 $\pm$ 0,1	1,25 $\pm$ 0,08
<b>Pulmão</b>	1,50 $\pm$ 0,5	1,48 $\pm$ 0,8

Valores expressos como Média  $\pm$  E.P.M. (n= 3 animais em cada grupo).

### 6.3 Exames laboratoriais (hemograma e provas bioquímicas séricas)

Os animais testados do grupo de intoxicação aguda na dose de 2000 mg/kg de OEPH, administrado por via oral, tiveram seus resultados comparados com os animais controles, sendo que não foi constatada diferença significativa para os parâmetros bioquímicos (ALT, ureia, creatinina, triglicérides, colesterol, glicose, proteínas totais, Bili-T, Bili-D, HDL, Ácido úrico). Porém houve diferença significativa nos valores de AST e albumina (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos obtido do soro de ratos tratados com dose única de 2000 mg/kg de OEPH e controle com veiculo (salina com tween 80; 0,05%). Após 14 dias.

GRUPO	Controle	Controle <sup>#</sup>	2000 mg/kg
Triglicerídeos	46 ± 4,3	71,1 ± 11,08	49,3 ± 5,3
Colesterol (mg/dL)	87,8 ± 13,9	75,60 ± 8,64	83,7 ± 10,4
Glicose (mg/dL)	128,2 ± 6,7	149,50 ± 8,92	112,0 ± 15,3
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,0	0,51 ± 0,06	0,8 ± 0,5
Uréia (mg/dL)	36,8 ± 3,8	45,70 ± 1,55	33,0 ± 3,5
Proteínas totais (g/dL)	7,0 ± 0,3	n/r	7,3 ± 0,3
ALT (U/L)	52,8 ± 6,1	77,00 ± 1,35	65,3 ± 12,6
AST (U/L)	128,6 ± 7,7	256,20 ± 16,96	102,0 ± 4,9**
Bili-T (mg/dL)	0,1 ± 0,0	0,39 ± 0,06	0,1 ± 0
Bili-D (mg/dL)	0,1 ± 0,0	0,14 ± 0,02	0,1 ± 0,0
Albumina (g/dL)	2,3 ± 0,1	n/r	2,6 ± 0,2*
HDL	44,0 ± 12,7	n/r	46,0 ± 8,5
Ácido úrico (mg/dL)	4,1 ± 0,1	9,06 ± 0,55	4,3 ± 0,6

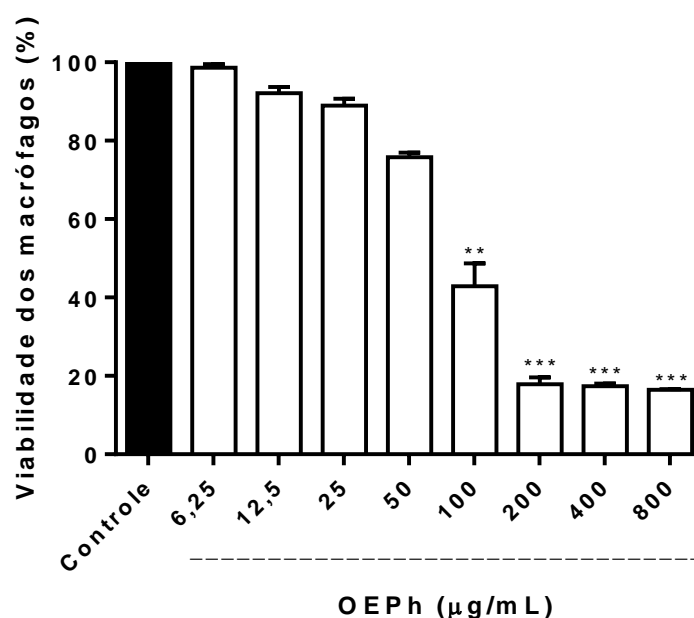
(\*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). (\*\*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ( $p < 0,01$ ). (a) Estatisticamente significativo em relação ao controle<sup>#</sup> ( $p < 0,001$ )  
 Valores expressos como Média ± E.P.M. (n= 3 animais em cada grupo).  
<sup>#</sup> (FEITOSA et al., 2015); n/r: não realizado.

#### 6.4 Avaliação da $CI_{50}$

A análise do gráfico mostra que no período de 24 horas, as amostras nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  não afetaram a viabilidade celular que se apresentam respectivamente nomeadamente de 98,62; 92,08; 88,95 e 75,81% para as células. Contudo nas concentrações de 100 a 800  $\mu\text{g/mL}$  foram encontrados respectivamente valores com diminuição significativa de 42,83; 17,84; 17,41 e 16,45% havendo uma interferência na viabilidade celular e diminuição da atividade mitocondrial (Gráfico 1).

Para avaliar os efeitos agudos tóxicos do OEPH usou o calculo da concentração efetiva que causa mortalidade a 50% do organismo-teste ( $CE_{50}$ ) obtendo um valor de 74,93  $\mu\text{g/mL}$  e concentração inibitória media ( $CI_{50}$ ) com valor de 69,33  $\mu\text{g/mL}$ .

Gráfico 1 – Efeito do OEPH sobre a viabilidade celular através do ensaio MTT.



Legenda: \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0,001$  teste t de Student pareado vs. OEPH

## 7 DISCUSSÃO

A avaliação da toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anátomo-patológicas e letalidade, podendo oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009).

Em complemento aos ensaios de toxicidade em animais, estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que produtos vegetais podem exercer efeitos tóxicos pela produção de metabólitos secundários, sendo necessário que se estabeleçam parâmetros de toxicidade para plantas com algum efeito terapêutico (BUNEL et al., 2014).

Os resultados só podem ser generalizados em determinadas condições específicas de estudo, com a mesma linhagem de ratos, idade e dieta, assim como a metodologia, que pode interferir nos resultados (LILLIE; TEMPLE; FLORENCE, 1996). Por isso, realizou-se o grupo controle paralelamente com o grupo OEPH 2000 mg/kg.

Em geral a triagem farmacológica comportamental não detectou nenhuma alteração no sistema nervoso central importante na administração do OEPH (Tabela 2), mesmo que alguns dos componentes majoritário do OEPH possa promover efeito depressor como o limoneno, que possui um dos derivados oxigenado, o álcool perílico, derivação está que pode ser obtida pela conversão do limoneno pela NADPH (EXPLORERENZ, 2019) e o  $\beta$ -linalol que pode ter ação sedativo e ansiolítico (CAMARGO et al, 2014).

Não foi possível observar modificação do peso corpóreo dos animais, tanto do controle quanto do grupo de animais tratados por via oral com 2000 mg/kg de OEPH (Tabela 3), isso também foi observado com tratamento crônico por via oral com o óleo essencial das folhas de *Citrus limon* rico em limoneno (52%), que não apresentou modificação do peso corpóreo em animais (CAMPELO et al, 2013).

A ingestão de água e de nutrientes são parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com fins terapêuticos, sendo essenciais para o bom funcionamento do sistema fisiológico dos animais e, conseqüentemente, para uma

adequada resposta à droga testada, uma vez que condições nutricionais impróprias podem acarretar deficiência do organismo (SILVA et al., 2016). Não houve diferença significativa no consumo de ração e água, evidenciando a não influência do OEPH neste parâmetro durante os 14 dias de toxicidade aguda (Tabela 4).

O peso total dos órgãos exerce efeito importante no metabolismo corporal, uma vez que uma diminuição ou um aumento no peso bruto de órgãos poderá afetar funções vitais no organismo (MEERTS et al., 2009). Não se observou alteração macroscópica e não houve diferença significativa quanto ao peso do fígado, rins, coração, baço entre os grupos controle e tratado (Tabela 5).

A determinação da proteína total e albumina detectam alterações nutricionais, metabólicas, doenças hepáticas ou perdas proteicas. Alterações da concentração de bilirrubina total e direta são parâmetros utilizados na avaliação da função hepática, e um valor aumentado pode sugerir distúrbios no funcionamento ou lesão hepática (PETTERSSON et al., 2008).

Pode se indentificar um aumento da albumina no plasma do rato (Tabela 6), o qual pode estar relacionado à desidratação. Já que a albumina é sintetizada nas células hepáticas e suas principais funções relacionam-se ao transporte de bilirrubina, magnésio e cálcio; além disso, interfere na manutenção da pressão oncótica do plasma e na estabilização dos sistemas coloidais. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação e a hipoalbuminemia tem como causas principais as deficiências alimentares, nefropatias, hepatopatias, infecções graves e eclâmpsia (JERRY et al, 2008). A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, conseqüentemente, uma leve hipoproteinemia é frequentemente encontrada em doenças inflamatórias. A síntese de albumina é também diminuída em resposta a hiperglobulinemia (SIROIS, 2015). O fígado é virtualmente a única fonte de produção de albumina no organismo, assim uma hipoalbuminemia poderia ser uma manifestação da incapacidade hepática de sintetizar essa proteína (NELSON; COUTO, 2010).

O AST também é conhecido pelo nome de transaminase oxalacética. Existe em muitos tecidos como duas isoformas, no citosol e na mitocôndria, sendo mais abundante no fígado e nos músculos. Seu uso é como indicador de danos nesses tecidos (GONZÁLEZ; SILVA, 2017). Os aumentos de AST podem ser observados em hepatite infecciosa e tóxica, cirrose, obstrução biliar e fígado



gorduroso. Seu nível também está aumentado quando ocorre hemólise, deficiência de selênio/vitamina E. Atividade plasmática normal da AST é menor que 100UI/L em todas as espécies, exceto no cavalo, cujos valores normais variam de 200 a 400UI/L (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Varias plantas possuem ação hepatoprotetoras com *Solanum fastigatum*, *Produsca huberi*, *Desmodium gangeticum*, *Citrus limon*, *Phyllanthus urinaria* e *Cyathea gigantea*, que possuem linalol e  $\alpha$ -terpineol em sua composição e reduzem a ALT e AST quando administrado por via oral (ROCHA et al, 2012; CAMPELO et al, 2013; Lorenzoni et al 2014). O OEPh também possui linalol e  $\alpha$ -terpineol e diminuiu a AST, que não tem conotação patológica.

Para avaliar a citotoxicidade do OEPh, utilizou-se o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que mede a função mitocondrial da célula, ou seja, avalia o nível de funcionalidade da célula e não sua estrutura. Estes ensaios são utilizados para medir os resultados da proliferação de células, verificar efeitos citotóxicos de compostos e para um controle interno da determinação do número de células viáveis (VAN MEERLOO et al 2011).

A porcentagem de células viáveis apresentou-se acima de 50%, que de acordo com a literatura é o mínimo para considerar um material biocompatível (CRUZ et al, 2004). Algumas drogas, porém, não apresentam letalidade, mas sim efeito inibitório de uma determinada ação biológica. Nestes casos, o termo  $CL_{50}$  deve ser substituído por concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) ou, como uma denominação mais ampla, pode-se usar o termo concentração eficaz ( $CE_{50}$ ), que engloba a  $CI_{50}$  (MINHO et al., 2008b).

Os testes de  $CE_{50}$  são realizados para avaliações de prospecção de compostos bioativos, pois a maioria dos compostos avaliados são substâncias complexas com diferentes constituintes que podem agir de forma sinérgica ou antagônica durante a realização de testes de eficácia. A  $CI_{50}$  consiste na concentração de um composto bioativo em contato com as células capazes de inibir atividade de 50% (metade) de um grupo de indivíduos em contato com o composto. Neste caso, a inibição pode ser de alimentação, migração, motilidade. Dentro da mesma linha de pensamento, podem ser calculadas as contrações eficazes, letais ou inibitórias (CENCI et al., 2007).

Os testes *in vitro* não substituem os testes *in vivo*, mas são mais práticos e baratos, tendo, portanto, a função de selecionar os compostos com efeito

citotóxico para serem avaliados em testes com animais. Uma fase primordial dos ensaios *in vitro* é a determinação da  $CE_{50}$  (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2004).

O  $CI_{50}$  do OEPh, no teste MTT, obteve um resultado com valor de 69,33  $\mu\text{g/mL}$  (Gráfico 1), valor mais elevado quando comparado com outros óleos essenciais, como o óleo essencial das folhas de *L. gracilis* com  $CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$  (NEMATI et al., 2013), óleo essencial de *Cinnamomum verum* com 24,13  $\mu\text{g/mL}$ , *Myrocarpus frondosus* com 60,87  $\mu\text{g/mL}$  (AZEREDO et al., 2014) e o óleo essencial da *Matricaria chamomilla* L. com 60  $\mu\text{g/mL}$  (AL-TAMIMI et al, 2016). Apenas compostos de extratos naturais com valor de  $CI_{50}$  igual ou menor do que 50  $\mu\text{g/mL}$  (aproximadamente 150  $\mu\text{M}$ ) merecem ser submetidos a análises de citotoxicidade mais detalhadas (MANS, 2000).

O OEPh tem ação gastroprotetora (ARAUJO et al, 2011), assim como seus metabolitos, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol (SOUZA et al, 2011; ROCHA et al, 2015). Outros metabolitos como p-cimeno tem ação protetora em lesão pulmonar induzido por lipopolissacarídeo (CHEN et al, 2013) e o limoneno tem ação citoprotetor (SUH et al, 2017). Esses metabolitos podem estar atuando na estabilização da inibição da viabilidade celular com o aumento da concentração (200; 400 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ) do OEPh.

## 8 CONCLUSÕES

- O teste farmacológico de dose única de OEPH não revelou a presença de sinais de toxicidade, elevou a albumina e diminuiu a AST, não sendo considerado efeito patológico. E não houve morte na utilização da via oral, podendo ser considerado aparentemente seguro quando administrado por via oral. Para tal fim, fazem-se necessários estudos mais prolongados para averiguar possíveis danos no sistema fisiológico decorrente da administração crônica.

- A viabilidade celular do MTT teve uma  $CI_{50}$  com valor de 69,33  $\mu\text{g/mL}$ , sendo considerado moderadamente citotóxico, representando uma avaliação inicial, constituindo uma importante etapa na avaliação da biocompatibilidade, pois permite a racionalização da experimentação *in vivo*, com diminuição de custos, e de animais nas análises obrigatórias.

## 9 REFERÊNCIA

ALI, B.; ALI AL-WABE, N.; SHAMS, S. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.8, 2015

AL-TAMIMI, A.; RASTALL, M.; ABU-REIDAH, B. M. Chemical Composition, Cytotoxic, Apoptotic and Antioxidant Activities of Main Commercial Essential Oils in Palestine: A Comparative Study. **Medicines**, v.3, n.4, 2016.

ARAUJO, D. A. O. V.; TAKAYAMA, C.; DE-FARIA, F. M.; SOCCA, E. A. R.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; FERREIRA, A. L.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats, **Rev. Bras. Farmacogn.** 2011.

AZEREDO, C. M. O.; SANTOS, T.G., MAIA, B.H.; SOARES, M.J. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.22, n.14, 2014.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v.85, n.3, 2004.

BUNEL, V. et al. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. **Planta Medica**. v.80, n.14, 2014

CAMARGO, S. B.; DE VASCONCELOS, D. F. S. A.; Biological activities of Linalool: current concepts and future possibilities of this monoterpene, **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 13, n. 3, p.381-387, 2014.

CAMPELO, L.M.L. et al. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae), **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.708-716, 2013.

CENCI, F. B. et al. In vitro effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, 2007.

CHEN, L. et al., Protective Effect of *p*-Cymene on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice, **Inflammation**. v. 37, n.2, p. 358–364

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v.1, p.144-148, 2008.

DA CUNHA L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, 2013

DA SILVA, BENTO, M. T. et al.  $\alpha$ -Terpineol induces gastric retention of liquids by inhibiting Vagal parasympathetic pathways in rats. **Planta Medica**, 2016.

DO AMARAL, Jeferson Falcão Falc&atilde;o et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 2007.

EXPLOREZENZ. E. The Enzyme Database. Disponível em: <http://www.enzyme-database.org/reaction/terp/perillyl.html>. acesso 03.05.2019

FEITOSA, C. M. et al. Ensaios pré-clínicos em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleilglicerol, constituinte isolado de *Platonia insignis*, **ConScientiae Saúde**, v.14, n.4, p.555-567, 2015

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, n.2, 2006.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. **BioMed Research International**. p.23, 2014

GONZÁLEZ, F.; SILVA, S. Introdução à bioquímica clínica veterinária. **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do SUL**, 2017.

JERRY KANEKO, J.; HARVEY, J. J.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 2008.

KIM, H. J.; LEE, Y. H.; KIM, C. K. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. **European Journal of Applied Physiology**, v.99, n.4, 2007.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology., **toxicol. Let**, v.127, n.1-3, 2002.

LILLIE, L. E.; TEMPLE, N. J.; FLORENCE, L. Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: Weight gain, hematology and clinical chemistry. **Human & Experimental Toxicology**, 1996.

LIMA, C. M.; LIMA, A.K.; MELO, M. G. D.; SERAFINI, M. R. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**, v. 10, p. 1–9, 2014.

LORENZONI, A.A. Efeito protetor de produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol, **Acta Ambiental Catarinense**, v.11, n.1/2 , 2014

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**. V.8, n.2, 1983

MANS, D. R.A. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. **The Oncologist**, 2000.

MEERTS, I. A.T.M. et al. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. **Food and Chemical Toxicology**, 2009.

MELO, M G D et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos ( *Rattus norvegicus* linhagem Wistar ) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. v. 8, p. 1–6, 2012.

MORGAN, C. D. et al. An improved colorimetric assay for tumor necrosis factor using WEHI 164 cells cultured on novel microtiter plates. **Journal of Immunological Methods**. v.145, n.1-2, 1991

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.

MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. Using global fitting to test a treatment effect in one experiment. **Fitting Model. to Biol.** 2004.

NELSON, Ricahrd W.; COUTO, C. Guillermo. **Medicina Interna de pequeños animales**. 2010.

NEMATI, F. et al. Cytotoxic properties of some medicinal plant extracts from Mazandaran, Iran. **Iranian Red Crescent medical journal**, 2013.

NÓBREGA, F.F. Monoterpenoid Terpinen-4-ol Exhibits Anticonvulsant Activity in Behavioural and Electrophysiological Studies, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2014, p.9, 2014

OECD. **SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 23 GUIDANCE DOCUMENT ON AQUATIC TOXICITY TESTING OF**. 2002.

\_\_\_\_\_. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008.**

PALERMO, F, H. et al. resin secretory canals in *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae): a tridimensional branched and anastomosed system. **Protoplasma**, v.255, n.3, p.899-910, 2018.

PETTERSSON, J. et al. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.65, n.2, p.253-259, 2008.

PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. **Food Control**. v.47, p. 381-391, 2015

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. v.62, p.250-264, 2014

ROCHA C.G.F. et al. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). **PLoS ONE**, v.10, n.8, 2015

ROCHA, A. DE O. B. et al. Toxicological effect of *Pradosia huberi* Ducke hydroalcoholic extract in the Wistar rats, **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n.3, p.371-378, 2012

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, 2003.

SA, Test; SA, Essai. Iso 10993-5. **Order A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications**, 2009.



SASAKI, T. et al. Detergent cytotoxicity: simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity. **Toxicology in Vitro**, v.6, n.5, 1992.

SILVA, S. L. et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v.46, n.1, 2016.

