



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IZABEL RODRIGUES DE SANTANA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO (-)-ISOPULEGOL EM ANIMAIS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

ARACAJU

2024

IZABEL RODRIGUES DE SANTANA	EFEITOS CARDIOVASCULARES DO (-)-ISOPULEGOL EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	2024
------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	-------------

IZABEL RODRIGUES DE SANTANA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO (-)-ISOPULEGOL EM ANIMAIS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

ARACAJU

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S232e Santana, Izabel Rodrigues de
Efeitos cardiovasculares do (-)-isopulegol em animais normotensos e hipertensos / Izabel Rodrigues de Santana ; orientador André Sales Barreto. – Aracaju, 2024.
100 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Ciências da saúde. 2. Hipertensão arterial. 3. Farmacologia. 4. Monoterpeno. 5. Terapêutica. 6. Ratos como animais de laboratório. I. Barreto, André Sales, orient. II. Título.

CDU 616.12-008.331.2

IZABEL RODRIGUES DE SANTANA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO (-)-ISOPULEGOL EM ANIMAIS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof. Dr. Diego Santos de Souza

Universidade Federal de Sergipe

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre derramou da sua infinita misericórdia e bondade sobre a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me guiar e me dar forças.

À minha família, expresso minha profunda gratidão por seu amor e cuidado. Especialmente a minha tia, Lúcia, minha avó, Maria de Lourdes (*in memoriam*) e meu irmão, Ruan. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu noivo, Josuel, por ser o meu melhor amigo, por apoiar os meus sonhos, alegrar os meus dias e compartilhar comigo as melhores aventuras. Eu te amo!

Aos meus sogros, Adriana e Barros, agradeço por me acolherem como parte da família. E incentivarem os meus sonhos.

Aos meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado, compartilhando risos, lágrimas e experiências inesquecíveis.

Aos colegas de laboratório, pelo trabalho em equipe, troca de conhecimentos, colaboração e momentos de descontração. Especialmente à Gabrielle, que me ajudou diversas vezes no desenvolvimento desse estudo e se tornou uma amiga que levarei para a vida.

À Aimée, por cada conversa, cada risada e, principalmente, por cada ensinamento.

Ao professor Marcus Vinícius Batista, que me orientou no estágio durante a graduação e pela parceria no desenvolvimento do meu mestrado.

À banca avaliadora, composta pelos professores Dr. Márcio Roberto, Dr. Diego de Souza e Dr. João Eliakim Araújo, pelas sugestões e contribuições, que foram fundamentais para o aprimoramento deste estudo.

Ao meu orientador, André Barreto, expresso minha gratidão por sua orientação, incentivo e oportunidades.

Aos animais utilizados neste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

SANTANA, I.R. Efeitos cardiovasculares do (-)-isopulegol em animais normotensos e hipertensos, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, p. 100. 2024.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs). Apesar da existência de terapias farmacológicas tradicionais, a morbimortalidade por DCVs persiste como um desafio global. Motivando a investigação das propriedades biológicas de plantas, especialmente dos terpenos, como abordagem terapêutica, graças a seus amplos efeitos biológicos sobre o sistema cardiovascular. O (-)-isopulegol ((-)-ISO) é um monoterpene e possui propriedades anti-inflamatória, antioxidante e bloqueadora de canais para cálcio descritas na literatura. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares do (-)-ISO em animais normotensos e hipertensos. Para isso, foram utilizados 76 ratos *Wistar* machos normotensos e hipertensos (induzidos por L-NAME 20 mg/kg por 7 dias) (CEUAS: 2521170223/ 9546170223/1239150223). Medidas de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram realizadas antes e após a administração intravenosa de diferentes doses de (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg) e das ferramentas farmacológicas: atropina (ATR 2 mg/kg), indometacina (INDO 5 mg/kg), hexametônio (HEXA) e L-NAME (20 mg/kg) em ratos normotensos. Ratos hipertensos receberam (-)-ISO oral (200 mg/kg) e foram avaliados por 48 horas. Estudos *in vitro* foram realizados utilizando artéria mesentérica superior de ratos normotensos para avaliar a responsividade vascular à (-)-ISO (10^{-2} - 10^{-6} M), bem como para elucidar os mecanismos de ação associados às vias independentes do endotélio (K^+ e Ca^{2+}). Os resultados demonstraram que o (-)-ISO induziu resposta hipotensora e bradicárdica em ratos normotensos. Os bloqueios com ATR ou HEXA reduziram a bradicardia, sugerindo a participação dos receptores nicotínicos e ativação indireta dos muscarínicos nas respostas bradicárdicas induzidas pelo (-)-ISO. Já o bloqueio com L-NAME reduziu apenas a hipotensão na dose 10 mg/kg. Além disso, a administração oral de (-)-ISO 200 mg/kg reduziu a hipertensão de forma sustentada por 48 horas. Os estudos *in vitro* destacaram que a resposta hipotensora pode estar associada ao efeito vasorrelaxante independente do endotélio, sugerindo a atuação do (-)-ISO na inibição dos canais para cálcio sensíveis à voltagem do tipo L, interação com os receptores IP_3 e na sensibilização da maquinaria contrátil na musculatura lisa vascular. Esses achados sugerem que o (-)-ISO é um candidato promissor para futuros estudos e terapias farmacológicas.

Palavras-chaves: (-)-Isopulegol. Hipertensão arterial. Monoterpene. Vasorrelaxamento.

ABSTRACT

SANTANA, I.R. Cardiovascular effects of (-)-isopulegol in normotensive and hypertensive animals, Dissertation (Master's in Health Sciences), - Graduate Program in Health Sciences (PPGCS), Federal University of Sergipe, Aracaju-SE, p. 100. 2024.