SIROIS, M. **Laboratory Procedures for Veterinary Technicians**. 6<sup>Th</sup>. p.123, 2015.

SOUZA, R.H.L. et al. Gastroprotective activity of  $\alpha$ -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats, v.19, n.4, p. 277–281, 2011

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, Michael A. **Fundam. em Patol. Clínica Veterinária**. 2<sup>Th</sup>, 2011.

SUH, K.S.; CHON, S.; CHOI, E.M. Limonene protects osteoblasts against methylglyoxal-derived adduct formation by regulating glyoxalase, oxidative stress, and mitochondrial function, **Chemico-Biological Interactions**, v.25, n.278, 2017

VALADARES, M. C. Avaliação De Toxicidade Aguda : Estratégias Após a “ Era Do Teste DI 50. **Revista Eletrônica de Farmácia** v.3, n.2 p.93-98, 2006.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v.731, p.237-245, 2011.

VIGAN, M. Essential oils: Renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**. v.20, n.6, p.685-692, 2010

ZATTA, D. T. et al. Study of antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* strains and acute toxicity of *Jacaranda decurrens* leaves, **Latin American Journal of Pharmacy** v.28, n.4, 2009.

## CAPÍTULO II

**Atividade hipotensora do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* Marchand  
Aubl.: possível envolvimento de adrenoceptores e receptores muscarínicos**

**Atividade hipotensora do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* Marchand  
Aubl.: possível envolvimento de adrenoceptores e receptores muscarínicos**

## RESUMO

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand exuda uma resina oleosa utilizada na medicina popular como analgésico, cicatrizante e expectorante. Neste estudo avaliou-se o efeito cardiovascular do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (OEPh) em ratos normotensos não anestesiados. Utilizaram-se ratos machos (250-300g). Os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos sob anestésia (xilazina 20 mg/kg e cetamina 10mg/kg) para implantação de cateter de polietileno na veia cava e aorta abdominal via veia e artéria femoral esquerda, respectivamente (CEUA 069/2019). Após vinte e quatro horas, o cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão pré-calibrado e após um período para manutenção dos parâmetros basais administrou nitroprussiato de sódio (NPS 10 $\mu$ g/kg) para registro controle, decorridos 30 min, as doses do OEPh (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg) foram administradas por via venosa de maneira randômicas. Os resultados demonstram que as doses do OEPh (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg) promoveram um potente efeito hipotensor (-18,66  $\pm$  1,39\*; -30,42  $\pm$  2,16\*\*\*; -35,62  $\pm$  0,67\* mHg, respectivamente, \*p<0,05 vs OEPh) dependente da dose e reduziu a também frequência cardíaca nas maiores doses 6,25 e 12,5 mg/kg (-36,59  $\pm$  9,05\*; -28,95  $\pm$  9,99\* bpm, respectivamente, \*p<0,05 vs OEPh). A influência dos receptores muscarínicos e dos mediadores ganglionares realizou-se experimentos na presença de atropina e hexametônio. Nestas condições, observou-se que a resposta hipotensora foi atenuada apenas na menor dose para a atropina e para o hexametônio. Já em relação a frequência cardíaca foi totalmente abolida na presença dos dois bloqueadores. A participação dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos observou-se na presença de iombina (colocar dose) onde ocorreu atenuação da hipotensão induzida pelo OEPh nas doses (3,125 e 6,25 mg/kg). Já na presença de propranolol (colocar dose) (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) e prazosina (colocar dose) (antagonista  $\alpha$ 1-adrenérgico) ocorreu inibição da hipotensão induzida pelo OEPh em todas as doses utilizadas. Em conclusão, podemos afirmar que o OEPh possui ação hipotensora e bradicárdica envolvendo a ação nos receptores muscarínicos e adrenérgicos ( $\alpha$  e  $\beta$ ).

Palavras chaves: hipotensão; óleo essencial, adrenérgicos

## 2 INTRODUÇÃO

A pressão sanguínea (PA) é caracterizada pela pressão que o sangue provoca nos vasos corporais e depende do envolvimento do: débito cardíaco (DC), resistência vascular e volume total de sangue (KAMAL; HAMDY; M.SAYED, 2016).

Os produtos naturais possuem enorme diversidade química e estrutural fonte de pesquisa que inspira novas descobertas na Química, Biologia e Medicina, sendo evolutivamente melhorado como moléculas semelhantes às drogas e continuam sendo fontes de descoberta de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Muitas plantas possuem óleos voláteis que contêm uma grande variedade de atividades farmacológicas, entre elas o vasorelaxamento e a diminuição da frequência cardíaca exercendo atividades hipotensoras (SALJOUGHIAN et al., 2018). Apesar dos avanços enormes na pesquisa, desenvolvimento e uso de produtos naturais como agente terapêutico à compreensão detalhada sobre os mecanismos de ação tem sido cada vez mais elucidado (BIALA et al., 2011). Por outro lado, a avaliação dos efeitos farmacológicos e da clarificação dos caminhos de ação para os compostos naturais pode ser usada como uma estratégia de pesquisa lógica para descobrir novos medicamentos (HAJHASHEMI et al., 2002; JAKALA et al., 2009).

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, Burseraceae, conhecido como "almécega", "breu branco" e "almíscar", almécega do Brasil, goma-limão é encontrado, na América do Sul incluindo a região amazônica, esta espécie vegetal segrega uma resina oleosa composta de uma mistura de triterpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (ALBINO et al., 2017; LIMA et al., 2014).

Na medicina popular essa planta é usada como, analgésico, cicatrizante e expectorante e alguns autores indicam a presença de ação antimicrobiana, ação antihiperlipêmica e hipolipêmica (ALVES-SANTOS et al., 2016; BERNADI et al., 2015; MAGALHÃES MAIA et al., 2000; SANTOS, Flávia Almeida et al., 2012). Alguns constituintes do OEPH tais como  $\alpha$  e  $\beta$  amirina possuem efeitos antidepressivos e ansiolíticos (ARAGÃO et al., 2006),  $\alpha$ -pineno possuem atividade gastroprotetora (PINHEIRO et al., 2015), limoneno possui ação antinociceptiva (DO

AMARAL et al., 2007) e o linalol e  $\alpha$ -terpineol possui atividade hipotensora e vasorelaxante (ANJOS et al., 2013; ARAGÃO et al., 2006).

Vários estudos relatam efeitos dos óleos essenciais no sistema cardiovascular em ratos como mostrado no Quadro 7 (ALVES-SANTOS et al., 2016; ESMAEILI et al., 2017; LAHLOU et al., 2004).

Quadro 7 – Valores de efeitos dos óleos essenciais na pressão artéria de ratos não anestesiados.

Oleos essenciais	Doses (mg/kg)	Efeitos cardiovasculares	PAM (mmHg)	Referências
<i>Ocotea duckei</i>	5	Hipotensão	15 ± 2	BARBOSA-FILHO et al., 2008
	10	e	21 ± 2	
	15	bradicardia	37 ± 3	
<i>Hyptis fruticosa</i>	10	Hipotensão	18 ± 2	SANTOS, M. R.V. et al., 2007
	20	e	12 ± 3	
	40	taquicardia	15 ± 3	
<i>Aniba canelilla</i>	5	Hipotensão	15 ± 8	INTERAMINENSE et al., 2011
	10	e	28 ± 9	
	20	bradicardia	48 ± 5	

### 3 OBJETIVO

Objetivamos avaliar o potencial farmaco-biológico do *Protium heptaphyllum* no sistema cardiovascular de ratos normotensos bem como investigar os possíveis mecanismos de ação subjacentes a esses fatores farmacológicos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Procedimentos gerais de experimentação**

#### **4.1.1. Material vegetal**

As amostras de resina foram adquiridas no mercado central da Teresina-PI em fevereiro de 2016 (resina comercial) mantendo-se em refrigeração (>5 °C) até o momento da extração. A identificação da espécie ocorreu no Herbário Graziela Barroso na Universidade Federal do Piauí – Brasil e o modelo de voucher foi registrado sob o número 28730.

#### **4.1.2 Extração do óleo essencial**

A resina foi submetida à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, e as frações foram coletadas logo após 3 horas de extração. O óleo extraído foi acomodado em recipiente de vidro lacrado por tampa envolvida por papel alumínio e mantida em refrigeração com temperatura menor que 5 °C.

#### **4.1.3 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa**

A caracterização química do OEPH foi realizada por cromatografia gasosa (ThermoScientific, TSQ Quantum XLS Ultra, Triplo Quadrupolo), equipada com um Amostrador Automático AS3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Para cromatografia dos componentes, utilizou-se uma coluna EquityTM-1, comprimento de 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 mm de espessura. He<sub>2</sub> foi usado como um gás de transporte com um fluxo de 1,0 mL / min, temperatura do injetor 220 ° C. A coluna foi programada com uma temperatura inicial de 50 ° C (3,0 min) seguida de um aumento de 3° C / min até 180° C (durante 2 min), depois 6 ° C / min até 260 ° C (para 2 min) e temperatura do detector 230 ° C. 1,0 µL foi injetado em diclorometano no modo split (1:10). As condições da espectroscopia de

massa foram do tipo Detector Triplo Quadrupolo Ion operando por impacto eletrônico (70 eV; 45 a 450 Da). A identificação dos respectivos componentes foi feita comparando os padrões de espectros de massa da biblioteca interna (NIST 11) ao índice de retenção experimental, calculado a partir de uma série de n-alcenos (C8 a C20 - Sigma Aldrich) e por comparação com dados literais e também os através de dados disponíveis no site como <http://www.webbook.nist.gov> e <http://www.pherobase.com>.

#### **4.1.4 Animais**

Trinta e seis (36) Ratos Wistar machos com três meses de vida, (200-320 g) foram obtidos das instalações de cuidados com animais do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, no Brasil. Os ratos foram mantidos em uma grande gaiola sob condições controladas de temperatura e iluminação (luzes acesas: 0600-1800 h). Os ratos receberam comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (Protocolo número 069/2014).

#### **4.1.5 Drogas e reagentes**

Os medicamentos utilizados foram: nitroprussiato de sódio, ioimbina, propranolol, hexametônio, prazosina, N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), atropina, (todos de SIGMA, St. Louis, MO, EUA), tiopental de sódio (CRISTALIA, São Paulo, Brasil), heparina (ARISTON, São Paulo, Brasil), Xilazina (CEVA, São Paulo, Brasil), Cetamina (CEVA, São Paulo, Brasil). Na preparação das soluções de reserva, OEPH foi diluída em solução de água desmineralizada / Tween 80 (0,5% v/v). Outras drogas foram diluídas apenas em soluções salinas. Todas as soluções de estoque foram mantidas a 0°C e diluídas até a concentração desejada com água deionizada ou solução salina, quando necessário. O Tween 80 (Dinâmica, São Paulo, Brasil) nas concentrações utilizadas não mostrou efeito em experiências de controle.

#### 4.1.6 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais com 06 animais por grupo.

I - Grupo controle - salina

II - Grupo atropina

III - Grupo hexametônio

IV - Grupo ioimbina

V – Grupo prazosina

VI - Grupo propranolol

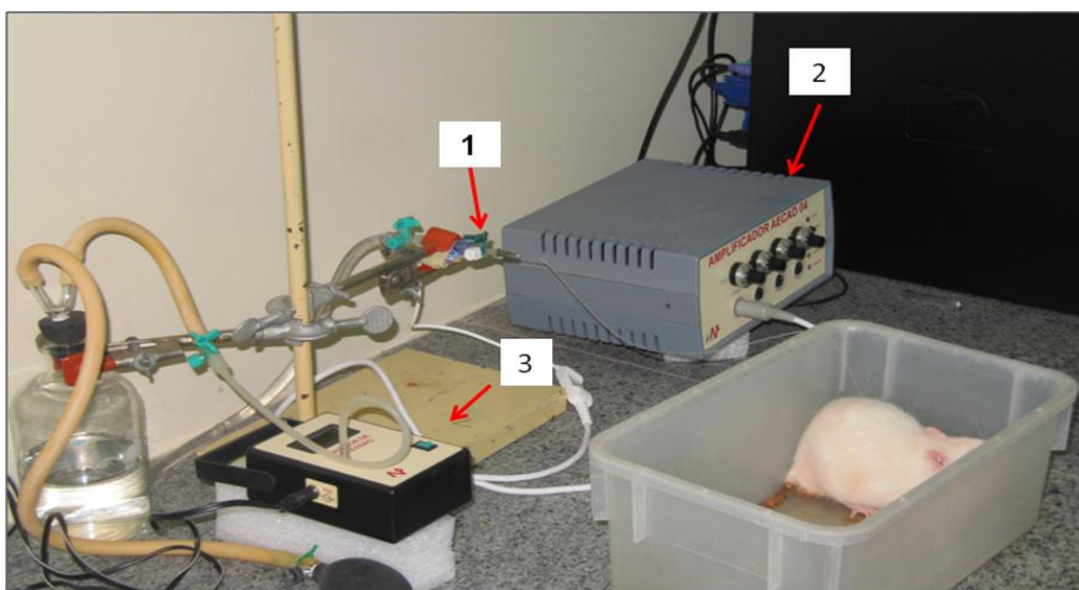
Os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal) e cetamina (50 mg/kg, intraperitoneal). objetivando por meio de um procedimento cirúrgico realizado para a implantação de cânulas na artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os catéteres foram encapsulados por via subcutânea e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*) e lavada com solução salina heparinizada (100U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PAM (LAHLOU et al., 1990). A PAM e FC foram medidas 24 h após o ato cirúrgico pela conexão do catéter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo AVS projetos – SP/Brasil) que estava conectado a um microcomputador, equipado com placa conversora analógico-digital (AVS projetos – SP/Brasil) e com o programa AQCAD (AVS projetos – SP/Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O catéter venoso foi implantado para a administração das drogas (Fig.3) (LAHLOU et al., 1990; MENDES et al., 2014).

Foi administrado Nitroprussiato de Sódio (10 µg/kg) por via intravenosa (IV) para verificar a eficácia da inserção do cateter venoso. Após o período de estabilização, a pressão arterial média e a frequência cardíaca foram registradas em ratos conscientes e de movimento livre antes (valores basais) e após IV na



administração de bolus de OEPH (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg) para a obtenção de curvas dose-resposta. As injeções sucessivas de OEPH foram separadas por um intervalo de tempo suficiente para permitir a recuperação completa do parâmetro basal (30 min). A fim de elucidar os possíveis mecanismos subjacentes à resposta hipotensora, o OEPH foi administrado a animais pré-tratados com um dos seguintes fármacos: um agente bloqueador ganglionar (hexametônio, 20 mg/kg), um agente bloqueador adrenérgico (propranolol, 1,5 mg/kg), um agente antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (ioimbina, 2 mg/kg), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (atropina 2 mg/kg) e um antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico (prazosina 1 mg/kg). Após a realização dos protocolos, todos os animais foram eutanasiados sob anestesia com tiopental sódico (100 mg/kg, IP).

Figura 3 - Sistema de aferição da pressão arterial e frequência cardíaca.



Fonte: Arquivo pessoal

Legenda: 1) Transdutor de pressão; 2) Amplificador de sinal AECAD04; 3) Calibrador de pressão.

## 5 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como os valores médios  $\pm$  S.E.M. (erro padrão da media) de seis animais. A avaliação estatística foi realizada utilizando A-NOVA pós test Tukey. Em todas as análises, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Todos os procedimentos foram realizados usando Graph Pad Prism 6.0 TM. (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Extração do óleo essencial

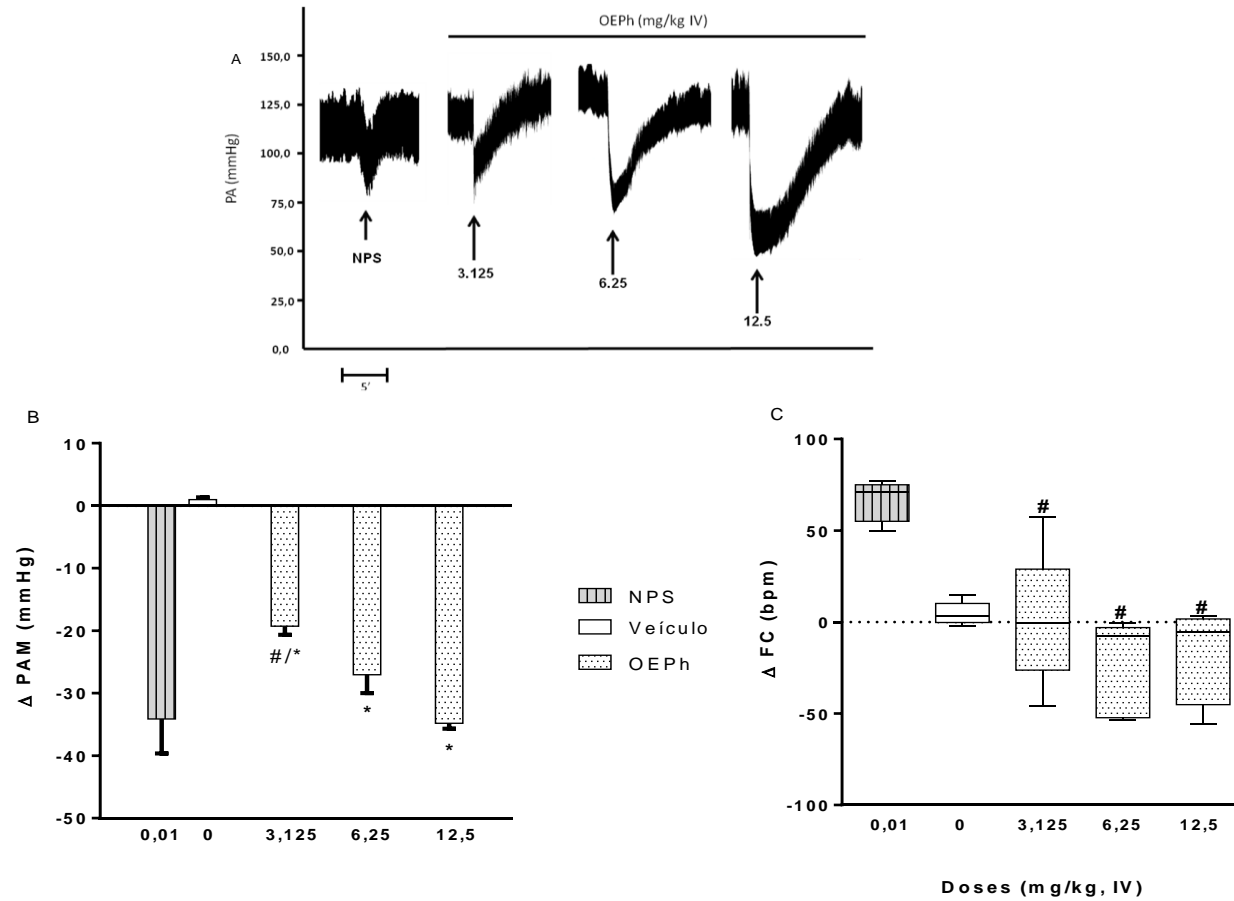
A extração realizada com o *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand obteve um rendimento de 0,72% (massa/massa).

### 6.2 Resultados obtidos com o óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (OEPH)

Neste estudo os valores basais de PAM e FC foram  $109,67 \pm 3,51$  mmHg e  $348,67 \pm 38,69$  bpm, respectivamente.