Systemic arterial hypertension (SAH) is a risk factor for the development of cardiovascular diseases (CVDs). Despite the availability of traditional pharmacological therapies, CVD morbidity and mortality remain a global challenge. This has spurred the investigation of the biological properties of plants, particularly terpenes, as a therapeutic approach due to their extensive biological effects on the cardiovascular system. (-)-Isopulegol ((-)-ISO) is a monoterpene with documented anti-inflammatory, antioxidant, and calcium channel-blocking properties. Therefore, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular effects of (-)-ISO in normotensive and hypertensive animals. For this purpose, 76 normotensive and hypertensive male *Wistar* rats (hypertension induced by L-NAME 20 mg/kg for 7 days) were used (CEUAS: 2521170223/9546170223/1239150223). Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured before and after intravenous administration of various doses of (-)-ISO (1, 5, 10, and 20 mg/kg) and pharmacological agents: atropine (ATR 2 mg/kg), indomethacin (INDO 5 mg/kg), hexamethonium (HEXA), and L-NAME (20 mg/kg) in normotensive rats. Hypertensive rats received oral (-)-ISO (200 mg/kg) and were evaluated over 48 hours. In vitro studies were conducted using the superior mesenteric artery of normotensive rats to assess vascular responsiveness to (-)-ISO (10^{-2} - 10^{-6} M) and to elucidate the mechanisms of action associated with endothelium-independent pathways (K^{+} and Ca^{2+}). The results demonstrated that (-)-ISO induced hypotensive and bradycardic responses in normotensive rats. Blockade with ATR or HEXA reduced bradycardia, suggesting the involvement of nicotinic receptors and indirect activation of muscarinic receptors in the bradycardic responses induced by (-)-ISO. However, blockade with L-NAME reduced only hypotension at the 10 mg/kg dose. Additionally, oral administration of (-)-ISO 200 mg/kg reduced hypertension in a sustained manner for 48 hours. In vitro studies highlighted that the hypotensive response may be associated with an endothelium-independent vasorelaxant effect, suggesting that (-)-ISO acts by inhibiting L-type voltage-sensitive calcium channels, interacting with IP_3 receptors, and sensitizing the contractile machinery in vascular smooth muscle. These findings suggest that (-)-ISO is a promising candidate for future studies and pharmacological therapies.

Keywords: (-)-Isopulegol. Arterial hypertension. Monoterpene. Vasorelaxation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. A pressão Arterial	3
2.2. Hipertensão	4
2.3. Sistema Nervoso Autônomo	5
2.4. Receptores Colinérgicos:	6
2.5. Receptores Adrenérgicos	8
2.6. Mecanismos de Contração do Músculo Liso	9
2.7. Participação do Endotélio no Vasorrelaxamento	10
2.8. Óxido Nítrico (NO)	11
2.9. Disfunção Endotelial e Hipertensão	13
2.10. Plantas Medicinais e Metabólitos Secundários	13
2.11. Monoterpenos	14
2.12. Isopulegol (ISO)	14
3. OBJETIVOS:.....	18
3.1. Geral:	18
3.2. Específicos:.....	18
4. METODOLOGIA:	19
4.1. Animais:.....	19
4.2. Ferramentas Farmacológicas:	20
4.3. Soluções nutritivas:.....	21
4.4. Categorização dos grupos experimentais:	23
4.4.1. Tratamento Agudo (i.v.):	23
4.4.2. Tratamento Subagudo (v.o.):	23
4.4.3. In vitro:	24

4.5.	Procedimentos Experimentais “in vivo”:	24
4.5.1.	Indução da hipertensão:	24
4.5.2.	Cirurgia de cateterização:	25
4.5.3.	Avaliação hemodinâmica:	25
4.6.	Procedimentos Experimentais “in vitro”:	26
4.6.1.	Preparo da artéria mesentérica:	26
4.6.2.	Avaliação dos efeitos do (-)-ISO sobre a artéria mesentérica superior de ratos:	28
4.6.3.	Avaliação do papel do endotélio no efeito induzido pelo (-)-ISO:	28
4.6.4.	Avaliação da participação dos canais para Ca ²⁺ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO em anéis de artéria mesentérica superior de ratos incubados com KCl 80 mM:	29
4.6.5.	Avaliação do efeito do (-)-ISO (10 ⁻⁸ - 10 ⁻² M) sobre o influxo de Ca ²⁺ através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem, em contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl ₂):	30
4.6.6.	Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis à voltagem do tipo-L:	30
4.6.7.	Avaliação da participação dos canais para K ⁺ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO:	31
4.6.8.	Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações transientes induzidas por FEN (1 µM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos:	32
4.6.9.	Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações induzidas por Na ₃ VO ₄ em anéis de artéria mesentérica superior de ratos:	32
4.7.	Procedimentos Experimentais “in silico”:	33
4.7.1.	Análise Docking Molecular	33
4.8.	Análise Estatística	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	35
5.1.	<i>In vivo</i> agudo:	35
5.1.1.	Avaliação da Funcionalidade das Ferramentas Farmacológicas:	37
5.1.2.	Avaliação da Participação dos Receptores Muscarínicos	38