A administração venosa de doses (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, IV) de OEPH em ratos normotensos, induziram uma hipotensão ( $-18,66 \pm 1,39^*$ ;  $-30,42 \pm 2,16^*$ ;  $-35,62 \pm 0,67^*$  mmHg, respectivamente), sem alterar a FC na menor dose 3,125 mg/kg ( $-1,69 \pm 17,39$  bpm), nas demais doses ocorreu uma bradicardia ( $-36,59 \pm 9,05^*$ ;  $-28,95 \pm 9,99^*$  bpm, \*  $p < 0,05$  vs OEPH) (Fig. 4).

Figura 4 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos

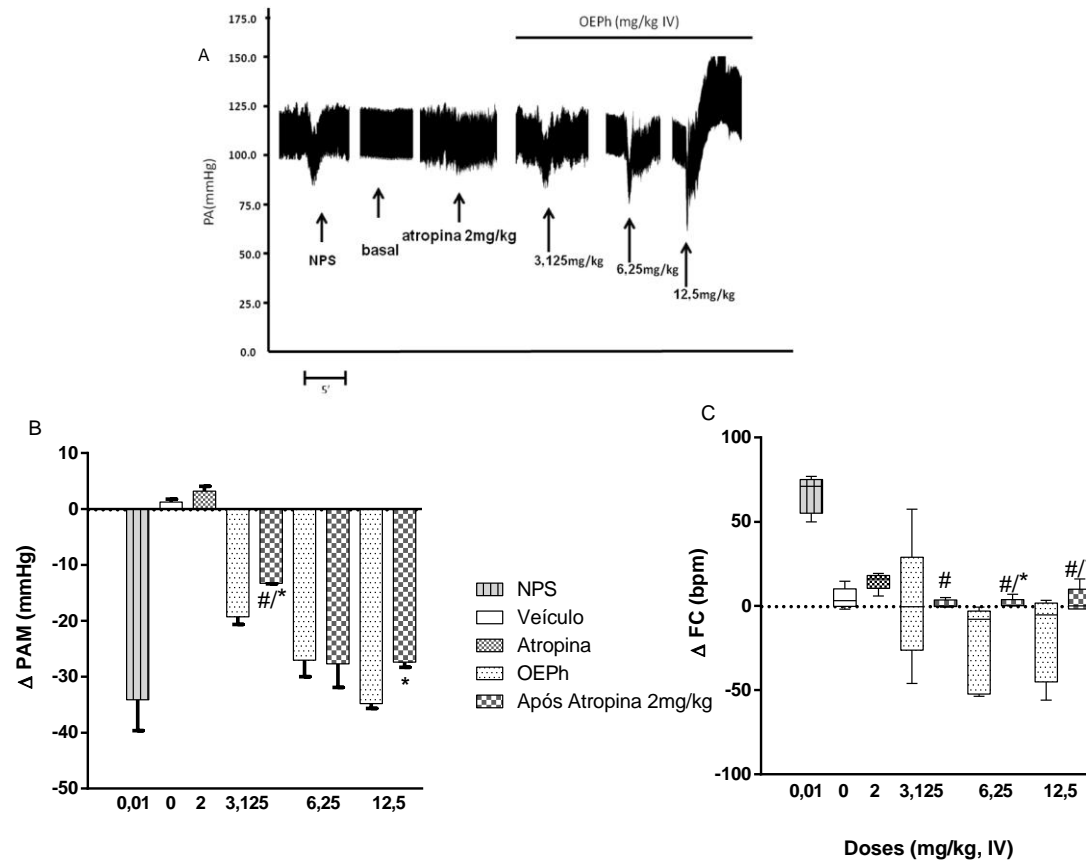


Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média PAM (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca FC em batimentos por minuto (bpm) (C). Os dados foram expressos como Média $\pm$ e.p.m. Utilizou-se o (test t de Student) para a análise da PAM e o teste (Mann-Whitney) para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experimentos

### **6.3 Verificação da participação dos receptores muscarínicos na resposta cardiovascular induzida por OEPH em ratos normotensos não anestesiados.**

Na presença de atropina (2 mg/kg) um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (BLUM et al, 2013) observou-se que as doses de OEPH, induziu inibição do efeito hipotensor ( $-13,44 \pm 0,066^*$  mmHg) na menor dose (3,125 mg/kg) e na maior dose (12,5 mg/kg) ( $-27,29 \pm 0,99^*$  mmHg). Enquanto que na dose intermediária (6,25 mg/kg) a PAM não sofreu alteração significativa ( $-26,48 \pm 4,37$  mmHg (Fig.5). Em relação à bradicardia ocorreu uma reversão na dose intermediária ( $2,41 \pm 1,3^*$  bpm) e na maior dose ( $4,14 \pm 3,4^*$  bpm), sem alterar a menor dose ( $-0,22 \pm 1,3$  bpm).

Figura 5 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e depois o bloqueio com atropina.

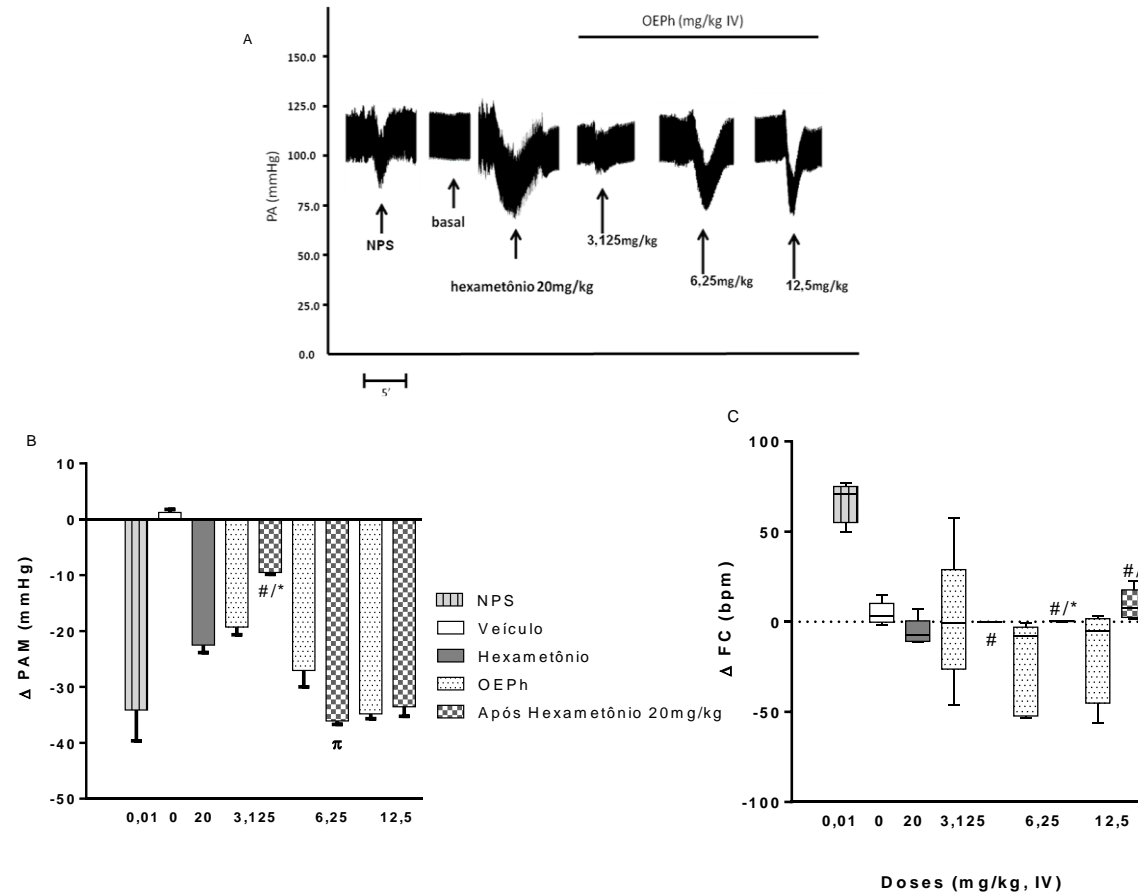


Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM) (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) na presença ou na ausência de atropina 2mg/kg (IV) (C). Os dados foram expressos como Média±e.p.m. Utilizou-se o (test t de Student) para a análise da PAM e o teste t de estudante não pareado para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experimento.

#### **6.4 Envolvimento do bloqueio ganglionar autonômico na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo OEPh em ratos normotensos não anestesiados**

Na presença do hexametônio (20 mg/kg IV), a menor dose do OEPh (3,125 mg/kg), observou-se inibição da hipotensão ( $-9,5 \pm 0,15^*$  mmHg) sem alterar a FC ( $0,08 \pm 0,02$  bpm). Na dose intermediária ocorreu um aumento do efeito hipotensor ( $-36,08 \pm 0,27^*$  mmHg) e inibiu a bradicardia ( $0,36 \pm 0,04^*$  bpm). Na dose mais alta (12,5 mg/kg) não alterou a PAM ( $-33,55 \pm 0,76$  mmHg) e a bradicardia foram inibidas, ( $9,59 \pm 1,69^*$  bpm). \* $p < 0,05$  vs OEPh (Fig. 6).

Figura 6 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com hexametônio.



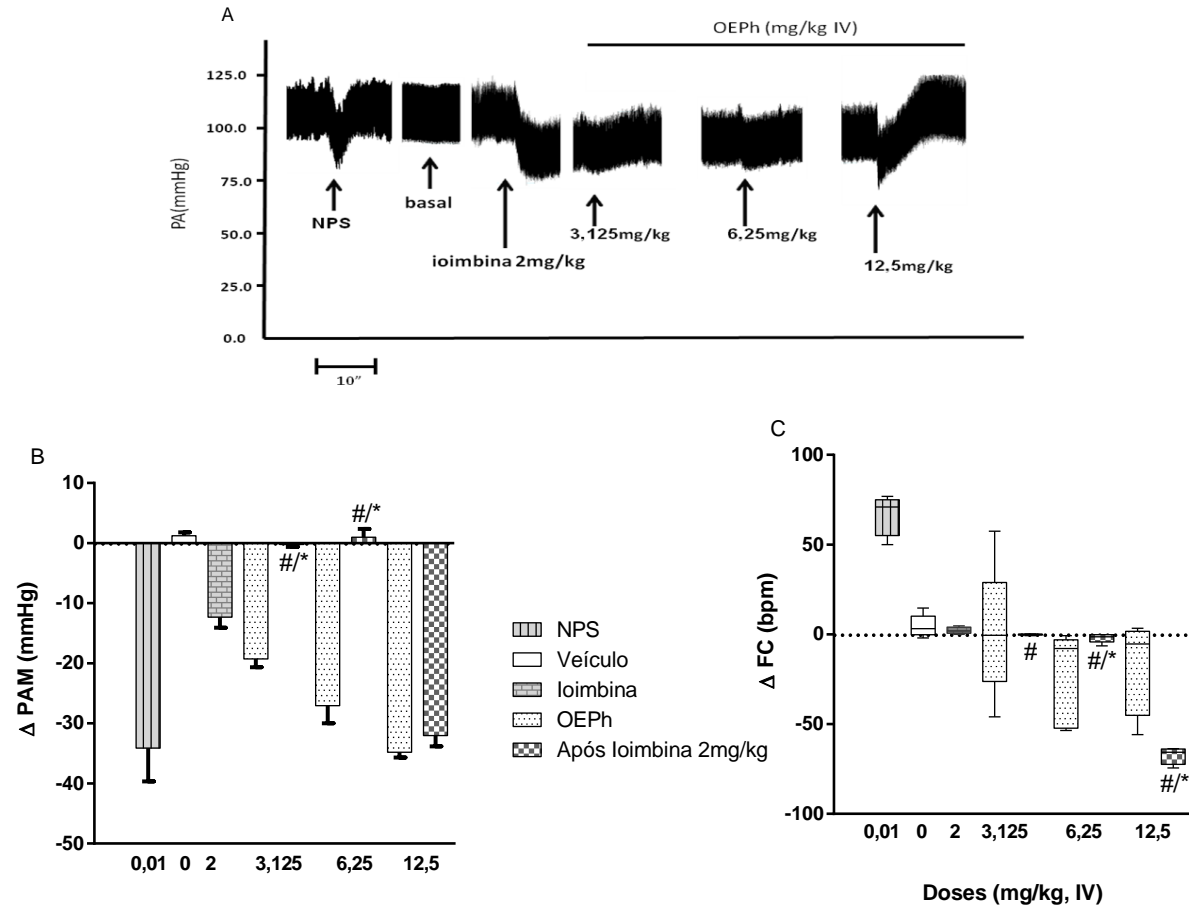
Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM) (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) na presença ou na ausência de hexametônio 20mg/kg (IV) (C). Os dados foram expressos como Média±e.p.m. Utilizou-se o (test t de Student) para a análise da PAM e o teste t de student não pareado para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experimento

### **6.5 Envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados**

A administração da ioimbina (2 mg/kg IV) antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos aboliu a hipotensão ( $0,00 \pm 0,22^*$  mmHg e  $1,39 \pm 0,84^*$  mmHg) induzida pelo OEPH nas doses de 3,125 mg/kg e na dose 6,25 mg/kg, respectivamente. A FC na menor dose continuou nos valores basais ( $-0,10 \pm 0,10$  bpm), porém a dose intermediária diminuiu a bradicardia ( $-2,52 \pm 0,67^*$  bpm) quando comparado ao OEPH sem o bloqueio dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Na dose de 12,5 mg/kg não teve alteração significativa da PAM ( $-33,03 \pm 0,97$  mmHg) e a FC teve uma diminuição mais acentuada ( $-68,59 \pm 1,21^*$  bpm),  $p < 0,05$  vs OEPH (Figura 7).



Figura 7 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com ioimbina.

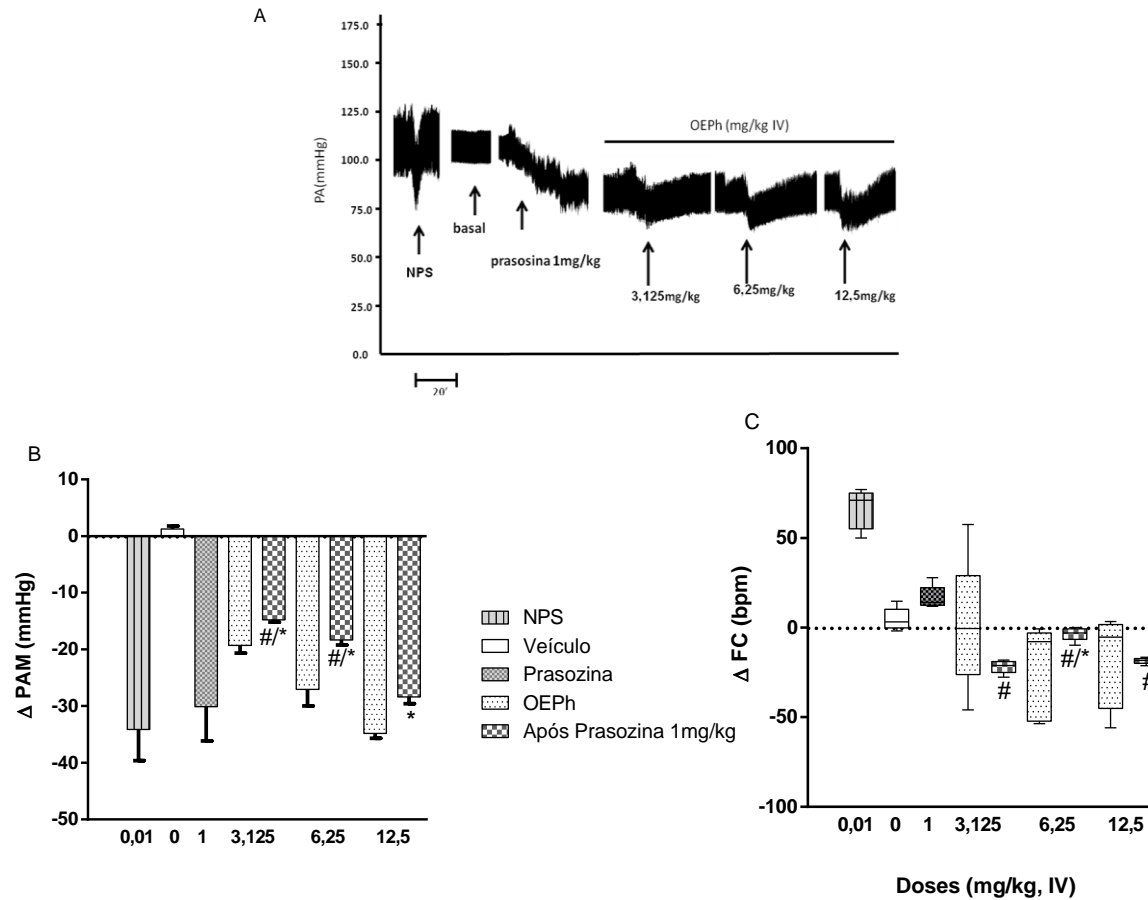


Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM) (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) na presença ou na ausência de ioimbina 2mg/kg (IV) (C). Os dados foram expressos como Média±e.p.m. Utilizou-se o (teste t de Student) para a análise da PAM e o teste t de estudante não pareado para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experimento

## 6.6 Envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_1$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH em ratos normotensos não anestesiados

Observou-se que a hipotensão e bradicardia induzida pelo OEPH (6,25 mg/kg IV) foi inibida ( $-17,93 \pm 0,52^*$  mmHg e  $-3,72 \pm 1,09^*$  bpm, respectivamente) na presença de prazosina. Nas doses de (3,125 e 12,5 mg/kg IV), não houve alteração da PAM ( $-14,94 \pm 0,25$  mmHg;  $-28,49 \pm 0,76$  mmHg). Em relação à FC na menor dose (3,125 mg/kg) ocorreu bradicardia ( $-22,31 \pm 1,00^*$  bpm) após o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Enquanto que na maior dose (12,5 mg/kg) não ocorreu alteração significativa da FC ( $-18,68 \pm 0,48$  bpm) quando comparado com o OEPH sem o bloqueio (Figura 8).

Figura 8 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com prazosina.