5.1.3. Avaliação da Participação dos Receptores Nicotínicos	40
5.1.4. Avaliação da Participação do Óxido Nítrico	43
5.1.5. Avaliação da Participação da Ciclooxigenase	44
5.2. <i>In vivo</i> subagudo:.....	46
5.3. <i>In vitro</i> :	49
5.3.1. Avaliação da Participação dos Canais para Potássio (K^+) nas respostas induzidas pelo (-)-ISO:	51
5.3.2. Avaliação da Participação dos Canais para Cálcio (Ca^{2+}) nas Respostas Induzidas pelo (-)-ISO:.....	53
5.3.3. Participação da Maquinaria Contrátil da Musculatura Lisa nas Respostas Induzidas pelo (-)-ISO:.....	60
6. CONCLUSÃO:	62
7. PERSPECTIVAS:	63
8. REFERÊNCIAS:	64
9. ANEXOS	75
10. PUBLICAÇÕES E COLABORAÇÕES	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Organização do sistema nervoso simpático e parassimpático. ACh: acetilcolina; NA: Noradrenalina. (Adaptado de SILVERTHORN, 2010). 6
- Figura 2** - Representação das estruturas dos receptores nicotínicos e muscarínicos. (Adaptado de FELDER et al., 2000). 8
- Figura 3** - Representação do Mecanismo de Contração na Célula Muscular Lisa (Adaptado de GUYTON e HALL, 2017). Ca^{2+} - íon cálcio: elemento chave no processo de contração muscular, ligando-se à calmodulina para ativar a miosina-quinase. CaM – calmodulina: proteína que, ao se ligar ao cálcio, ativa a miosina-quinase. MLCK - Miosina Quinase de Cadeia Leve: enzima que fosforila a miosina, permitindo a sua interação com a actina. P - Fosfato - grupo químico adicionado à miosina pela MLCK, essencial para a ativação da miosina. MLC – Miosina de cadeia leve: proteína que, quando fosforilada pela MLCK, permite a interação da miosina com a actina, levando à contração muscular. 10
- Figura 4** - Representação esquemática da estrutura das artérias. (Adaptado de KLOC; GHOBRIAL, 2014). 11
- Figura 5** - Representação do Mecanismo de Produção de NO. (Adaptado de DESPOPOLOUS, 2003). **M** – Mensageiro. **R** - Receptor. **Gq** – Proteína Gq: proteína que, quando ativada por um receptor, estimula PLC- β para desencadear a sinalização intracelular através da produção de IP_3 e DAG. **PLC- β** - Fosfolipase C- β : enzima que catalisa a hidrólise PIP_2 em IP_3 e DAG. **PIP $_2$** : Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato - fosfolípido de membrana que é hidrolisado pela PLC- β para formar IP_3 e DAG. **DAG**: Diacilglicerol - molécula que, junto com IP_3 , é produzida a partir da hidrólise de PIP_2 pela PLC- β . **IP $_3$** : Inositol 1,4,5-trifosfato - molécula que ativa os receptores de IP_3 no retículo sarcoplasmático, resultando na liberação de Ca^{2+} para o citosol. **Ca $^{2+}$** : Cálcio - íon chave no processo de sinalização celular. **CaM**: Calmodulina - proteína que se liga ao Ca^{2+} , formando um complexo que ativa a eNOS. **eNOS**: Óxido Nítrico Sintase Endotelial - subtipo de NOS encontrado no endotélio que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. **NO** – Óxido nítrico: mensageiro molecular que ativa a GC. **GC**: Guanilato Ciclase - enzima que converte o GTP em cGMP. **cGMP**: Monofosfato de Guanosina Cíclico - molécula que ativa a PKG. **PKG**: Proteína Quinase G - enzima que fecha os canais para Ca^{2+} e inibe a MLCK, resultando na desfosforilação da cadeia leve de miosina e no relaxamento da musculatura lisa vascular. 12
- Figura 6** -Estrutura química do (-)-isopulegol. (Adaptado de FILHO, 2019). 15
- Figura 7** - Ratos Wistar. Fonte: Autor 19
- Figura 8** - Esquema do delineamento experimental para indução da hipertensão e cirurgia de cateterização. D-dia. 24
- Figura 9** - Representação Esquemática da Cirurgia de cateterização da artéria e veia femoral (Adaptado de JESPERSEN; KNUPP; NORTHCOTT, 2012). 25
- Figura 10** - Representação Esquemática do Protocolo In vivo Intravenoso. NOS- óxido nítrico sintase, COX- ciclo-oxigenase. (-)-ISO- (-)-isopulegol. 26

- Figura 11** - Representação da artéria mesentérica superior de ratos e anel de artéria montado em sistema de banho de órgãos, inseridos em solução nutritiva Tyrode e gaseada com carbogênio. (Adaptado de ALBUQUERQUE et al., 2016; DESESSO; JACOBSON; WILLIAMS, 2012)..... 27
- Figura 12** - Esquema do protocolo experimental realizado para a caracterização dos efeitos do (-)-ISO sobre a artéria artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 28
- Figura 13** - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do papel do endotélio nos efeitos do (-)-ISO sobre artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 29
- Figura 14** - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação da participação dos canais para Ca²⁺ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO em anéis de artéria mesentérica superior de ratos incubados com KCl 80 mM. Estab- estabilização da tensão basal, FEN - fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 29
- Figura 15** - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do efeito do (-)-ISO (10⁻⁸- 10⁻² M) sobre o influxo de Ca²⁺ através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem, em contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl₂). Estab- estabilização da tensão basal, FEN - fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 30
- Figura 16** - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol. 31
- Figura 17** - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação da participação dos canais para K⁺ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, TEA- tetraetilamônio, (-)-ISO-(-)-isopulegol..... 31
- Figura 18** - Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações transientes induzidas por FEN (1 µM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 32
- Figura 19** - Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações induzidas por Ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol..... 33
- Figura 20 - A**- Registro original mostrando as variações de pressão média (mmHg) em função do tempo (segundos) após a administração aguda (i.v.) randomizadas do isopulegol (-)-ISO (1, 5, 10 e 20 mg/kg) em um rato normotenso não anestesiado. A setas indicam o momento da administração das doses. Efeito hipotensor (**B**) e bradicárdico (**C**) induzido pela

administração aguda de doses randomizadas de (-)-ISO (1, 5, 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 vs veículo.
..... 35

Figura 21 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com atropina (ATR) (2mg/kg, i.v., n = 6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs controle. 39

Figura 22 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com hexametônio (HEXA) (20 mg/kg, i.v., n = 6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs controle 40

Figura 23 - Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de docking entre (-)-Isopulegol e o receptor nicotínico de *Rattus Norvegicus*..... 42

Figura 24 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v., (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. **p < 0,01 vs controle..... 44

Figura 25 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com indometacina (INDO) (5 mg/kg, i.v., n = 6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni..... 45

Figura 26 - Efeito do tratamento oral (via gavagem) do (-)-ISO puro (200 mg/kg), controle nifedipina (CN) (10 mg/kg) e controle veículo (CV) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos hipertensos (L-NAME) (n = 6) antes (tempo 0) e 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 24; 30; 48 h após os tratamentos. Os valores são expressos como média ± e.p.m. Foi utilizado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (-)-ISO vs CV; &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001 CN vs CV §p < 0,05 T2H vs T0H, §§p < 0,01 T48H vs T0H.
..... 47

Figura 27 - Curvas concentração-resposta para (-)-ISO: (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos com endotélio funcional (E⁺) (n = 7) e sem endotélio funcional (E⁻) (n = 6) pré-contraído com FEN (1µM). Os valores foram expressos como média ± sem. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05. 50

Figura 28 - Curvas concentração-resposta para (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos sem endotélio funcional (E⁻), pré-contraídos com FEN

(1 μ M) antes (n = 6) e após incubação com TEA (1mM) ou KCl 20 mM (n = 6). Os valores foram expressos como média \pm sem. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs (-)- ISO (E⁻)..... 52

Figura 29 - Curvas concentração-resposta para o (-)-ISO (10⁻⁶-10⁻² M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E⁻), pré-contraídos com FEN (1 μ M) (n = 6) e com KCl 80 mM (n = 6). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados estatísticos foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05; ***p < 0,001 (-)-ISO + KCl80 vs (-)-ISO (E⁻). 54

Figura 30 - Curvas concentração-resposta para o CaCl₂ (10⁻⁶ -10⁻³ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E⁻), antes (controle) (n = 6) e após a pré-incubação com (-)-ISO (10⁻³, 3x10⁻³ ou 10⁻² M; n = 5). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. **p < 0,01; ***p < 0,001 vs controle..... 55

Figura 31 - Curvas concentração-resposta para o (-)-ISO (10⁻⁸-10⁻² M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E⁻), pré-contraídos com FEN (1 μ M) (n = 6) e com S(-)-Bay-K 8644 (n = 5). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05; ***p < 0,001 (-)-ISO + S(-)-Bay-K 8644 vs (-)-ISO + FEN (1 μ M). 56

Figura 32 - Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de acoplamento entre (-)-Isopulegol e a subunidade alfa-1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem de *Rattus Norvegicus*..... 58

Figura 33 - Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de acoplamento entre a nifedipina e a subunidade alfa-1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem de *Rattus Norvegicus*..... 58

Figura 34 - Efeito das concentrações isoladas de (-)-ISO sobre as contrações transientes induzidas por FEN (1 μ M), em anéis de artéria mesentérica em solução livre de Ca²⁺ sem endotélio funcional (n = 5). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 vs controle. 60

Figura 35 - Curvas concentração-resposta para o ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) (10⁻⁵-3x10⁻²) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional antes (controle) (n = 6) e após a pré-incubação com (-)-ISO (10⁻³, 3x10⁻³ ou 10⁻² M) (n = 6). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 vs controle. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias presentes na solução nutritiva de Tyrode, com suas concentrações correspondentes	21
Tabela 2 - Substâncias presentes na solução nutritiva de Tyrode nominalmente sem Cálcio, com suas concentrações correspondentes.....	21
Tabela 3 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM com suas concentrações correspondentes	22
Tabela 4 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM com suas concentrações correspondentes	22
Tabela 5 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem cálcio com suas concentrações correspondentes	22
Tabela 6 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM com suas concentrações correspondentes.	23
Tabela 7 - Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados antes (controle; n = 6) e após administração aguda (i.v.) de ATR (2 mg/kg; n = 6), HEXA (20 mg/kg; n = 6), L-NAME (20 mg/kg; n = 6) e INDO (5 mg/kg; n = 6). PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; ATR: atropina; HEXA: hexametônio; L-NAME: Nw-nitro-L-arginina-metil-éster; INDO: indometacina. Os valores estão expressos como média ± e.p.m dos registros obtidos. Foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni; *** p < 0,001 vs controle.....	38
Tabela 8 - Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos induzidos por L-NAME (20 mg/kg).....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação da Pressão Arterial: Valores que Delimitam as Categorias dos Níveis de Hipotensão, Normais e Hipertensão determinados pelas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (Adaptado de BARROSO et al., 2021).....	4
Quadro 2 - Subtipos de Receptores Muscarínicos: Localização e Funcionalidade. (Adaptado de BROADLEY; KELLY, 2001).	7
Quadro 3 - Subtipos de Receptores Adrenérgicos: Localização e Funcionalidade. (Adaptado de MASUO, 2010).....	8
Quadro 4 - Estudos com Isopulegol: Modelos Animais, Atividade Biológica e Doses Utilizadas.....	15
Quadro 5 – Ferramentas Farmacológicas Utilizadas no Estudo: Peso Molecular e Mecanismo de Ação	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(-)-ISO – (-)-Isopulegol

ACh – Acetilcolina

ANG II – Angiotensina II

ATR – Atropina

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BCC – Bloqueadores dos Canais para Cálcio

BK_{ca} – Canal para Potássio Ativados por Cálcio de Grande Condutância

BRA – Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II

Ca²⁺ – Íon Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CAM – Complexo Cálcio-Calmodulina