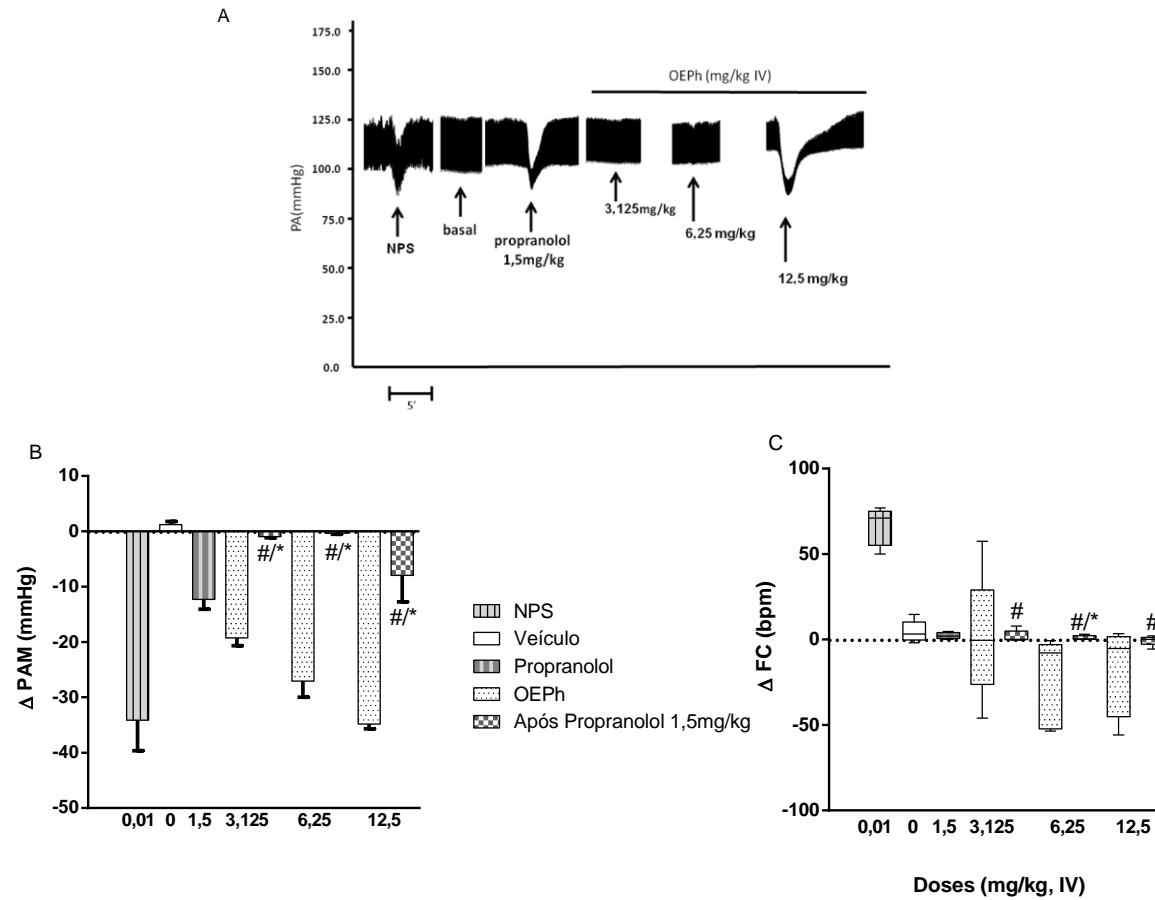


Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM) (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) na presença ou na ausência de prazosina 1mg/kg (IV) (C). Os dados foram expressos como Média±e.p.m. Utilizou-se o (test t de Student) para a análise da PAM e o teste t de estudent não pareado para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experimento

### **6.7 Envolvimento da participação dos receptores $\beta$ -adrenérgico na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo OEPh em ratos normotensos não anestesiados**

Na presença do propranolol a hipotensão ( $-0,88 \pm 0,15^*$ ;  $-0,38 \pm 0,11^*$  e  $-7,92 \pm 3,1^*$  mmHg) induzida pelo OEPh foi inibida em todas as doses. A FC na dose de 6,25 mg/kg também foi inibida ( $1,12 \pm 0,36^*$  bpm). Já nas doses 3,125 e 12,5 mg/kg não teve alteração significativa da FC ( $1,86 \pm 0,99$  e  $-11,31 \pm 5,7$  bpm, respectivamente) quando comparado com o controle. Demonstrando que o OEPh pode atuar também em receptores  $\beta$ -adrenérgico, somando-se ao efeito sobre a pressão arterial (Fig.9).

Figura 9 - Efeito do OEPH sobre a pressão arterial PA em ratos normotensos antes e após o bloqueio com propranolol.



Legenda – (A) Registro original do efeito do OEPH sobre a pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM) (B) em (mmHg) e Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) na presença ou na ausência de propranolol 1,5mg/kg (IV) (C). Os dados foram expressos como Média±e.p.m. Utilizou-se o (test t de Student) para a análise da PAM e o teste t de student não pareado para análise da FC. #p<0,05 vs NPS = nitroprussiato de sódio ou \*p<0,05 vs dose de OEPH. n= 6 experiment

## 6 DISCUSSÃO

Não foi encontrado na literatura nenhuma ação do efeito hipotensor do OEPH, apesar de existir estudos demonstrando que alguns componentes químicos do OEPH contribuem para a sua atividade farmacológica como o  $\alpha$ -terpineol e linalol, que possuem efeito hipotensor e vaso relaxante (ANJOS et al., 2013; ARAGÃO et al., 2006), portanto a atividade do OEPH foi avaliada no sistema cardiovascular.

A administração venosa do OEPH em ratos, induziram hipotensão sem alterar a FC na menor dose 3,125 mg/kg IV, nas demais doses ocorreu uma bradicardia (Fig.4). A estimulação dos receptores muscarínicos cardíacos do nódulo sinoatrial por ação vagal induz bradicardia intensa, que pode ser seguida por hipotensão devido a uma diminuição no débito cardíaco (MOREIRA et al., 2010). Uma das possibilidades do efeito hipotensor do OEPH poderia estar relacionada à atuação no ramo parassimpático, que representa uma grande importância para o sistema cardiovascular desempenhando um papel fundamental na regulação da PA, podendo produzir respostas que contrabalanceiam as que estão associadas ao sistema nervoso simpático (STENGEL et al., 2000). Na presença de atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (BLUM et al, 2013), inibiu o efeito hipotensor do OEPH na menor dose 3,125 mg/kg e na maior dose de OEPH. Em relação a bradicardia ocorreu uma reversão na menor e na maior dose estudada. Enquanto que na dose intermediária 6,25 mg/kg a PAM não sofreu alteração significativa (Fig. 5).

A atropina bloqueia o efeito do nervo vago tanto no nó sinoatrial como no nó atrioventricular, aumentando a frequência de disparo do nó sinoatrial e facilitando a condução atrioventricular (FABÍOLA NIEDERAUER et al., 2008; stengel et al., 2000), o aumento da dose do OEPH pode ativar os receptores nicotínicos para liberação de adrenalina e aumentar a FC, o que justificar a taquicardia mediada pelo OEPH (6,25 e 12,5 mg/kg) na presença do bloqueio muscarínico, indicando uma atuação nos receptores nicotínicos (DU, XIAO et al, 1995). Enquanto a atenuação do efeito hipotensor do OEPH (3,125 e 12,5 mg/kg) na presença da atropina indica atuação nos receptores muscarínicos, porém o efeito hipotensor do OEPH foi bifásico (Curva em forma de U), podendo estar relacionado a saturação de

receptores distintos dos muscarínicos que provoquem efeito hipotensor (BUKHARI; DAR, 2013).

A acetilcolina liberada pelas fibras pré-ganglionares atua principalmente estimulando os receptores nicotínicos e os neurônios simpáticos e/ou parassimpáticos. A estimulação desses receptores produz uma rápida despolarização dos neurônios ganglionares e origina o chamado potencial excitatório pós-sináptico, o principal e mais relevante evento da transmissão ganglionar. As drogas bloqueadoras dos receptores nicotínicos ganglionares inibem completamente a transmissão ganglionar. O hexametônio provoca queda de pressão arterial, pois é um bloqueador ganglionar (HELIN; DHANAK, 2013).

A ação bradicárdica de determinadas substâncias pode ocorrer por mecanismos que aumentam a atividade parassimpática ou diminuem a atividade simpática diretamente no coração ou por ação em regiões neuronais envolvidas na regulação autonômica, tendo influência direta de doadores de oxido nítrico em terminações nervosas vagais (WANG et al., 2007). O oxido nítrico participa nas respostas causadas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos em neurônios do núcleo do trato solitário, bem como na interação em situações fisiológicas que requerem a ativação dos receptores na regulação cardiovascular (estimulação dos reflexos barorreceptor e cardiopulmonar) (DIAS et al, 2006)

A fim de avaliar potenciais mecanismos causadores da hipotensão e bradicardia que poderiam estar relacionados à alteração do tônus parassimpático eferente para o coração, foi realizada a verificação do possível efeito indireto do OEPH via nervo vago, sendo que os animais foram pré-tratados com hexametônio, um bloqueador dos receptores nicotínicos ganglionares, que impede a transmissão simpática e parassimpática a periferia (BERG, 2015). Na dose de 3,125 mg/kg, observou-se inibição da hipotensão sem alterar a FC, indicando o envolvimento dos receptores ganglionares nicotínicos. Na dose intermediária ocorreu um aumento do efeito hipotensor e inibição da bradicardia, podendo estar relacionada a efeitos centrais e periféricos simpaticolíticos dos agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos que podem aumentar o bloqueio ganglionar (MCCALLUM et al., 1998), o que foi observado no experimento (Fig.6). Na dose mais alta do OEPH na presença do hexametônio, não alterou a PAM e inibiu a bradicardia, devido à perda dos reflexos cardiovasculares causada pelo bloqueio dos receptores ganglionares. LAHLOU et al., (2004)

estudaram o óleo essencial de alfavaca (nome brasileiro) (*Ocimum gratissimum*) que foi capaz de reduzir a PAM em ratos, mesmo quando ocorreu o bloqueio de todo o fluxo autonômico pela atuação do hexametônio. Segundo os autores, esse resultado indica que o efeito hipotensor não é dependente do sistema nervoso autônomo, podendo ser devida a um relaxamento vascular e não pela resposta autonômica simpática.

Os agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos estimulam os receptores do sistema nervoso central e periférico, causando a inibição da liberação de norepinefrina pelos terminais nervosos, diminuindo o efluxo simpático para a periferia. Isso, conseqüentemente, reduz a resistência periférica vascular e induz alterações no débito cardíaco e bradicardia, resultando em hipotensão (FLACKE, 1992). Para verificar se a diminuição de PAM induzida por OEPH envolveria a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos do SNC, utilizamos ioimbina, um antagonista seletivo desses receptores (CHEN et al., 2015). Os agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos estimulam os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no SNC e periférico, podendo estimular a ativação dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores pré-sinápticos, nas terminações nervosas periféricas, inibindo a exocitose da noradrenalina, explicando, parcialmente, o efeito hipotensor e bradicárdico dos agonistas desses receptores (FLACKE, 1992). No entanto, a ativação dos receptores  $\alpha_2$  pós-sinápticos, na musculatura lisa dos vasos sanguíneos arteriais e venosos, produz vasoconstrição. No SNC, a ativação dos receptores  $\alpha_2$  do centro vasomotor diminui o efluxo simpático, diminuindo as catecolaminas circulantes, com potencialização da atividade nervosa parassimpática, induzindo, dessa forma, redução na pressão arterial (PIASCIK; PEREZ, 2001).

A administração da ioimbina, antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos aboliu a hipotensão induzida pelo OEPH nas doses de 3,125 e 6,25 mg/kg, respectivamente. A FC na menor dose continuou nos valores basais, porém a dose intermediária diminuiu a bradicardia quando comparado ao OEPH sem o bloqueio dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos demonstrando que o OEPH está atuando nos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Fig.7). Na dose de 12,5 mg/kg não houve alteração significativa da PAM e a FC teve uma diminuição mais acentuada. O OEPH pode estar competindo com os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na presença do bloqueio com a ioimbina na maior dose (Fig.7).



Outra possibilidade de indução do efeito hipotensor seria o antagonismo nos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, que resultam em relaxamento da musculatura lisa e diminuição da resistência periférica total, conseqüentemente a diminuição da pressão arterial (ZHAO et al, 2016). A ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pode induzir respostas inotrópicas negativa ou positiva, alterando as correntes de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , o pH intracelular e sensibilidade de miofilamentos a  $Ca^{2+}$ . A fim de verificar uma possível ação nos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos foi utilizado a prazosina, um antagonista seletivo destes receptores (O'CONNELL et al., 2013). Observou-se que a hipotensão e bradicardia induzida pelo OEPH 6,25 mg/kg IV foi inibida na presença de prazosina. Nas doses de 3,125 mg/kg do OEPH, não houve alteração da PAM. Em relação à FC na menor dose 3,125 mg/kg ocorreu bradicardia após o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, enquanto que na maior dose 12,5 mg/kg não ocorreu alteração significativa da FC quando comparado com o OEPH sem o bloqueio (Fig.8). Os constituintes majoritários do OEPH que induzem efeito hipotensivo são bradicardico é o eucaliptol e o limoneno que tem efeito no relaxamento vascular (BARBOSA-FILHO et al., 2008; LAHLOU et al., 2004) e o  $\alpha$ -terpineol que induz hipotensão e taquicardia tendo atividade de vasorelaxamento mediado, pelo menos em parte, pelo endotélio, mais provavelmente através da liberação de NO e ativação da via NO-cGMP (RIBEIRO et al., 2010). A bradicardia pode estar relacionada ao eucaliptol e ao limoneno, porém a taquicardia está relacionada ao efeito do  $\alpha$ -terpineol, podendo estar incorporado a vasodilatação ou vasorelaxamento. Indicando que o OEPH pode estar atuando além da liberação do óxido nítrico pela ativação de receptores muscarínicos, ou inibindo receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Devido a isso decidimos verificar se o OEPH atuaria em receptores adrenérgicos, que são reguladores essenciais da homeostase cardiovascular. Além de sua função proeminente no coração, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos estão localizados nas células musculares lisas vasculares, onde medeiam os efeitos vasodilatadores das catecolaminas endógenas (CHRUSCINSKI et al., 2001). Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G, fornecem um importante mecanismo regulatório para o sistema cardiovascular, intervindo nos efeitos das catecolaminas no sistema nervoso simpático (XIAO et al., 1999).

Com o objetivo de verificar a influência do OEPH sobre os receptores adrenérgicos  $\beta$ , foi utilizado o propranolol um bloqueador dos receptores  $\beta$ -adrenérgico não-seletivo (CHEUNG et al., 2018). Na presença do propranolol a hipotensão induzida pelo OEPH parece estar inibindo em todas as doses e a bradicardia apenas na dose de 6,25 mg/kg também foi inibida. Já nas doses 3,125 e 12,5 mg/kg não houve alteração significativa da FC quando comparado com o controle, demonstrando que o OEPH pode atuar também em receptores  $\beta$ -adrenérgico, (Fig.9). Parecido com o carvedilol que bloqueia os receptores  $\alpha_1$  -,  $\beta_1$  -, e  $\beta_2$  sem exibir altos níveis de atividade agonista inversa. O carvedilol reduz a pressão arterial por diminuir a resistência vascular periférica, sem afetar o débito cardíaco, devido ao efeito de bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico; esse efeito hemodinâmico é similar aos encontrados com inibidores da ECA e antagonistas dos canais de cálcio (BORTOLOTTO et al, 2009).

## 7 CONCLUSÃO

O OEPh nas doses estudadas, induz hipotensão e bradicardia em ratos, aparentemente atua em receptores muscarínicos inespecíficos, ativando de forma indireta os receptores nicotínicos ganglionares envolvendo componentes do sistema nervoso central e atuam também em receptores  $\alpha$  tanto no SNC quanto periféricos e  $\beta$  adrenérgicos quando administrado por via endovenosa.

O OEPh tem potencial para reduzir a pressão arterial, porém outros estudos são necessários para que possa caracterizar seus efeitos cardiovasculares e colaterais, bem como segurança no seu uso para fins terapêuticos.

## 8 REFERENCIAS

ALBINO, R. C. et al. Oxidation of monoterpenes in *Protium heptaphyllum* oleoresins. **Phytochemistry**, v.136, p.141-146, 2017.

ALVES-SANTOS, T. R. et al. Cardiovascular Effects of the Essential Oil of *Croton argyrophylloides* in Normotensive Rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.9, 2016.

ANJOS, P. J. C. et al. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats, **Journal of biosciences**, v.68, n.5-6, 2013.

ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.85, n.4, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.1, 2008.

BERG, T. Voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels inhibit parasympathetic ganglion transmission and vagal control of heart rate in hypertensive rats. **Frontiers in Neurology**, v.6, 2015.

BERNADI, W. A. et al. Effects of topical application of essential oil from resin of *almescar* (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) in experimentally induced skin wounds in rats \*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.22, n.1, p.10-15, 2015.

BIALA, A. et al. Cardiovascular effects of the combination of levosimendan and valsartan in hypertensive Dahl/Rapp rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.62, n.3, 2011.

BLUM, J.; CARREIRO, S.; HACK, J. Difficulty creating an Anticholinergic rat model with atropine. **Clinical Toxicology**. v.51, n.9, 2013

BORTOLOTTO, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos, **Rev Bras Hipertens**, v.16, n.4, p.215-220, 2009

BUKHARI, I. A.; DAR, A. Behavioral profile of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) extract. A comparison with standard antidepressants in animal models of depression. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 2013.

CHEN, Y. W. et al. Effect of yohimbine on reinstatement of operant responding in rats is dependent on cue contingency but not food reward history. **Addiction Biology**. v.20, n.4, p.690-700, 2015

CHEUNG, S. Y.A. et al. Whole body physiologically based modelling of  $\beta$ -blockers in the rat: events in tissues and plasma following an i.v. bolus dose. **British Journal of Pharmacology**, v.175, n.1, p.67-83, 2018.

CHRUSCINSKI, A. et al. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. **Molecular pharmacology**, v.60, n.5, 2001.

INTERAMINENSE, de F. L. et al. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.6, p. 661-669, 2011.

DIAS, A. C. R.; DA SILVA, L.G.; COLOMBARI, E. Nitric oxide (no) in the neural control of blood pressure: modulation of glutamatergic transmission within the nts, **x Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, v.39, n.1: 51-64, 2006

DO AMARAL, J.F. et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.30, n.7, 2007.

ESMAEILI, H. et al. Vasodilatory effect of asafoetida essential oil on rat aorta rings: The role of nitric oxide, prostacyclin, and calcium channels. **Phytomedicine**, 2017.

DU, XIAO Y. Et al. Characterization of the positive and negative inotropic effects of acetylcholine in the human myocardium, **European Journal of Pharmacology**, v.284, n.1-2, p.119-127, 1995.

NIEDERAUER, F. F. et al. Sulfato de atropina nos parâmetros hemodinâmicos e hemogasométricos de cães anestesiados com clorpromazina, dexmedetomidina e isoflurano. **Ciência Rural**, v.38, n.4, 2008.

FLACKE, J. W. Alpha2-adrenergic agonists in cardiovascular anesthesia. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**. v.6, n.3, 1992

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; PEZESHKIAN, S. K. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, n.2-3, 2002.

HELIN, K.; DHANAK, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. **Nature**. v.502, n.7472, 2013

JAKALA, P. et al. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, n.4, 2009.

KAMAL, I. et al. Kidneys: The Victim Of Hypertension: Review. **Journal of Nephrology & Therapeutics**, v.6, n.231, 2016.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular Effects of Eugenol, A Phenolic Compound Present in Many Plant Essential Oils, in Normotensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.43, n.2, 2004.

\_\_\_\_\_. Rostrocaudal localization of cardiovascular responses induced by intrathecal administration of apomorphine in conscious, freely moving rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.16, n.2, 1990.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; LENZA, D. Triterpenes from the protium heptaphyllum resin – Chemical composition and cytotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.24, n.24, 2014.

MAGALHÃES MAIA, R. et al. Triterpenos da resina de protium heptaphyllum March (Bourseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Quimica Nova**, v.23, n.5, 2000.