Ca_v 1.2 – Canal para Cálcio Dependente de Voltagem do Tipo L

Ca_v – Canal para Cálcio Dependente de Voltagem

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CF – Contração Obtida Após a Adição de 1 µM de FEN

cGMP – Monofosfato de Guanosina Cíclico

CIUCA – Cadastro das Instituições de Uso de Animais

CML – Célula Muscular Lisa

CMLV – Célula Muscular Lisa Vasular

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

DAG – Diacilglicerol

DC – Débito Cardíaco

DCVs – Doenças Cardiovasculares

DFS – Departamento de Fisiologia

DL50 – Dose Letal Média para 50% dos animais

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECG – Eletocardiograma

EDHF – Fatores Hiperpolarizantes Derivados do Endotélio

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EOCW – Óleo Essencial de *Cymbopogon Winterianus*

FC – Frequência Cardíaca

FEN – Fenilefrina

FRDE – Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio

GC – Guanilato Ciclase

GMBio – Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia

GPCR – Receptor Acoplado à Proteína G

Gq – Proteína Gq

GTP – Guanosina Trifosfato

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HEXA – Hexametônio

IECA – Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

INDO – Indometacina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IP₃ – Inositol 1,4,5-trifosfato

ISO – Isopulegol

K⁺ – Íon Potássio

K_{ATP} - Canal para Potássio Sensível a ATP

KCl – Cloreto de Potássio

K_v – Canal para Potássio Dependente de Voltagem

LAFAC – Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

LB – Linha de Base

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

L-NAME - L-N^W-Nitroarginine Methyl Ester Hydrochloride

M2 – Receptores Muscarínicos do Subtipo M2

M3 – Receptores Muscarínicos do Subtipo M3

mAChR - Receptor Muscarínico de Acetilcolina

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MLC – Cadeia Leve de Miosina

MLCK – Miosina Quinase de Cadeia Leve

NA – Noradrenalina

Na₃VO₄ – Ortovanadato de Sódio

nAChR – Receptor Nicotínico de Acetilcolina

nAChR-m – Receptor Nicotínico de Acetilcolina Muscular

nAChR-n – Receptor Nicotínico de Acetilcolina Neuronal

NaCl – Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato Monosódico de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NCT – Nicotina

NIF – Nifedipina

nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neural

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

PA – Pressão Arterial

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PCL-β – Fosfolipase C-β

PDB – Protein DataBank

PE – Catéter de Polietileno

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ – Prostaciclina

PIP₂ – Fosfolipídio Fosfotidilinositol 4,5-bifosfato

PKG – Proteína Quinase G

RA – Relaxamento Obtido Após a adição de 1 μM de Ach

ROCK – Rho-quinase

RVPT – Resistência Vascular Periférica Total

RVS – Resistência Vascular Periférica

SA – Nódulo Sinoatrial

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TEA – Tetraetilamônio

WHF – World Heart Federation

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a World Heart Federation (WHF), as doenças cardiovasculares (DCVs) emergem como a principal causa de morbimortalidade global. Em um período de aproximadamente 30 anos, o número de óbitos aumentou de 12,1 milhões em 1990 para 18,6 milhões em 2019. Em 2021, as DCVs foram responsáveis por um total de 20,5 milhões de mortes (WORLD HEART FEDERATION, 2023).

No Brasil, até o início de dezembro de 2023, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) estimou que aproximadamente 373.000 pessoas perderam suas vidas devido a complicações cardiovasculares, destacando a urgência de ações eficazes para combater essa crescente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2023).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos, com valores de pressão arterial sistólica (PAS) iguais ou superiores a 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) iguais ou superiores a 90 mmHg. Essa condição é apontada como o principal fator de risco para mortalidade e desenvolvimento de DCVs, contribuindo com 10,8 milhões de mortes no mundo em 2021 (WORLD HEART FEDERATION, 2023).

Apesar dos avanços tecnológicos e da existência de variados fármacos para o tratamento da HAS, eles não têm sido suficientes para reverter o número de casos e a mortalidade. Esse cenário pode ser atribuído a fatores sociais, efeitos colaterais e à complexidade da terapia combinada, que dificulta a adesão dos pacientes aos tratamentos anti-hipertensivos (PARATI et al., 2021). Diante das considerações apresentadas, é evidente a necessidade da realização de estudos adicionais com o propósito de identificar novas terapias farmacológicas para o tratamento da HAS.

O uso de plantas para o tratamento e prevenção de doenças é uma prática ancestral que acompanha a humanidade há centenas de anos (DAFNI; BÖCK, 2019). Além disso, possui um papel essencial na investigação farmacológica e desenvolvimento de novos medicamentos (BHATTI et al., 2022). Segundo Lima Melro (2019), o crescente número de pesquisas científicas, comprovando a segurança e eficácia de produtos naturais, juntamente com o aumento do interesse por tratamentos menos invasivos, tem contribuído para a crescente adesão da população brasileira a essas terapias.

Os metabólitos secundários são compostos bioativos amplamente encontrados em plantas e têm sido alvo de estudos que, ao longo dos anos, têm validado seus efeitos biológicos. Uma das classes mais prevalentes dentro desse grupo são os terpenos, que são categorizados em subclasses de acordo com o número de unidades de isopreno (C₅) presentes em sua estrutura (BHATTI et al., 2022). Dentro dessa categoria destaca-se os monoterpenos, cujas inúmeras propriedades biológicas são descritas na literatura, com ênfase em seus efeitos sobre o sistema cardiovascular, apresentando efeitos hipotensores, vasorrelaxantes, cardioprotetores, bradicárdicos, antiarrítmicos, entre outros (SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2021a).

Entre os monoterpenos mais estudados, encontramos o isopulegol (ISO), um monoterpeno alcoólico de aroma fresco e mentolado, comumente utilizado na indústria cosmética para a fabricação de perfumes. É encontrado em plantas como a cannabis, capim-limão, sálvia, erva-cidreira e hortelã. Estudos relatam suas atividades antinociceptiva (PROSPERO et al., 2019), anti-inflamatória (GUEDES et al., 2020) e antioxidante (SANKARANARAYANAN; KALAIVANI, 2020). No entanto, os efeitos do ISO sobre o sistema cardiovascular ainda são pouco estudados e não estão completamente elucidados.

Estudos demonstram que os isômeros de ISO possuem propriedades cardioprotetoras em modelo de hipertrofia cardíaca por meio de sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de ter uma possível ação bloqueadora dos canais para cálcio (FILHO, 2019). Essas são propriedades importantes para a manutenção dos parâmetros cardiovasculares, especialmente, da pressão arterial (PA). Diante disso, o ISO é um candidato promissor para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A pressão Arterial

A pressão arterial (PA) é a medida da força exercida pelo sangue contra as paredes das artérias enquanto é bombeado pelo coração e circula pelo corpo (DESAI, 2020). Ela é essencial para garantir que o sangue seja transportado de maneira eficaz para fornecer oxigênio e nutrientes aos tecidos do corpo (CHAUDHRY; MIAO; REHMAN, 2022).

A PA, é expressa por dois valores: a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD). A PAS é a pressão máxima exercida nas artérias durante a contração do músculo cardíaco (sístole). Já a PAD é a pressão mínima presente nas artérias durante o relaxamento do músculo cardíaco (diástole). Além disso, seus níveis são determinados por fatores, como o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT) (SECOMB, 2016; SHAHOUD; SANVICTORES; AEDDULA, 2023).

O DC é determinado pelo volume de sangue bombeado pelo coração por minuto (frequência cardíaca multiplicada pelo volume sistólico). Quanto maior o DC, maior será a PA, pois mais sangue está sendo ejetado para as artérias (KING; LOWERY, 2023). Enquanto a RVPT refere-se à resistência total ao fluxo sanguíneo. Ela é influenciada por vários fatores, incluindo o diâmetro das arteríolas (pequenas artérias), viscosidade do sangue e comprimento total dos vasos sanguíneos. Quanto maior a RVPT, maior será a PA (DELONG; SHARMA, 2023).

Além desses fatores básicos, a PA é regulada por vários mecanismos fisiológicos, com destaque para:

Barorreflexo (curto prazo): É ativado em resposta a mudanças na PA detectadas por receptores especializados chamados barorreceptores. Esses barorreceptores estão localizados em áreas sensíveis às mudanças na PA, como o seio carotídeo nas artérias carótidas e o arco aórtico na aorta. Quando a PA aumenta ou diminui, os barorreceptores são estimulados, enviando sinais nervosos para o centro de controle cardiovascular no tronco cerebral (ARMSTRONG; KERNDT; MOORE, 2023; RIENZO et al., 2009).

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) (longo prazo): Quando a PA cai ou o fluxo sanguíneo para os rins diminui, as células especializadas nos rins, chamadas células justaglomerulares, secretam a renina na corrente sanguínea. A renina converte o angiotensinogênio, produzida pelo fígado, em angiotensina, que é então convertida em angiotensina II, pela enzima conversora de angiotensina (ECA), que é encontrada principalmente nos pulmões. A angiotensina II tem vários efeitos que promovem o aumento da

PA, incluindo: Constrição dos vasos sanguíneos. Estímulo da liberação de aldosterona pelas glândulas suprarrenais. Estímulo da sede e liberação de vasopressina (hormônio antidiurético), aumentando a reabsorção de água pelos rins. A aldosterona é um hormônio que promove a reabsorção de sódio e água pelos rins e aumenta a excreção de potássio na urina que aumenta o volume sanguíneo e, conseqüentemente, a PA (ATLAS, 2007; FOUNTAIN; KAUR; LAPPIN, 2023).

2.2. Hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), conhecida popularmente como pressão alta, é uma condição caracterizada por níveis pressóricos iguais ou superiores a 140 mmHg (PAS) por 90 mmHg (PAD) (Quadro 1). E afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo um importante fator de risco para uma variedade de DCVs, incluindo acidente vascular cerebral (AVC) (LI et al., 2022), doença arterial coronariana (WEBER et al., 2016) e insuficiência cardíaca (KANNAN; JANARDHANAN, 2014).

Quadro 1 - Classificação da Pressão Arterial: Valores que Delimitam as Categorias dos Níveis de Hipotensão, Normais e Hipertensão determinados pelas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (Adaptado de BARROSO et al., 2021).

Categoria de PA	PAS (mmHg)	e/ou	PAD (mmHg)
Ótima	≤ 120	e	< 80
Normal	120-129	e/ou	80-84
Pré-hipertensão	130-139	e/ou	85-89
Hipertensão (Estágio 1)	140-159	e/ou	90-99
Hipertensão (Estágio2)	160-179	e/ou	100-109
Hipertensão (Estágio3)	≥ 180	e/ou	≥ 110

A hipertensão pode ser dividida em duas categorias principais: hipertensão primária (ou essencial) e hipertensão secundária. A hipertensão primária é a forma mais comum de hipertensão e é caracterizada por uma PA elevada sem uma causa clara. É geralmente uma condição crônica que se desenvolve ao longo do tempo e pode estar relacionada a uma combinação de fatores genéticos e ambientais (multifatorial). Por outro lado, a hipertensão secundária é uma forma menos comum de hipertensão que é causada por uma comorbidade ou hábitos subjacentes, como doença renal, distúrbios hormonais, apneia do sono, uso de certos medicamentos ou ingestão excessiva de álcool (HARRISON; COFFMAN; WILCOX, 2021).