MCCALLUM, J. B. et al. The mechanism of alpha2-adrenergic inhibition of sympathetic ganglionic transmission. **Anesth Analg**. V.87, n.3, 1998

MENDES, M. B. et al. Pharmacological Evidence of  $\alpha_2$  -Adrenergic Receptors in the Hypotensive Effect of *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Food**, 2014.

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

MOREIRA, F. V. et al. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v.79, n.3, p.629-661, 2016

O'CONNELL, T. D. et al. Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance. **Pharmacological Reviews**, v.66, n.1, 2013.

PIASCIK, M T; PEREZ, D M.  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: new insights and directions. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.298, n.2, 2001.

PINHEIRO, M. de A. et al. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from Hyptis species. **Pharmacognosy Magazine**, v.11, n.41, 2015.

RIBEIRO, T. P. et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by  $\alpha$ -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clin. and Exp. Pharm. and Phys.** v.37, n.8, 2010.

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.

SANTOS, F. A. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha,\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v.11, n.98, 2012.

SANTOS, M. R.V. et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v.78, n.3, 2007.

STENGEL, P W et al. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. **The J. of pharm. and experim. therapeutics**, v.292, n.3, 2000.

WANG, L. et al. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases  $[Ca^{2+}]_i$  in cardiac sympathetic neurons. **J. of Mol. and Cellular Cardiology**, v.43, n.6, 2007.

XIAO, R. P. et al. Recent advances in cardiac  $\beta_2$ -adrenergic signal transduction. **Circulation Research**. v.85, 1999

ZHAO, M.; WU, J.; GAO, Y. The specific  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist prazosin influences the urine proteome. **PLoS ONE**, v.11, n.10, 2016



## CAPÍTULO III

Efeito anti-hipertensivo do óleo essencial de *protium heptaphyllum* livre em ratos SHR e do complexo com  $\beta$ -ciclodextrina em ratos hipertensos L-NAME.

**Efeito anti-hipertensivo do óleo essencial de *protium heptaphyllum* livre em ratos SHR e do complexo com  $\beta$ -ciclodextrina em ratos hipertensos L-NAME.**

**RESUMO**

O óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (OEPH), é usado popularmente no tratamento de úlcera; como agente analgésico e anti-inflamatório. Testes preliminares verificaram que o OEPH administrado por via endovenosa apresenta efeito hipotensor em ratos normotensos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do OEPH livre e do complexo  $\beta$ -ciclodextrina em modelos de hipertensão SHR e L-NAME em ratos. Na administração oral do OEPH (25 mg/Kg) a PAM aumentou em relação ao controle após 20 minutos, tendo um aumento do  $\Delta$ PAM ( $2,13 \pm 0,87^*$  mmHg). Na dose de OEPH (50 mg/Kg) observou-se que PAM aumentou ( $5,17 \pm 0,14^*$  mmHg) em relação ao controle ( $151 \pm 5,4$  mmHg) após 30 minutos seguido de uma diminuição do  $\Delta$ PAM ( $-4,74 \pm 1,07$  mmHg) após os 40 minutos. Já na dose OEPH (100 mg/kg) ocorreu um aumento ( $1,72 \pm 0,59^*$  mmHg, n=4) de forma significativa o  $\Delta$ PAM em relação ao controle após 20 minutos. Após a administração do OEPH- $\beta$ CD (100 mg/Kg), observou-se que não houve alteração significativa quando comparado ao controle, porém na dose OEPH- $\beta$ CD (200 mg/kg) a PAM aumentou em relação ao controle após 40 minutos, tendo um aumento do  $\Delta$ PAM ( $15 \pm 1,97^*$  mmHg, n=4). Na administração do OEPH- $\beta$ CD (300 mg/kg) a PAM diminuiu de forma significativa em relação ao controle após 50 minutos, tendo uma diminuição do  $\Delta$  PAM ( $-9,8 \pm 2,63^*$ , n=4). Os resultados nos levam a concluir que o OEPH administrado por via venosa promove efeito anti-hipertensivo em ratos SHR envolvendo a participação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. O bioproduto formado através da complexação  $\beta$ -ciclodextrina demonstrou em concentrações de 200 e 300mg/kg possuir efeito bifásico com atividade anti-hipertensiva em modelo de ratos hipertensos L-NAME, porém essa formulação se tornou inviável par administração oral.

CEUA:069/2014

Palavras chave: anti-hipertensivo,  $\beta$ -ciclodextrina, óleo essencial.

## 2 INTRODUÇÃO

Uma das áreas de importância na biotecnologia é o fenômeno da complexação molecular (MC), que é útil na seletividade, separação e solubilização de várias moléculas, um desses tipos de complexações podem ser feitas por  $\beta$ -ciclodextrina (SINGH et al, 2002).

As propriedades excepcionais de CD com cavidade hidrofóbica interna e hidrofiliabilidade externa ajudam no encapsulamento de substância lipofílica e drogas com pouca solubilidade (SUVARNA et al, 2017). Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é preenchida por moléculas de água. A adição de moléculas hidrofóbicas, como OE, promove o deslocamento das moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da CD (MARQUES, 2010). Isto se dá, devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável da cavidade, as moléculas de água tendem a sair da cavidade da CD o que é essencial para a administração de fármacos através de interações não covalentes (MARQUES, 2010; SUVARNA et al, 2017).

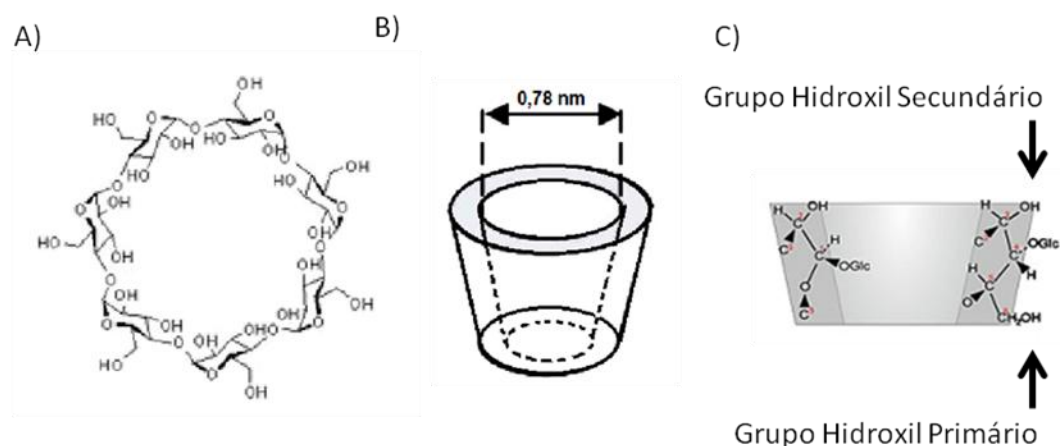
As CDs fornecidos através da via oral são metabolizadas por bactérias no ceco e no cólon, os parâmetros farmacocinéticos dos derivados de CD comumente utilizados na literatura sugeriram que a biodisponibilidade oral de CD é inferior a 4%, e quando administrada via intravenosa não podem ser hidrolisadas pelas amilases, o que pode ser tóxico para as células e são excretadas diretamente através de rins (SUVARNA et al, 2017).

As CDs mais comuns e de ocorrência natural são substâncias cristalinas, homogêneas e não higroscópicas, são compostos nas formas mais comuns de seis a oito ( $\alpha$ -1,4) unidades de D-glucopiranoose ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD). Eles são de conformação circular e cônica, contendo um esqueleto carbônico com hidrogênio e oxigênio glicosídico voltado para o seu interior formando uma zona de alta densidade eletrônica, onde a altura é de cerca de 800 pm. O diâmetro interno da cavidade varia de 500 a 800 pm (RIBEIRO, A. C.F.; VALENTE; LOBO, 2008). Fig. 10 apresenta esquematicamente a  $\beta$ -ciclodextrina.

O óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (OEPh), é rico em mono- e sesquiterpeno. Estudos etnofarmacológicos relataram o uso deste

tipo de resina para tratamento de úlcera; como agente analgésico e anti-inflamatório (LIMA et al., 2014). Não foi encontrada na literatura nenhuma relação do OEPH com efeitos hipotensores. Devido a isso realizamos testes preliminares para verificação do seu efeito hipotensor em ratos normotensos *in vivo* com administração intravenosa o qual observamos dados promissores, com efeito, que diminuem a pressão arterial (PA). Decidimos realizar protocolos em ratos normotensos e hipertensos *in vivo* com administração por via oral do OEPH e do complexo  $\beta$ -ciclodextrina e OEPH para verificação e comparação da eficácia do efeito hipotensor tanto do OEPH quanto do seu complexo.

Figura 10 - Estrutura molecular e tamanho da  $\beta$ -ciclodextrina



Legenda - A) Estrutura molecular da  $\beta$ -ciclodextrina B) tamanho da cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina e C) corte transversal de uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina que mostra a disposição de uma unidade de glicose (RIBEIRO, A. C.F.; VALENTE; LOBO, 2008; SALTÃO; VEIGA, 2001).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito anti-hipertensivo do óleo essencial do *Protium heptaphyllum* (OEPH) em ratos SHR e do complexo com  $\beta$ -ciclodextrina (OEPH-CD) em ratos hipertensos induzidos com L-NAME.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do OEPH administrado por via venosa em ratos espontaneamente hipertensos - SHR.
- Avaliar influência dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos na resposta anti-hipertensiva do OEPH em ratos SHR e WKY.
- Verificar o efeito do OEPH e OEPH-  $\beta$ CD em ratos hipertensos induzido com L-NAME.
- Caracterizar e quantificar o complexo OEPH-  $\beta$ CD.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

As amostras de resina foram adquiridas no mercado central da Teresina PI em fevereiro de 2016 (resina comercial) mantendo-a sob refrigeração até o momento da extração. A identificação das espécies ocorreu no Herbário Graziela Barroso na Universidade Federal do Piauí - Brasil e o modelo de voucher foram registrados sob o número 28730.

### **4.2 Extração do óleo essencial**

A resina foi submetida à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, e as frações foram coletadas logo após três horas de extração. O óleo extraído foi acondicionado em recipiente de vidro lacrado por tampa envolvida por papel alumínio e mantida sob refrigeração com temperatura menor que 5 °C (MOBIN et al., 2017).

### **4.3 Animais**

Ratos Wistar machos (200-300 g) foram obtidos das instalações de cuidados com animais do Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, no Brasil. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos wistar kyoto normotensos (WKY) foram cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Rejane Fior Chadi do Instituto de Biociência da USP - Departamento de Fisiologia - Lab. Neurotransmissão e Modulação Neural da Pres. Arterial. Os ratos foram mantidos em uma grande gaiola sob condições controladas de temperatura e iluminação. Os ratos receberam comida para roedores e água da torneira ad libitum. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (Protocolo número 069/2014).

#### 4.4 Preparo do complexo de inclusão por Spray Dryer do OEPH/ $\beta$ CD

O complexo de inclusão por *Spray Dryer* foi preparado baseado no método proposta por Borghetti colaboradores (2009). Considerando a razão massa:massa de 1:9, pesou-se 9 g de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e 1,15 g do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (OEPH). A  $\beta$ CD foi solubilizada em 400 mL da mistura etanol:água (1:2) aquecida a 55 °C sob uma agitação de 150 rotações por minuto (rpm). O óleo foi solubilizado em 20 mL de etanol PA e adicionado à solução que nesse instante teve o aquecimento desligado, mas continuou em agitação por mais 1h e 30 min. A solução foi submetida à secagem por aspersão com auxílio de Mini Spray Dryer B-290 (Büchi) com a temperatura de secagem da amostra a 105°C, a pressão de entrada a de 0,9 bar e o fluxo da amostra foi de 3 mL.min<sup>-1</sup>. Baseando-se na proporção molar  $\beta$ CD e na concentração do OEPH, estima-se que 10% da massa do complexo represente a quantidade de OEPH. As doses utilizadas no estudo estão representadas na tabela 7.

Tabela 7 - Teor de OEPH complexado em  $\beta$ -ciclodextrina.

Analito	Teor 100 mg de OEPH- $\beta$ CD
Limoneno	2,4 mg
1,8-cineol	1,6 mg
$\alpha$ -terpineol	0,5 mg

#### 4.5 Extração dos constituintes complexados na $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD).

##### 4.5.1 Extração do óleo complexado

A composição do OEPH presente no complexo de inclusão foi determinada pelo método de extração com solvente (ROCHA, et al. 2018). Cem miligramas do complexo de inclusão foram solubilizados com 8,0 mL de água destilada em um frasco de vidro fechado com tampa rosqueada de alumínio e septo de teflon e extraídas com 4,0 mL de n-hexano aquecido em banho-maria à temperatura de 80  $\pm$  2,0 °C por 15 minutos, com agitação intermitente. Após o resfriamento, a fase n-hexânica contendo o OEPH, foi recolhido com auxílio de uma pipeta e a fase aquosa foi submetida a duas novas extrações sucessivas com n-

hexano (2,0 x 4 mL). Os extratos foram combinados e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução para determinação da eficiência de complexação (EC) através da equação 1.

Equação 1:  $EC = \frac{A_c}{A_l} \times 100$

Onde:

EC = eficiência de complexação

A<sub>l</sub> = área sob a curva determinada para o constituinte livre;

A<sub>c</sub> = área sob a curva determinada para o constituinte complexado com βCD.

Com a finalidade de avaliar o procedimento de extração e minimizar os erros experimentais, 10 mg do OEPH foi submetido ao mesmo procedimento de extração que os complexos de inclusão.

#### 4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de Infravermelho com transformada de *Fourier* (IV-TF) do OEPH, e CD foram obtidos na região do infravermelho médio (4000 a 650 cm<sup>-1</sup>) em um espectrômetro Cary 630 (Agilent), utilizando o acessório para Reflectância Total Atenuada (RTA). Aproximadamente 5 µL das amostras líquidas ou 5 mg dos sólidos foram colocados diretamente na superfície do acessório para RTA, aplicado leve pressão para promover um contato íntimo entre a amostra sólida e a superfície do cristal. Os espectros foram obtidos a partir de 64 varreduras, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Os espectros de IV-TF foram suavizados e a linha de base foi corrigida automaticamente utilizando o *software* do espectrofotômetro. As análises foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí

#### 4.7 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

A análise do óleo essencial foi realizada em um cromatógrafo da SHIMADZU, modelo GC-MS QP2010 SE, equipado com um auto injetor AOC-5000, seguindo as seguintes condições de análise: injetor 260 °C, razão *split* 1:100, temperatura inicial do forno de 50 °C (1 min), apresentando duas rampas de



aquecimento uma de 5 °C/min até 180 °C permanecendo por 1 min, a segunda também de 5 °C/min até 200 °C durante 4 minutos. Para a cromatografia dos componentes foi empregada uma coluna Rxi-5HT, 30 m; 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme interno de 0,25 µm, usou-se He<sub>2</sub> como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min.

A temperatura da interface e fonte de íons foram 260 e 265 °C, respectivamente. O analisador de massas utilizado foi do tipo quadrupolo operando por impacto eletrônico (70 eV) e os fragmentos detectados na faixa de 50 a 700 Da. A identificação dos componentes foi feita pela comparação dos espectros padrões da biblioteca interna de dados e baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats) (ADAMS, 2009).

#### 4.8 Parâmetros de validação

A linearidade é descrita pela equação de regressão linear  $y = ax + b$ , onde  $a$  é a inclinação da reta e  $b$  a intersecção da curva no eixo  $y$ .

Para que o método seja considerado linear ele deve apresentar um coeficiente de determinação superior a 0,98.

Para obter as composições de cada componente presente na mistura, foram construídas curvas de calibração utilizando componentes puros. Foi utilizada a metodologia de padronização interna. Utilizou-se uma solução estoque de limoneno,  $\alpha$ -Terpineol e 1,8-Cineol. A partir dessas soluções foram preparadas as diluições necessárias (em balões de 10 mL) para construção das curvas. Como solvente utilizou-se n-hexano. As Tabelas A1, A2 e A3 apresentam as concentrações utilizadas nas curvas de calibração. As Figuras A1, A2 e A3 mostram as curvas de calibração e os parâmetros encontrados. A quantificação dos componentes é determinada por meio da equação da reta obtida de cada curva de calibração, onde o eixo  $y$  é a razão entre as respostas do sinal do analito e do padrão interno (razão entre as áreas) e o eixo  $x$  é a concentração do analito.

A Análise foi feita por GC-MS, em um cromatógrafo em fase gasosa, modelo MDGC (Shimadzu), utilizando uma coluna Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), hélio como gás de arraste, com fluxo de 1mL/min e com a seguinte

programação do forno: Temperatura inicial 50°C, por 1 minuto, seguido de uma rampa de aquecimento de 5°C/min até temperatura de 150°C, seguido de uma segunda rampa de aquecimento de 20°C/min até 260°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 31,5 minutos. O volume injetado foi de 1 µL, sob razão *split* de 10:1.

Os gráficos foram plotados e construídas as curvas de calibração; foi determinada a concentração de cada analito a partir da equação da reta obtida, corrigido pelo fator de diluição utilizado e expressando o resultado em mg do analito por mg de complexo de inclusão, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Concentração} = \left( \frac{y - b}{a} \right) * 12 * fd,$$

Onde:

$y$  = Intensidade do analito;

$b$  = intercepto da reta;

$a$  = inclinação da reta;

12 = fator de correção;

$fd$  = diluição utilizada para ajustar a concentração da amostra à faixa de concentração da curva de calibração.

#### 4.9 Modelo de indução da hipertensão arterial por meio do L-NAME

Realizou-se administração *in vivo* do L-NAME, que é um inibidor da síntese do óxido nítrico, numa dose de 100 mg/kg, por via oral aos ratos de forma contínua num intervalo de 24 horas durante sete dias a fim de se produzir a elevação da PA e aumento da resistência vascular periférica, como relatado por ALVES-SANTOS et al. (2016).

#### 4.10 Verificação da pressão arterial média dos animais

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, IP) para procedimento cirúrgico que consistiu na implantação de cateteres de polietileno (PE), um segmento de cateter PE-10 (comprimento de 4 cm e diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) foi soldado a um segmento de cateter

PE-50 (comprimento em torno de 15 cm e diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente). Em seguida fez-se a implantação dos mesmos na aorta abdominal, via artéria femoral esquerda. Após a inserção e fixação, o cateter (arterial) foi preenchido com solução salina heparinizada, colocado subcutaneamente e exteriorizado através de incisão na região cervical posterior (scapulae) do animal (BREWSTER et al., 1991). A PAM foi medida 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo AVS projetos – SP/Brasil) conectado a um microcomputador equipado com placa conversora analógico-digital (AVS projetos – SP/Brasil) e com o programa AQCAD (AVS projetos – SP/Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca).

#### **4 ANALISE ESTATÍSTICA**

Os resultados são expressos como os valores médios  $\pm$  S.E.M. (erro padrão de meios) de quatro a oito animais. A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste t de Student ou a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido do teste t de Bonferroni. Em todas as análises, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Todos os procedimentos foram realizados usando Graph Pad Prism 6.0 TM. (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Espectroscopia de Infravermelho

No Gráfico 2, temos respectivamente os infravermelhos  $\beta$ CD, OEPH e OEPH-  $\beta$ CD. O espectro de absorção da  $\beta$ CD apresentou uma banda de absorção em  $3402\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento do grupo O–H, uma vibração assimétrica em  $2913\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo – CH<sub>2</sub>, deformação em  $1651\text{ cm}^{-1}$  associado à presença de água e um estiramento assimétrico em  $1014\text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibração do grupo C–O–C.