O tratamento tradicional da HAS geralmente envolve uma combinação de mudanças no estilo de vida e tratamento farmacológico, como diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA), bloqueadores dos canais para cálcio (BCC), betabloqueadores, entre outros. No entanto, apesar da eficácia desses fármacos, a HAS continua a ser um fator de risco significativo e um dos principais contribuintes para morbidade e mortalidade global. Anualmente, cerca de 10,8 milhões de mortes evitáveis em todo o mundo são atribuídas à HAS, o que demonstra a necessidade de abordagens mais eficazes e inovadoras para o tratamento e controle dessa condição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

2.3. Sistema Nervoso Autônomo

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) é um componente do sistema nervoso periférico que regula funções involuntárias do corpo, como o controle da frequência cardíaca, respiração, digestão, pressão arterial e outras funções automáticas que garantem a sobrevivência do organismo. Ele atua constantemente, sem a necessidade de intervenção consciente, e responde a mudanças ambientais e internas para manter a homeostase. Além disso, subdivide-se em sistema nervoso simpático (SNS), parassimpático (SNP) e entérico (SNE) (WAXENBAUM; REDDY; VARACALLO, 2023).

O SNS é frequentemente chamado de "sistema de luta ou fuga" porque é ativado em situações de estresse, emergência ou excitação. Ele aumenta a frequência cardíaca, dilata os brônquios, contrai os vasos sanguíneos e libera glicose no sangue para fornecer energia rápida para o corpo (ALSHAK; DAS, 2023). Por outro lado, o SNP é conhecido como o "sistema de descanso e digestão", pois é ativado em momentos de calma e relaxamento. Ele diminui a frequência cardíaca, promove a digestão e absorção dos alimentos, e estimula atividades metabólicas de longo prazo, como o armazenamento de energia (TINDLE; TADI, 2022).

As vias autonômicas são responsáveis por fazerem com que a transmissão de informações do sistema nervoso central (SNC) chegue até os órgãos efetores. Essas vias são constituídas pelos neurônios pré e pós-ganglionares. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos secretam acetilcolina (ACh) que se liga em receptores colinérgicos nicotínicos nas células pós-ganglionares. Já os pós-ganglionares simpáticos em sua maioria secretam noradrenalina (NA) para os receptores adrenérgicos, enquanto os pós-ganglionares parassimpáticos secretam ACh que se liga em receptores muscarínicos (figura 1) (SILVERTHORN, 2017).

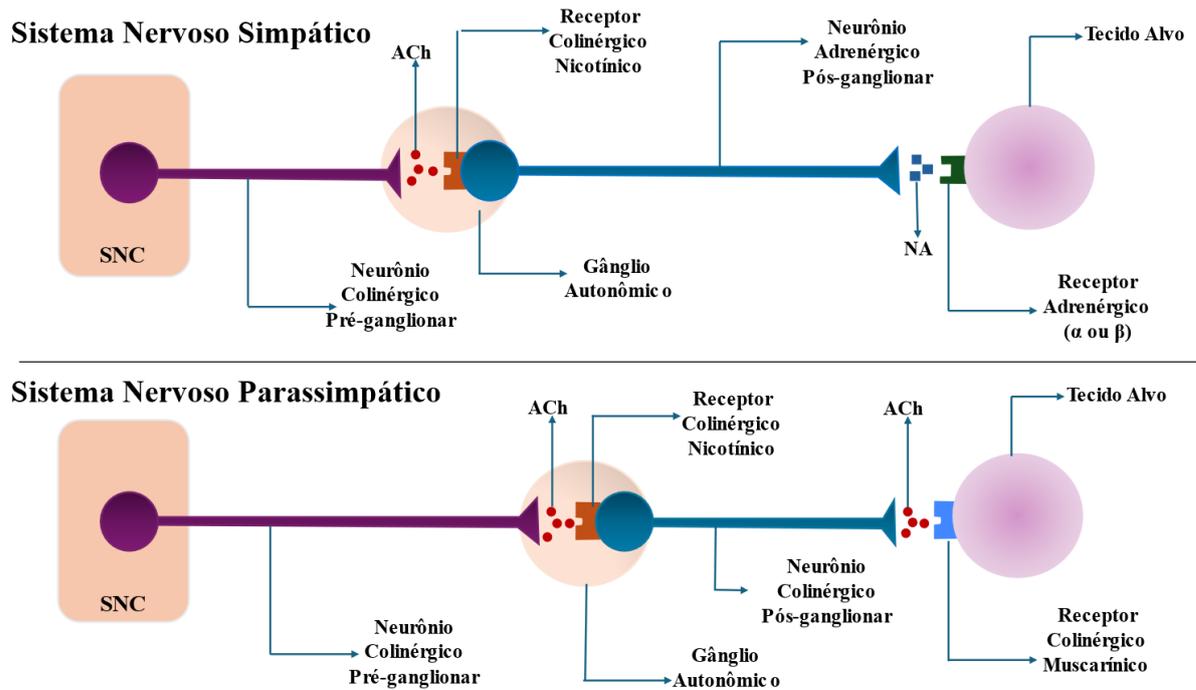


Figura 1 - Organização do sistema nervoso simpático e parassimpático. ACh: acetilcolina; NA: Noradrenalina. (Adaptado de SILVERTHORN, 2010).

2.4. Receptores Colinérgicos:

O termo "colinérgico" refere-se aos receptores que respondem ao neurotransmissor acetilcolina. Existem dois tipos principais de receptores colinérgicos, classificados com base na sua resposta a diferentes substâncias: os receptores nicotínicos (nAChRs) e os receptores muscarínicos (mAChRs), que são estimulados pelas drogas nicotina e muscarina, respectivamente (TIWARI et al., 2013).