No espectro infravermelho do óleo essencial pode-se observar um pico na região  $2968\text{ cm}^{-1}$  que é atribuído ao estiramento antiassimétrico dos grupos CH<sub>3</sub> e  $1465$  é atribuído ao balanço antiassimétrico do grupo CH<sub>3</sub>, os picos em  $1455\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao balanço do grupo CH<sub>2</sub>, no pico  $1700\text{ cm}^{-1}$  é atribuído a elongação C=O (SILVERSTEIN et al, 2005).

O espectro do complexo não apresentou bandas de absorção características do OEPH, devido a sobreposição de sinal, apresentando bandas características da  $\beta$ CD, sugerindo que os componentes do OEPH estariam dentro da  $\beta$ CD.

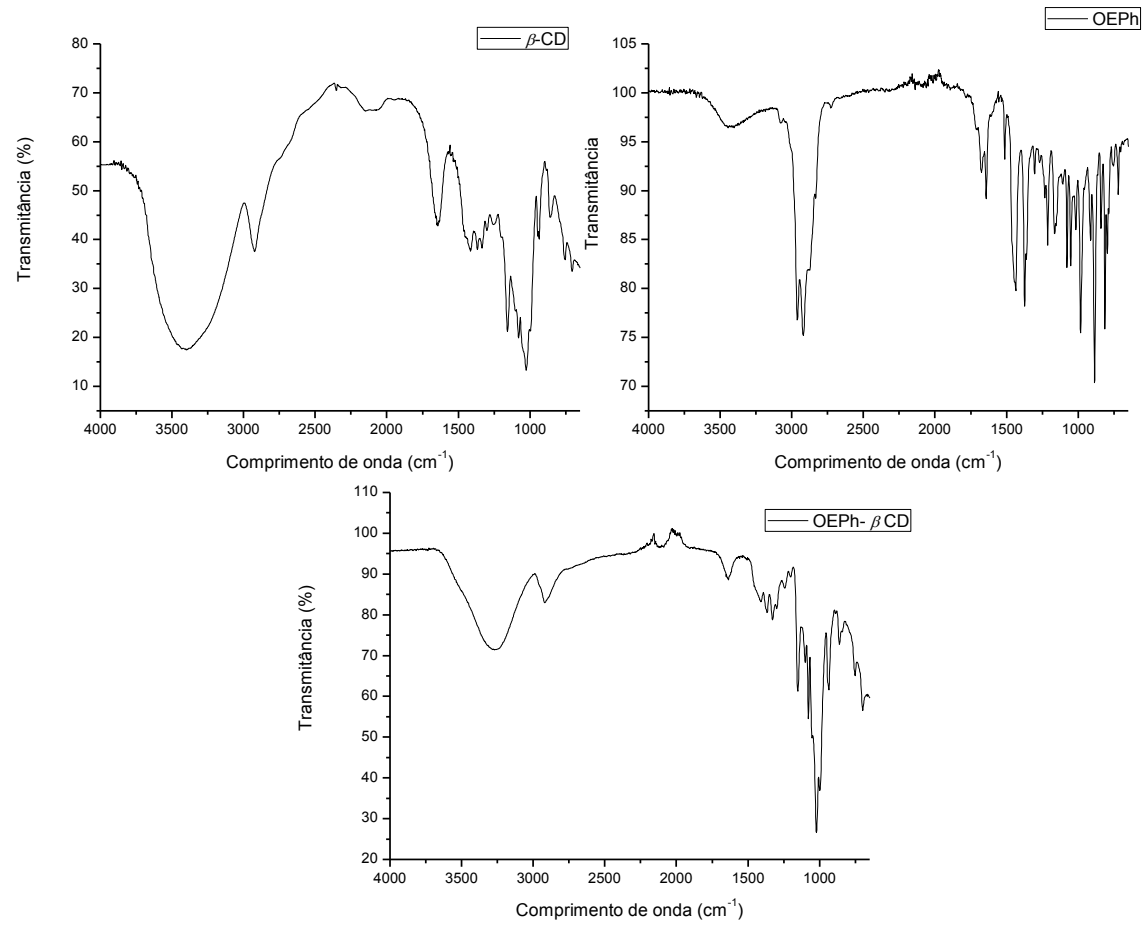
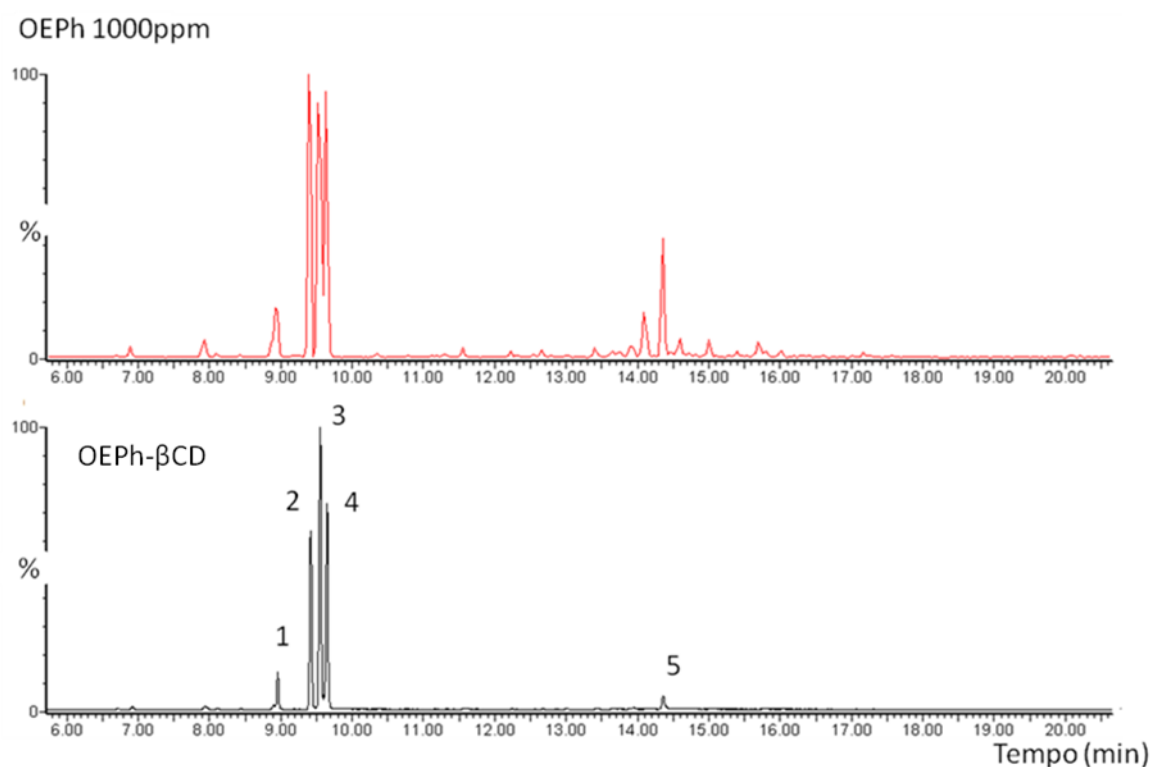


Gráfico 2 - Espectros de infravermelhos com transformada de Fourier,  $\beta$ CD; OEPH e OEPH- $\beta$ CD.

## 5.2 Análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

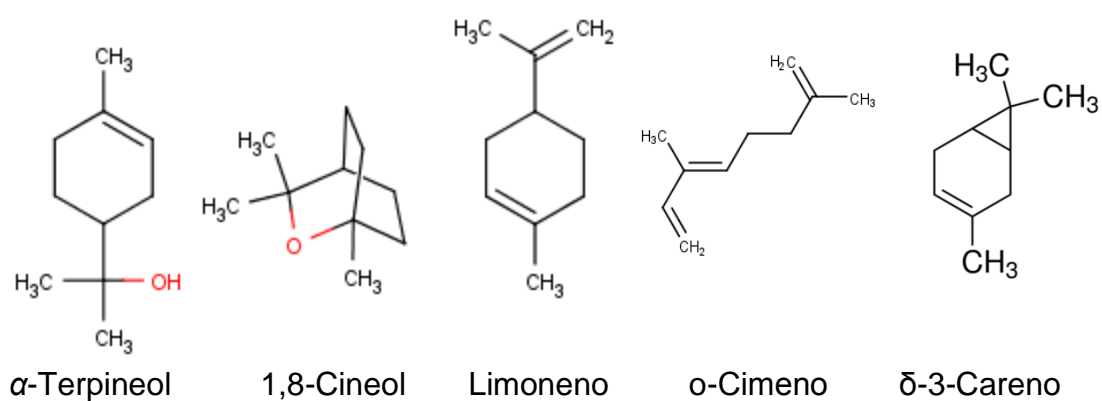
De modo geral, conforme o cromatograma representado na Gráfico 3, foi possível identificar no OEPH a presença de terpenoides. No Cromatograma do OEPH-  $\beta$ CD foi observado a presença dos 5 principais contituintes, apresentando baixo valores percentuais nos demais constituintes (tabela 9 e Fig.5). A eficiência de complexação dos constituintes  $\delta$ -3-careno, o-cimeno, limoneno, p-cineole e  $\alpha$ -terpineol (Figura 11 e quadro 8) presentes no OEPH e a  $\beta$ CD foi respectivamente 36%, 35%, 48%, 41% e 12%.

Gráfico 3 - Cromatograma da análise do OEPH e OEPH- $\beta$ CD



Quadro 8 - Constituintes do OEPH- $\beta$ CD

Sinal	Tempo de Retenção (min)	Constituinte	Fórmula molecular/Massa molecular	Rendimento
1	9,00	$\delta$ -3-Careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> /136	36%
2	9,18	o-Cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> /134	35%
3	9,28	Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> /136	48%
4	9,41	1,8-Cineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O/154	41%
5	14,18	$\alpha$ -Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O/154	12%

Figura 11: Compostos majoritários presentes no OEPH- $\beta$ CD

### 5.3 Condições analíticas e curvas de calibração – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

A curva analítica foi preparada e seus valores são apresentados nas Tabela 8, 0 e 10. Como pode-se observar, as mesmas apresentaram elevada correlação linear, podendo ser utilizadas na determinação do teor do limoneno (Fig. 12), 1,8-cineol (Fig. 13) e  $\alpha$ -terpineol (Fig.14) no complexo de inclusão.

Tabela 8 - Resultados das injeções do padrão interno (Limoneno)

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Replica		
	1	2	3
5	2.604.088	1.482.003	1.603.724
25	4.261.603	3.763.736	3.054.150
50	10.925.812	6.157.147	8.743.315
100	15.080.074	12.658.320	15.711.597
200	10.487.626	20.262.105	19.994.556
300	30.487.626	39.388.840	40.211.927
600	53.163.185	1.482.003	1.603.724

Figura 12 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do Limoneno

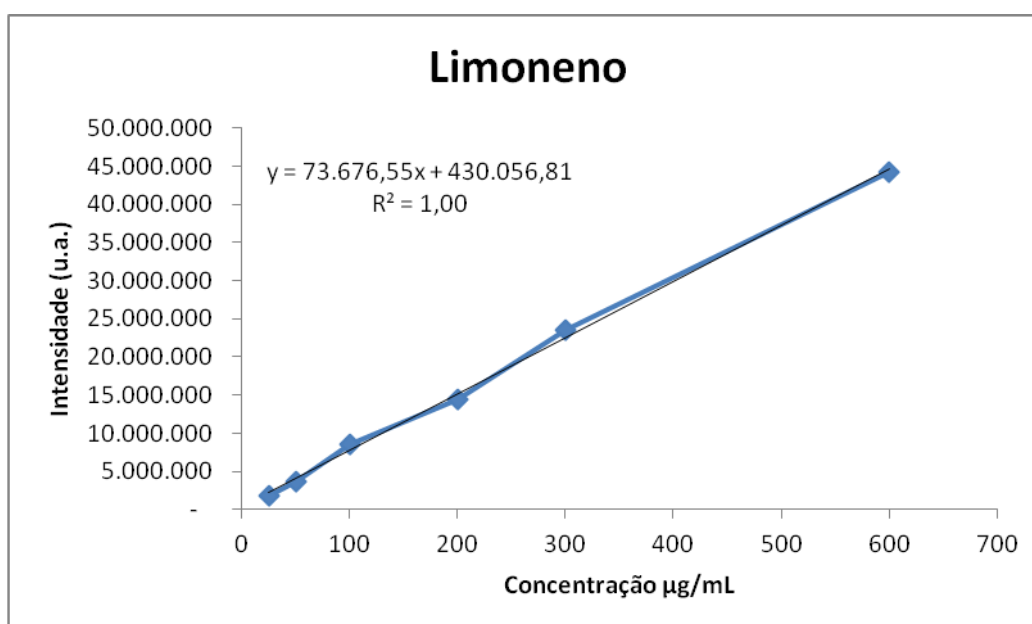




Tabela 9 - Resultados das injeções do padrão interno (1,8-Cineol)

Concentração (µg/mL)	Replica		
	1	2	3
50	4.796.486	2.900.180	3.109.988
100	8.544.153	8.207.484	8.678.263
150	15.494.774	9.753.143	13.525.717
200	15.214.956	12.843.180	15.619.655
250	25.846.171	16.635.713	16.379.875
500	45.717.969	34.363.505	34.055.186

Figura 13 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do 1,8-Cineol

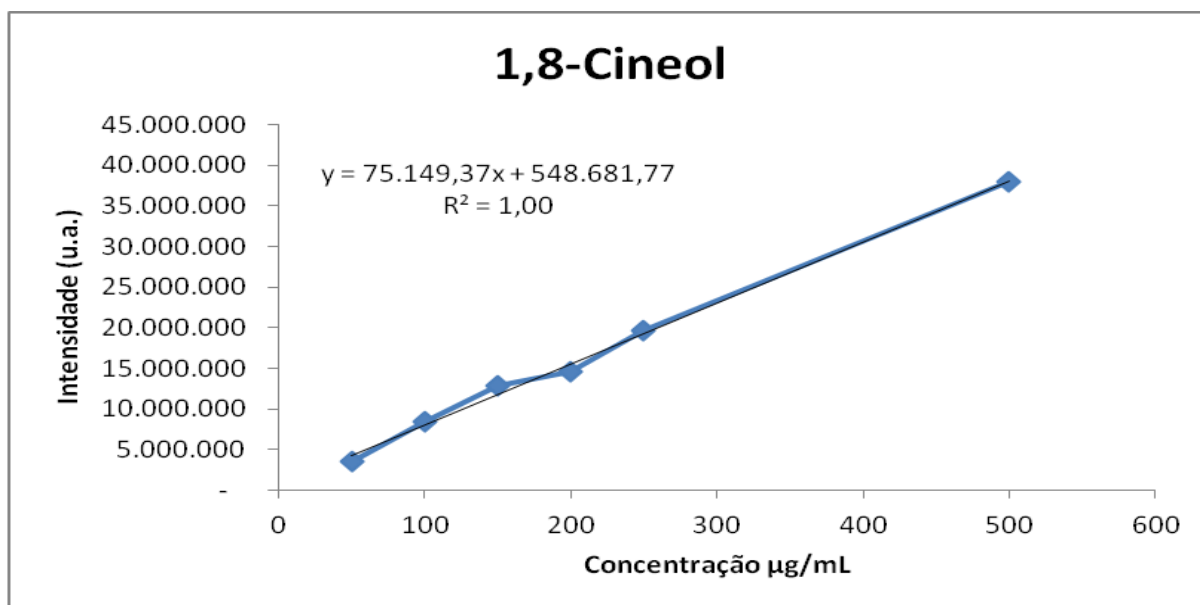
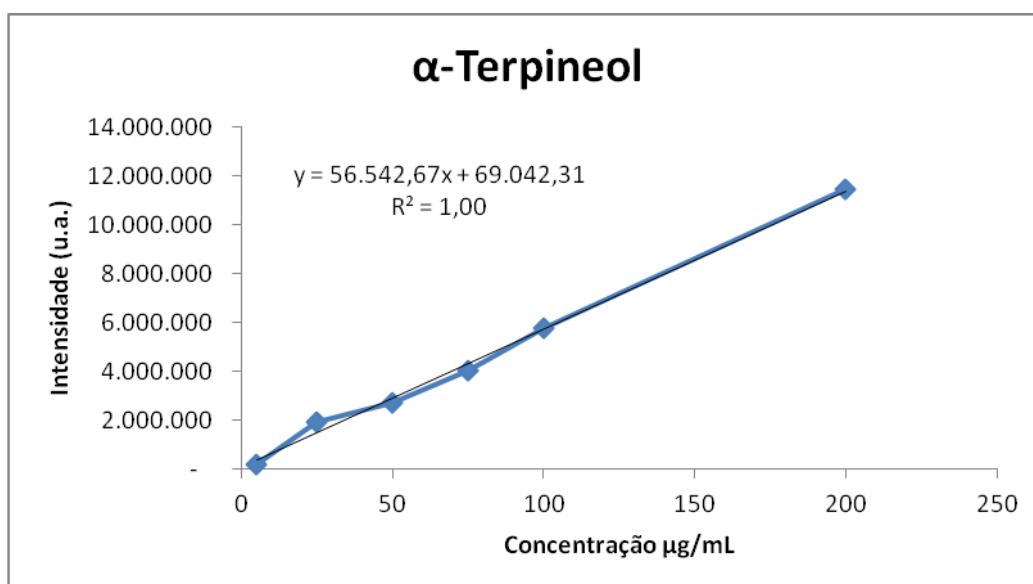


Tabela 10 - Resultados das injeções do padrão interno ( $\alpha$ -Terpineol)

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Replica		
	1	2	3
50	276.176	182.309	165.571
100	1.531.850	1.573.531	2.735.461
150	2.940.217	2.413.446	2.793.996
200	4.129.645	3.823.351	4.175.940
250	7.299.908	5.168.711	4.916.063
500	13.370.414	10.731.148	10.195.771

Figura 14 - Curva de linearidade referente à metodologia de análise do  $\alpha$ -Terpineol

Aplicando as equações das curvas analíticas foi possível obter o teor do limoneno, 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol em 100 mg de complexo de inclusão, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor dos analitos expresso em mg de cada analito em 100mg de complexo de inclusão.

Analito	Teor em 100 mg de CI
Limoneno	2,4 mg
1,8-cineol	1,6 mg
$\alpha$ -terpineol	0,5 mg

#### 5.4 Efeitos do OEPH sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos SHR e seu controle normotenso WKY por administração IV e verificação do envolvimento do bloqueio dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgico na resposta hipotensora induzida pelo OEPH.

Os valores basais da PAM e FC dos SHR e seu controle normotenso WKY foram  $154,4 \pm 17,4$  mmHg;  $324,28 \pm 4,31$  bpm e  $114,00 \pm 4,2$  mmHg;  $294,00 \pm 2,83$  bpm, respectivamente (Gráfico 4 e tabela 12).

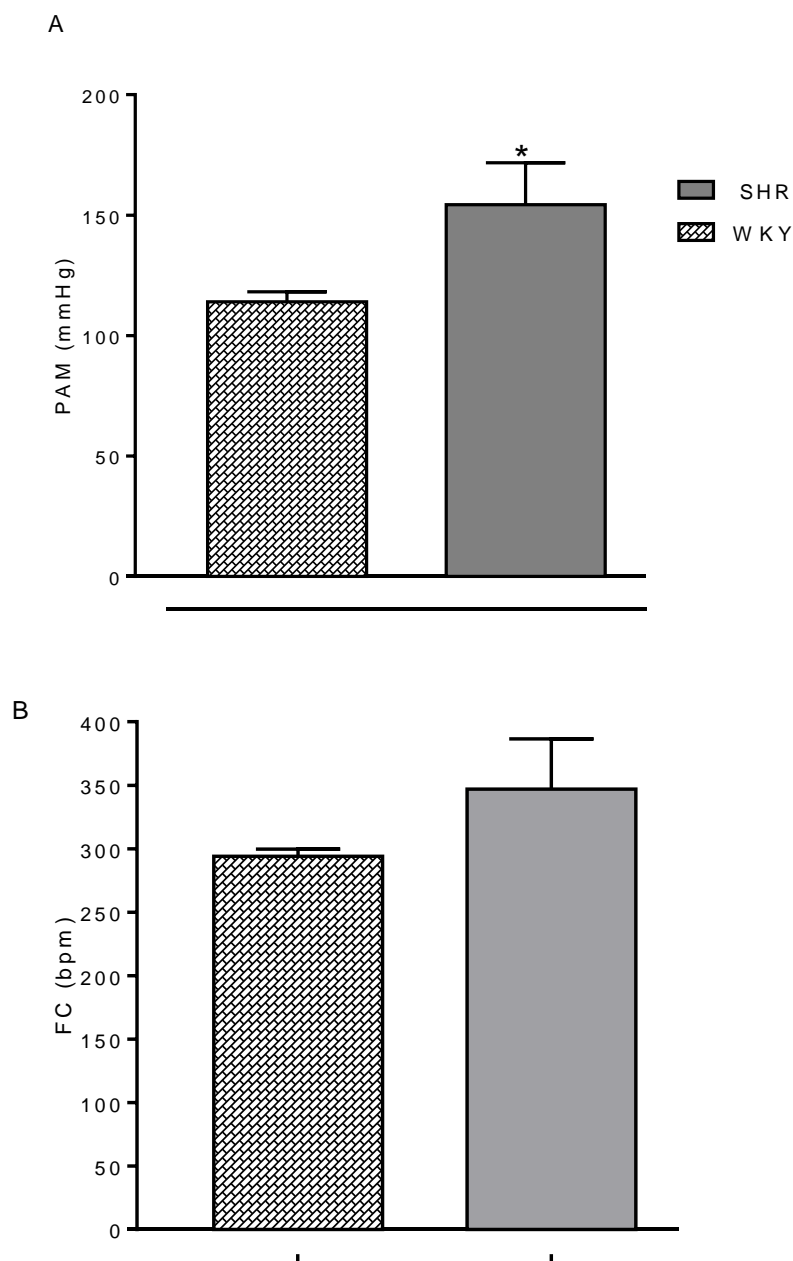
A administração venosa de doses (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, iv) de OEPH em ratos SHR, induziram uma hipotensão ( $-18,46 \pm 1,32$ ;  $-19,00 \pm 1,10$ ;  $-40,05 \pm 1,99^*$  mmHg, respectivamente) (tabela 12), sem alterar a FC na menor dose 3,125 mg/kg ( $0,97 \pm 7,38$  bpm), nas demais doses ocorreu uma bradicardia ( $-23,66 \pm 5,24$ ;  $-18,42 \pm 5,14^*$  bpm, \*  $p < 0,05$  vs OEPH) (tabela 12).

A administração da ioimbina (2 mg/kg, IV) antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos atenuou a hipotensão ( $5,36 \pm 4,31^*$  mmHg;  $-11,83 \pm 1,58^*$  mmHg e  $-18,56 \pm 7,99^*$  mmHg) (tabela 12) induzida pelo OEPH em todas as doses (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, respectivamente). A FC na menor dose não teve alteração significativa ( $2,96 \pm 1,48$  bpm), porém a dose intermediária e maior dose induziu taquicardia significativa ( $9,65 \pm 0,67^*$  bpm e  $3,72 \pm 2,15^*$  bpm, respectivamente) (tabela 12) quando comparado ao OEPH sem o bloqueio dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. \*  $p < 0,05$  vs OEPH.

A administração venosa de doses (3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, IV) de OEPH em ratos WKY, induziram uma hipotensão ( $-7,62 \pm 2,83$ ;  $-8,54 \pm 0,90$ ;  $-16,69 \pm 2,34$  mmHg, respectivamente) (tabela 12), seguido de taquicardia ( $7,49 \pm 1,41$ ;  $37,32 \pm$

9,92 e  $36,77 \pm 12$  bpm, respectivamente) (tabela 12). A administração da ioimbina (2mg/kg IV) antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos não alterou a hipotensão de forma significativa na dose de 3,125 mg/kg do OEPH ( $-4,54 \pm 2,83$  mmHg). Porém potencializou a hipotensão nas doses 6,25 e 12,5 mg/kg ( $-18,38 \pm 1,99^*$  e  $-32,61 \pm 0,97^*$  mmHg, respectivamente) (Tabela 12). Na presença da ioimbina o OEPH induziu taquicardia na menor dose (3,125 mg/kg) ( $16,20 \pm 1,54^*$  bpm) e nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg não tiveram alterações significantes na taquicardia induzida pelo OEPH ( $27,75 \pm 2,61$  bpm e  $24,18 \pm 2,94$  bpm, respectivamente) (Tabela 12),  $^*p < 0,05$  vs OEPH.

Gráfico 4 - Comparação dos valores de pressão arterial Média e Frequencia Cardíaca entre animais SHR e WKY.



Legenda: Os valores estão expressos como variação da média  $\pm$  EPM da pressão arterial média – PAM de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Wistar Kyoto (WKY) (A) em (mmHg) e FC (B) em batimentos por minuto (bpm). Para (A) (Teste paramétrico, test t de Student, com significância de 5%.  $p < 0,05$ ,  $n=07$ ). Para (B) (teste não-paramétrico, test t Mann-Whitney, com significância de 5%.  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ).

Tabela 12 – Efeito anti-hipertensivo do OEPH (venoso) em ratos hipertensos SHR e ratos normotensos WKY

Doses (mg/kg)	SHR Δ PAM (mmHg)		WKY Δ PAM (mmHg)		SHR Δ FC (bpm)		WKY Δ FC (bpm)	
	OEPH	Após ioimbina	OEPH	Após ioimbina	OEPH	Após ioimbina	OEPH	Após ioimbina
3,125	-18,5 ± 1,3	5,4 ± 4,3*	-7,6 ± 2,8	-4,5 ± 2,8	0,97 ± 7,4	2,3 ± 1,5	7,5 ± 1,4	16,2 ± 1,5 <sup>#</sup>
6,25	-19,0 ± 1,1	-11,8 ± 1,6 *	-8,5 ± 0,9	-18,4 ± 2,0 <sup>#</sup>	-23,7 ± 5,2	9,7 ± 0,7 *	37,3 ± 9,1	27,8 ± 2,6
12,5	-40,0 ± 1,1	-18,7 ± 7,1*	-16,7 ± 2,3	-32,6 ± 1,0 <sup>#</sup>	-18,4 ± 5,1	3,7 ± 2,2 *	36,8 ± 12	24,2 ± 2,3
NPS 0,01	-23,6 ± 0,9	n/r	-31,4 ± 7,7	n/r	34,51 ± 2,4	n/r	42,3 ± 4,3	n/r

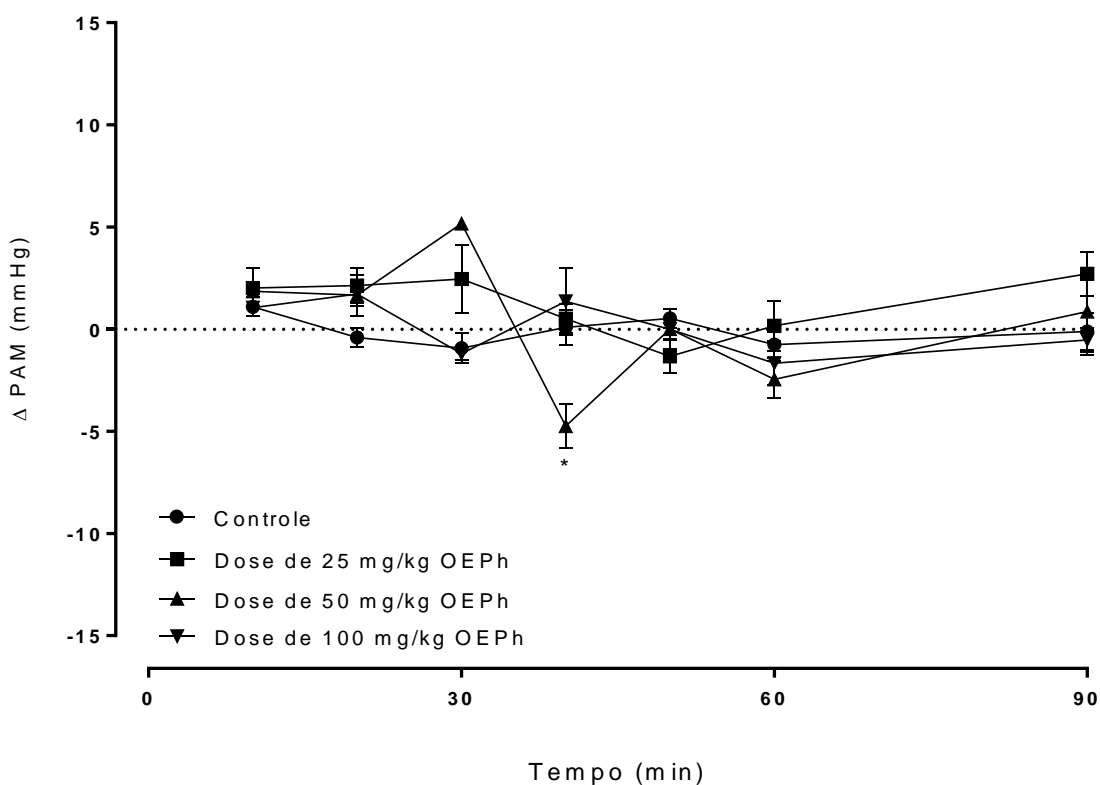
Os valores foram expressos como Média±e.p.m, \*p<0,05 vs após ioimbina quando ocorre inibição, # p<0,05 vs após ioimbina quando ocorre potencialização do efeito, Test t-Student.

### 5.5 Efeitos do OEPH sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos com L-NAME por administração VO.

Os valores basais de PAM em ratos hipertensos com L-NAME foram de  $(151 \pm 5,4 \text{ mmHg}, n=4)$ .

Na administração VO do OEPH (50 mg/kg) a variação da pressão arterial media ( $\Delta PAM$ )  $(-4,74 \pm 1,07^* \text{ mmHg}, n=4)$  parece diminuir no tempo 40 minutos. A administração VO do OEPH (25 e 100 mg/kg) parece não alterar a PAM (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Efeito do óleo essencial *Protium heptaphyllum* (OEPH) sobre a pressão arterial media (mmHg) em ratos hipertensos com L-NAME administração via oral.

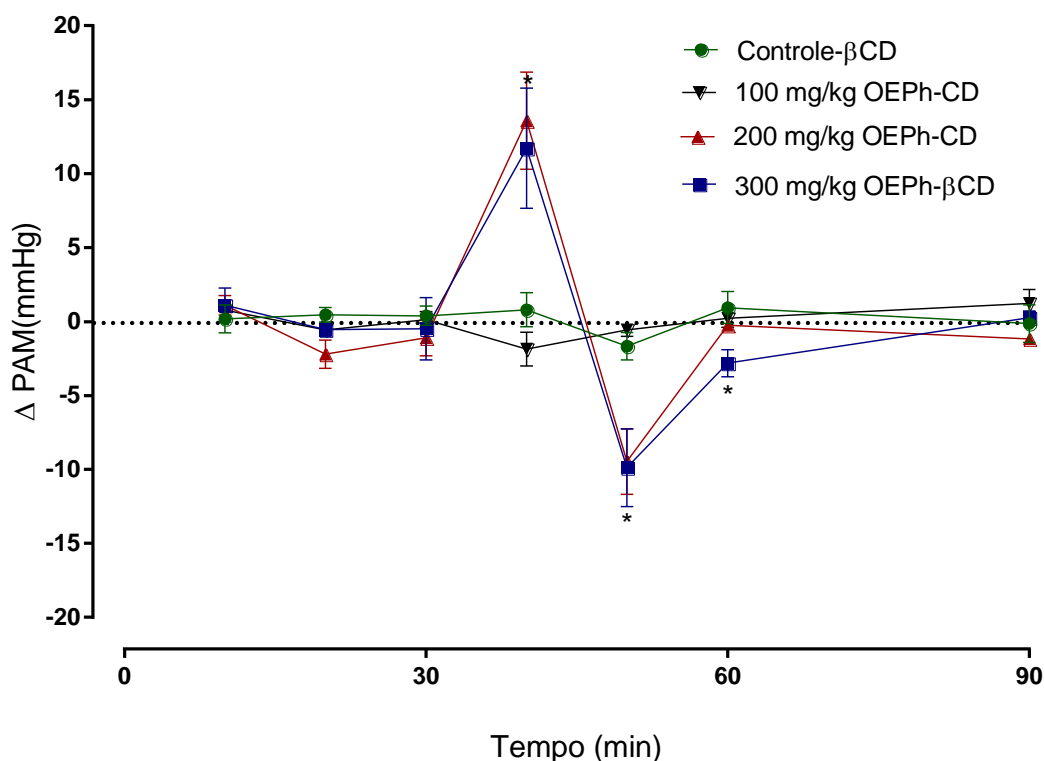


Legenda Valores expressos como média  $\pm$  epm. \*\* $p < 0,01$  vs. Controle, \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle. (teste t de Student não pareado).

### 5.6 Efeitos do OEPH- $\beta$ CD sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos com L-NAME por administração VO.

Na administração do OEPH- $\beta$ CD (100 mg/kg) não teve alteração significativa quando comparado ao controle (Gráfico 6). Na administração do OEPH- $\beta$ CD (200 mg/kg) a PAM parece aumentar de forma significativa em relação ao controle aos 40 minutos foi obtido o pico máximo, tendo um aumento do  $\Delta$ PAM ( $15^* \pm 1,97$  mmHg, n=4) e (Gráfico 6). Na administração do OEPH- $\beta$ CD (300 mg/kg) a PAM parece que diminui após os 50 min., tendo uma diminuição do  $\Delta$ PAM ( $-9,8^* \pm 2,63$ , n=4), (Gráfico 6).

Gráfico 6: Efeito do OEPH- $\beta$ CD, sobre a pressão arterial media (mmHg) em ratos hipertensos com L-NAME administração via oral.



Legenda: Efeito do Complexo  $\beta$ -ciclodextrina com óleo essencial *Protium heptaphyllum* (OEPH- $\beta$ CD) nas doses de 100; 200 e 300 mg/kg, sobre a pressão arterial media (mmHg) em ratos hipertensos com L-NAME administração VO. \* $p < 0,05$  vs Controle. (teste t de Student não pareado).



## 6 DISCUSSÃO

A composição química do óleo essencial (OE) das plantas é representada principalmente por hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados, com aldeídos, álcoois e ésteres alifáticos (ADLARD, 2010). Muitos dos OE das plantas estão sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica e há séculos são usados como medicamentos (ORAFIDIYA et al., 2002). Entre os OE usados podemos destacar o OEPh, que não foi encontrado na literatura nenhum uso no sistema cardiovascular. Devido a isso, decidimos verificar se o OEPh possuía algum efeito no sistema cardiovascular, pois na sua composição foi encontrado alguns componentes já estudados na literatura com efeito no referido sistema. O constituinte majoritário do OEPh que induz efeito hipotensivo e bradicárdico é o eucaliptol e o limoneno, que tem efeito no relaxamento vascular (BARBOSA-FILHO et al., 2008; LAHLOU et al., 2004). O  $\alpha$ -terpineol induz hipotensão e taquicardia tendo atividade de vasorelaxamentos mediados, pelo menos em parte, pelo endotélio, mais provavelmente através da liberação de NO e ativação da via NO-cGMP (RIBEIRO, THAÍS P. et al., 2010).

A partir desse conhecimento decidimos verificar o efeito do OEPh administrado por VO em animais hipertensos, utilizando o OEPh complexado com  $\beta$ -ciclodextrina.

Na administração VO do OEPh (50 mg/kg) a PAM diminuiu no tempo de 40 min, coincidindo com o provável aumento da concentração plasmática do 1,8-cineol e do linalol, que segundo MCLEAN et al 2007 e SHY et al, 2016 a farmacocinética do linalol quando administrado por VO, um dos componentes do OEPh, tem seus picos de concentração no plasma nos tempos 10 min. e 40 min. e o 1,8-cineol tem sua concentração plasmática máxima em aproximadamente 40 min, coincidindo com a diminuição da PA nos ratos em nosso experimento e a administração VO do OEPh (25 e 100 mg/kg) não alterou a PAM, demonstrando que diferente da administração endovenosa que induz hipotensão e ação anti-hipertensiva como já relatado em outros experimentos realizados, a administração oral do OEPh não tem efeito anti-hipertensivo, neste caso pode estar ocorrendo várias interferências que diminui a biodisponibilidade como absorção incompleta ou metabolismo de primeira

passagem. Além disso, o limoneno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol são biotransformado por ação de bactérias intestinais podendo diminuir o seu efeito em órgãos-alvo (JUNIOR, 2006; CHEN et al., 2015).

Em outros experimentos realizados em nosso laboratório, observamos que o OEPh quando administrado intravenosamente a partir de 3,125 mg/kg, já induz efeito hipotensor ou anti-hipertensivo, nesse caso é uma administração de 100% de biodisponibilidade, o que não ocorre quando administrado oralmente. Provavelmente os componentes que induzem efeito no sistema cardiovascular foram mal absorvidos por essa via ou foram metabolizados, pois o OEPh tem que passar pelas barreiras de absorção e metabólicas, antes de atingir o sistema geral de circulação, e sua biodisponibilidade é propensa a diminuir (devido a metabolismo gastrointestinal, absorção incompleta ou metabolismo de primeira passagem). Alguns componentes como o limoneno, 1,8-cineol e  $\alpha$ -pineno tem sua absorção por via oral prejudicada (CHEN et al., 2015; KOHLERT et al., 2000).

Devido o OEPh não fazer efeito quando administrado por VO. Decidimos produzir complexação do OEPh em  $\beta$ CD. A formação do complexo de inclusão é favorecida pela estrutura e propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, visto que esta deve ajustar-se total ou parcialmente no interior hidrofóbico da cavidade da CD. De acordo com Aguiar e colaboradores (2014), a maioria dos compostos complexados com  $\beta$ -CD encontram-se dentro da faixa de massa molecular de 100 a 400 Daltons. Analisando a composição do OEPh, pode-se observar que a massa molecular dos constituintes se encontra dentro da faixa de massa compatível com a capacidade de complexação pela  $\beta$ -CD. Além disso, estes constituintes possuem baixa solubilidade aquosa, o que favorece a formação do complexo de inclusão.

Entretanto, devido à diversidade da composição do OEPh, a complexação destes constituintes pode ocorrer com maior ou menor eficiência, a depender da afinidade destes constituintes pela cavidade da  $\beta$ -CD, sendo que diferentes constituintes podem complexar-se mais eficientemente que outros com menor afinidade (ROCHA, et al., 2018).

Entretanto, devido à diversidade da composição do OEPh, a complexação destes constituintes ocorrer com maior ou menor eficiência, a depender da afinidade destes constituintes pela cavidade da  $\beta$ CD, sendo que diferentes constituintes

podem complexar-se mais eficientemente que outros com menor afinidade (ROCHA, et al., 2018). Desta forma, a eficiência de complexação dos constituintes  $\delta$ -3-careno, o-cimeno, limoneno, *p*-cineol e  $\alpha$ -terpineol presentes no OEPH e a  $\beta$ CD foi respectivamente 36 %, 35 %, 48 %, 41% e 12%, mostrando que o  $\alpha$ -terpineol foi o constituinte com menor eficiência de complexação.

Na administração oral do complexo OEPH- $\beta$ CD, a diluição provocada pelos fluidos gastrointestinais promove a dissociação do complexo, com o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico extremamente rápido. As CDs funcionam como transportadores, carregando as moléculas hidrofóbicas do OEPH, em solução até as membranas celulares lipofílicas para sua absorção, e permanecendo nos fluidos aquosos. O elevado tamanho das CDs e de seus complexos de inclusão e sua superfície fortemente hidrofílica tornam a absorção desta molécula praticamente insignificante (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Na administração do OEPH- $\beta$ CD (100 mg/kg) não houve alteração da PAM (Gráfico 6). Provavelmente o OEPH não foi liberado ou foi liberado em poucas proporções pela CD. A CD não forma complexos estáveis com moléculas hóspedes pequenas, porque essas escapam do seu interior facilmente (BERKECZ et al., 2006). Porém os dados do espectro de infravermelho demonstram a presença de componentes do OEPH complexado com  $\beta$ CD, com baixa ou nenhuma interação entre si (Gráfico 6). Outra possibilidade seria devido ao complexo ser absorvido de forma insignificante através das membranas biológicas lipofílicas, devido a sua hidrofília e tamanho molecular, deixando apenas o OEPH livre ser absorvido (LOFTSSON; MASSON, 2001). Devido a isso, decidimos aumentar a dosagem do OEPH- $\beta$ CD, pois outra possibilidade seria que o mesmo estivesse se dissociando ou se mantendo de forma estável como complexo.

Na administração do OEPH-  $\beta$ CD (200 mg/kg) a PAM aumentou no tempo 40 minutos (Gráfico 6), o que provavelmente possa estar relacionado a atuação do fármaco a nível de receptores  $\alpha$  adrenérgicos periféricos, pois os receptores  $\alpha_1$  são pós-sinápticos, estão no músculo liso vascular e promovem vasoconstrição e efeitos simpatomiméticos (O'CONNELL et al., 2013). Os agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos podem elevar rapidamente a PA seguida de uma queda pressórica muito mais prolongada. Essa ação hipertensora inicial ocorre devido à estimulação periférica dos receptores adrenérgicos, entretanto a duração da fase hipertensiva é

transitória e está relacionada com a dose do fármaco agonista- $\alpha_2$ , enquanto a duração da fase hipotensiva não apresenta a mesma relação (ENGLAND et al., 1996).

Na administração do OEPH- $\beta$ CD (300 mg/kg) a PAM diminuiu nos tempos 50 e 60 minutos (Gráfico 6), o que pode estar relacionado a atuação em vários receptores, como muscarínicos e adrenérgicos como já foi observado em experimentos em administração IV em nosso laboratório, porém o OEPH- $\beta$ CD induz um efeito inicial hipertensor transitorio seguido de efeito anti-hipertensivo, esta resposta ocorre a partir da hipertensão transitória observada por estimulação inicial de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. A hipotensão decorre da inibição do tônus simpático ocasionados pela redução da liberação pré-sináptica de noradrenalina, o que favorece a atividade do sistema nervoso parassimpático, via acetilcolina. As alterações observadas incluem diminuição na frequência cardíaca, bloqueios atrioventriculares de primeiro e segundo grau e redução no débito cardíaco, devido a ativação dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, agonistas adrenérgicos como xilazina, medetomidina, romifidina podem induzir efeitos parecidos na PA (ENGLAND et al., 1996). Nessas doses essa formulação OEPH- $\beta$ CD se tornou inviável devido à elevada dosagem da formulação e a ação anti-hipertensiva do complexo ter sido iniciada após uma elevação da PAM e com uma curta duração. As CDs naturais, em particular as  $\beta$ CDs, têm uma solubilidade aquosa limitada, assim ficou inviável aumentar a dosagem para a administração do OEPH- $\beta$ CD (BREWSTER et al., 1991).

Em ratos SHR, que são caracterizados por uma hiperatividade simpática, o OEPH induziu efeito anti-hipertensivo quando administrado por IV e foi atenuado na presença da ioimbina (Tabela 12), deduzindo que o OEPH tem ação simpaticolítica. Porém no grupo controle WKY ocorreu uma potencialização do efeito hipotensor do OEPH na presença da ioimbina (Tabela 12), pois a atividade simpática é menos intensa que os SHR e provavelmente a indução da hipotensão nos WKY poderia estar relacionada a vasodilatação do OEPH. Esses resultados demonstram que o OEPH possa atuar em receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nos animais SHR. Em estudos anteriores foi demonstrado que o OEPH está atuando também em outros receptores com adrenérgicos não seletivos e muscarínicos explicando em parte os resultados obtidos.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho usando métodos espectroscópicos e cromatográficos sugerem a formação do complexo de inclusão da  $\beta$ -ciclodextrina com metabolitos secundários ( $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -cineno e  $\delta$ -3-careno) do OEPh por spray drying. O bioproduto formado através da complexação demonstrou possuir efeito bifásico com atividade hipertensiva e anti-hipertensiva em modelo de ratos hipertensos L-NAME. O OEPh induziu efeito anti-hipertensivo em ratos SHR quando administrado endovenosamente e parece estar atuando ao nível de receptores  $\alpha_2$ -adrenergicos. O que desperta o interesse para realização de novos estudos tecnológicos para uma nova formulação para administração.

## 8 REFERENCIAS

ADAMS, R P. Identification of Essential Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. **Allured Corp.: Carol Stream**, IL, USA, p.804, 2009.

ADLARD, E. R. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. **Chromatographia**, 2010.

AGUIAR A. U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntneri com b-ciclodextrina. **Quimica Nova**, v.37,n.1, 2014.

ALVES-SANTOS, T. R. et al. Cardiovascular Effects of the Essential Oil of Croton argyrophylloides in Normotensive Rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.9, 2016.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of Ocotea duckei. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.1, 2008.

BERKECZ, R. et al. LC Enantioseparation of Aryl-Substituted  $\beta$ -Lactams Using Variable-Temperature Conditions. **Chromatographia**, v.63, n.13, 2006.

BREWSTER, M. E.; ANDERSON, W.R.; ESTES, K.S.; BODOR, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.80, n.4, 1991.

CHEN, Y. W. et al. Effect of yohimbine on reinstatement of operant responding in rats is dependent on cue contingency but not food reward history. **Addiction Biology**. v.20, n.4, p.690-700, 2015

DA CUNHA F.; SOARES; M. S.; SÁ-BARRETO, L. C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**. V.28, n.1, 2007

ENGLAND, G. C.W. et al. Sedative effects of romifidine in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.1, p.19-25, 1996.

JUNIOR, M. R. M. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**, Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos Campinas, Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos Departamento de Ciência de Alimentos, 2006

KOHLERT, C. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v.66, n.6, 2000.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular Effects of Eugenol, A Phenolic Compound Present in Many Plant Essential Oils, in Normotensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.43, n.2, p.250-257, 2004.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; LENZA, D. Triterpenes from the protium heptaphyllum resin – Chemical composition and cytotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.24, n.24, 2014.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**. V.225, n.1-2 , 2001

MARQUES, H.; CABRAL. M.A. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**. v.80, n.4 , 2010

MCLEAN, S. et al. Pharmacokinetics of 1,8-cineole, a dietary toxin, in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): Significance for feeding, **Xenobiotica**, v.37, n.9, p.903–922, 2007

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

O'CONNELL, T. D. et al. Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance. **Pharmacological Reviews**, v.66, n.1, 2013.

ORAFIDIYA, L. O. et al. Preliminary clinical tests on topical preparations of *Ocimum gratissimum* linn leaf essential oil for the treatment of acne vulgaris. **Clinical Drug Investigation**, v.22, n.4, 2002.

RIBEIRO, A.C.F.; VALENTE, A.J.M.; LOBO, V.M.M. Transport properties of cyclodextrins. **Intermolecular diffusion coefficients**. 2008.

RIBEIRO, T. P. et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by  $\alpha$ -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.37, n.8, 2010.

ROCHA, M. dos S. et al. Characterization of the inclusion complex of the essential oil of *Lantana camara* L. and  $\beta$ -cyclodextrin by vibrational spectroscopy, GC–MS, and X-ray diffraction. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.91, n.1-2, 2018.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.1, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds 7ed 2005 - **Silverstein, Webster & Kiemle.pdf**. **Microchemical Journal**, 2005.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**. v.20, n.5-6 , 2002

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.88, 2017



## 9 CONCLUSÕES

- O OEPh não apresentou presença de sinais de toxicidade, aumentou a albumina e diminuiu a AST, não houve morte na utilização da via oral, podendo ser considerado aparentemente seguro quando administrado por via oral. Realizou-se também a verificação da viabilidade celular do MTT, obtendo uma  $CI_{50}$  com valor de 69,33  $\mu\text{g/mL}$ , sendo considerado moderadamente citotóxico, representando uma avaliação inicial, constituindo uma importante etapa na avaliação da biocompatibilidade, permitindo a racionalização da experimentação *in vivo*, com diminuição de custos, e de animais nas análises obrigatórias.

O OEPh, induz hipotensão e bradicardia em ratos, aparentemente atuando em receptores muscarínicos inespecíficos, ativando de forma indireta os receptores nicotínicos ganglionares envolvendo componentes do sistema nervoso central, aparentemente também atuam em receptores  $\alpha$  tanto no SNC quanto periféricos e em receptores  $\beta$  adrenérgicos quando administrado por via endovenosa.

Com base nos resultados usando métodos espectroscópicos e cromatográficos sugerem a formação do complexo de inclusão da  $\beta$ -ciclodextrina com metabolitos secundários ( $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -cineno e  $\delta$ -3-careno) do OEPh por spray drying. O bioproduto formado através da complexação demonstrou possuir efeito com atividade hipertensiva e anti-hipertensiva em modelo de ratos hipertensos L-NAME. O OEPh induziu efeito anti-hipertensivo em ratos SHR quando administrado endovenosamente e parece estar atuando ao nível de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

O OEPh tem potencial para reduzir a pressão arterial, porém outros estudos são necessários para que possa caracterizar seus efeitos cardiovasculares e colaterais, bem como segurança no seu uso para fins terapêuticos, o que desperta o interesse para realização de novos estudos tecnológicos para uma nova formulação para administração.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA

O OEPH também induziu efeitos anti-hipertensivos quando administrado VO em ratos hipertensos com L-NAME em doses de 100 mg/kg e induziu efeito hipotensor, quando administrado IV bastante significativo com características de atuação ao nível de receptores muscarínicos, receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos em ratos normotensos, porém essa formulação se tornou inviável para administração oral.

A partir dos resultados obtidos até o momento tem-se como perspectiva:

- A elaboração de novas formas farmacêuticas como a utilização de lipossoma ou etanossoma para administração transdêrmica.
- A verificação do efeito anti-hipertensivo dos componentes separadamente do OEPH e elaboração de nova forma farmacêutica.
- Desenvolvimento de nanopartícula do OEPH e administração em ratos hipertensos de forma subcrônica para verificar o efeito anti-hipertensivo.
- Identificar a velocidade de liberação dos metabolitos secundários do OEPH- $\beta$ CD.

## ANEXO

Hindawi  
 BioMed Research International  
 Volume 2017, Article ID 1928171, 6 pages  
<https://doi.org/10.1155/2017/1928171>

## Research Article

## Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry Analysis and Vasorelaxant Effect of Essential Oil from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

Mitra Mobin,<sup>1</sup> Sidney G. de Lima,<sup>2</sup> Lorena T. G. Almeida,<sup>2</sup> José C. Silva Filho,<sup>3</sup> Márcio S. Rocha,<sup>4</sup> Aldeídia P. Oliveira,<sup>3</sup> Marcelo B. Mendes,<sup>3</sup> Fernando A. A. Carvalho,<sup>3</sup> Marcia S. C. Melhem,<sup>5,6</sup> and José G. M. Costa<sup>7,8</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário UNINOVAFAP, 64073-505 Teresina, PI, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portella, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Ciências da Saúde, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Campus Ministro Petrônio Portella, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

<sup>4</sup>Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portella, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Instituto Adolfo Lutz, 01246-000 São Paulo, SP, Brazil

<sup>7</sup>Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri (URCA), 63105-000 Crato, CE, Brazil

<sup>8</sup>Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio (UNILEÃO), 63047-125 Juazeiro do Norte, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to Sidney G. de Lima; [sidney@ufpi.edu.br](mailto:sidney@ufpi.edu.br)

Received 26 April 2017; Accepted 26 July 2017; Published 30 August 2017

Academic Editor: Francesca Mancianti

Copyright © 2017 Mitra Mobin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The *Protium heptaphyllum* species, also known as Almécega, produces an oily resin, used in folk medicine as an analgesic and anti-inflammatory agent, in healing, and as an expectorant, which is rich in pentacyclic triterpenes and essential oils. In this study, the essential oil obtained by hydrodistillation of Almécega's resin was analyzed by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and evaluated for chemical composition and vasorelaxant activity in rat superior mesenteric artery. The main constituents determined by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry were limonene, *p*-cineole, and *o*-cymene. In intact rings precontracted with phenylephrine (Phe 1  $\mu$ M), EOPh (3–750  $\mu$ g/mL) induced relaxation, and the essential oil had a concentration-dependent vasorelaxant effect, without involvement of endothelial mediators.

### 1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), non-communicable diseases (NCDs) will be responsible for more than three-quarters of all deaths in 2030, among which cardiovascular diseases (CVD) represent a major risk. The mortality rate by CVD should rise from 17.1 million in 2004 to 23.4 million in 2030. The epidemiological data show that lifestyle and dietary habits are the main factors of the high prevalence of hypertension [1].

Conventional medicines used in the treatment of CVD have numerous collateral effects [2], and they are expensive [3]. Thus, there is a requirement for a safer, cheaper, and more powerful alternative. The professional community has increasingly accepted natural medicine, due to advances in understanding the mechanisms by which plants positively influence health and quality of life [4, 5].

Pharmaceutical studies have shown that natural products represent an extremely valuable source for the production of

## Submission Confirmation

IM

Ingrid Maier" &lt;eesserver@eesmail.elsevier.com&gt;

Dom, 17/02/2019 18:14

Você: bansaimen@gmail.com ✉



\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. marcelo bezerra mendes,

We have received your article "Hypotensive activity of essential oil from Protium heptaphyllum Aubl.) Marchand: possible involvement of adrenoceptors and muscarinic receptor" for consideration for publication in Phytomedicine as Original Article

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/phyomed/>
2. Enter these login details:  
Your username is: marcelobezerramendes@msn.com  
If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/PHYMED/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/PHYMED/automail_query.asp)
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Ingrid Maier  
Managing Editor  
Phytomedicine

\*\*\*\*\*

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

[http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample\\_editorial\\_process.pdf](http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf)

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

## American Journal of Botany

Marcelo Bezerra Mendes<sup>2\*</sup>, Alessandra Maria Braga Ribeiro<sup>2\*</sup>, Aline Suelen Silva Nunes<sup>2\*</sup>, Márcio Edivandro Pereira dos Santos<sup>2\*</sup>, Márcio S. Rocha<sup>2</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>2</sup>, Sidney Gonçalo de Lima<sup>2</sup>, Aldeídia Pereira de Oliveira<sup>1,2\*</sup>  
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Marcelo Bezerra Mendes <sup>2*</sup> , Alessandra Maria Braga Ribeiro <sup>2*</sup> , Aline Suelen Silva Nunes <sup>2*</sup> , Márcio Edivandro Pereira dos Santos <sup>2*</sup> , Márcio S. Rocha <sup>2</sup> , Edson Cavalcanti da Silva Filho <sup>2</sup> , Sidney Gonçalo de Lima <sup>2</sup> , Aldeídia Pereira de Oliveira <sup>1,2*</sup>
Short Title:	Antihypertensive effect of the essential oil of protium heptaphyllum free and complexed with $\beta$ -cyclodextrin in rats.
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Physiology and Biochemistry
Corresponding Author:	marcelo Bezerra mendes, M.D. UFPI teresina, piaui BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	marcelobezerramendes@msn.com
First Author:	marcelo Bezerra mendes, M.D.
Order of Authors:	marcelo Bezerra mendes, M.D. alessandra maria braga ribeiro Aline Suelen Silva Nunes Márcio Edivandro Pereira dos Santos Márcio S. Rocha Edson Cavalcanti da Silva Filho Sidney Gonçalo de Lima Aldeídia Pereira de Oliveira
Abstract:	The essential oil of <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand (PhOE), is rich in mono- and sesquiterpene. We decided to perform protocols in hypertensive rats with intravenous and oral administration of PhOE and $\beta$ -cyclodextrin/PhOE complex, respectively, to verify and compare the efficacy of the hypotensive effect of both PhOE and its complex. In SHR mice, the PhOE induces an antihypertensive effect at doses (3.125 mg / kg, 6.25 mg / kg and 12.5 mg / kg), significantly ( $-18.46 \pm 1.32$ mmHg; $-19\% \pm 1.11$ mmHg and $-40.06 \pm 2.00$ mmHg, respectively) and HR had no significance at the lower dose and in the intermediate doses and higher dose had bradycardia. And in the presence of yohimbine the antihypertensive effect was attenuated. Demonstrating that PhOE may also be acting at the level of alpha-adrenergic receptors in SHR rats. In v.o. of PhOE (25 mg/kg) to MAP increased significantly over the control after 20 minutes. In v.o. of the PhOE (50 mg/kg) the MAP increased compared to the control after 30 minutes followed by a decrease in the MAP after 40 minutes. Administration v.o. of PhOE (100 mg/kg) increased the MAP in relation to the control after 20 minutes. In the administration of PhOE-CD (100 mg/kg) there was no change when compared to the control. In the administration of PhOE-CD (200 mg/kg) the MAP increased in relation to the control after 40 minutes. In the administration of OEP-CD (300 mg/kg) the MAP decreased with respect to the control after 50 minutes.
Keywords:	Essential oil; Antihypertensive; $\beta$ - cyclodextrin; $\alpha$ 2-adrenergic.
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	
Funding Information:	