Os mAChRs são uma classe de receptores metabotrópicos de proteínas G (GPCRs), compostos por 7 subunidades (Figura 2), que, quando ativados, desencadeiam uma cascata de reações intracelulares. Existem cinco subtipos de mAChRs, nomeadamente M1, M2, M3, M4 e M5, cada um expresso em diferentes regiões do corpo e desempenhando funções fisiológicas distintas (WESS, 1993) (Quadro 2).

Quadro 2 - Subtipos de Receptores Muscarínicos: Localização e Funcionalidade. (Adaptado de BROADLEY; KELLY, 2001).

Subtipo	Localização	Funcionalidade
M1	Gânglio autônomo; Cérebro (córtex cerebral).	Despolarização lenta Controle motor Memória e atenção Regulação do ciclo sono-vigília
M2	Nó sinoatrial	Redução da frequência (cronotropia negativa)
M3	Músculo liso do intestino; Músculo liso vascular Endotélio; Músculo liso glandular; Glândulas salivares;	Contração Contração Liberação de NO e vasodilatação Contração Salivação
M4	Útero de Cobaia; SNC	Contração Funções pouco claras
M5	Regiões Cerebrais	Funções pouco claras

Os nAChRs são uma classe de receptores ionotrópicos compostos por 5 subunidades, (Figura 2). Esses receptores podem ser classificados em dois tipos principais: Os nAChR musculares (nAChR-m) localizados principalmente no músculo esquelético na junção neuromuscular. E os nAChR neurais (nAChR-n), que são encontrados nos corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares nos SNP e SNS (CARLSON; KRAUS, 2023; TALY et al., 2009).

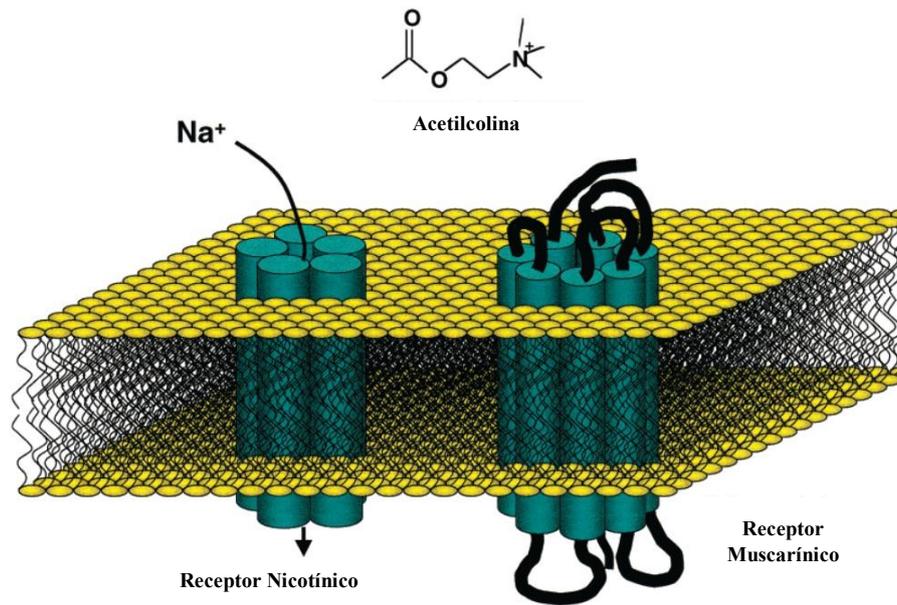


Figura 2 - Representação das estruturas dos receptores nicotínicos e muscarínicos. (Adaptado de FELDER et al., 2000).

2.5. Receptores Adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos são uma classe de receptores de proteínas encontrados em células-alvo que são ativadas pela epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina) no SNS (Figura 1). Além disso, podem ser divididos em dois tipos principais, alfa (α) e beta (β), que por sua vez são subdivididos em várias subcategorias (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , etc.). Cada subtipo tem uma distribuição específica nos tecidos e órgãos do corpo, e desempenha papéis fisiológicos distintos (Quadro 3). (SMALL; MCGRAW; LIGGETT, 2003)

Quadro 3 - Subtipos de Receptores Adrenérgicos: Localização e Funcionalidade. (Adaptado de MASUO, 2010)

Subtipo	Localização	Funcionalidade
α_1	Músculo cardíaco	Efeito inotrópico positivo
	Vasos sanguíneos periféricos	Contração da musculatura lisa vascular
	Musculatura lisa do trato urinário	Contração
α_2	Pâncreas e gastrointestinal	Inibição da secreção de insulina, indução da liberação de glucagon e contração dos esfíncteres
β_1	Coração	Efeitos cronotrópicos e inotrópico positivo
	Rins	Liberação de renina

$\beta 2$	Pulmões	Broncodilatação
	Músculo liso vascular	Vasodilatação
	Útero	Relaxamento da musculatura lisa uterina
	Fígado	Aumento da glicogenólise hepática e secreção de insulina
$\beta 3$	Tecido adiposo	Estímulo da lipólise

2.6. Mecanismos de Contração do Músculo Liso

A contração do músculo liso é dependente de Ca^{2+} e geralmente é desencadeada por despolarização ou pela ativação de hormônios ou neurotransmissores como a ACh ou epinefrina. Quando o estímulo inicial é recebido, ele causa um aumento na concentração de cálcio intracelular. O Ca^{2+} é um íon chave no processo de contração muscular, pois se liga a uma proteína chamada calmodulina, formando um complexo cálcio-calmodulina (CaM). O CaM ativa uma enzima chamada miosina-quinase. Esta enzima fosforila a miosina, uma proteína contrátil presente nas células musculares, promovendo sua ativação. A miosina ativada se liga à actina, outra proteína contrátil, e forma um complexo de miosina-actina. Isso leva à contração do músculo, à medida que as cabeças de miosina giram, puxando a actina em direção ao centro da célula muscular (HAFEN; BURNS, 2023).

Após a contração do músculo liso, a concentração de cálcio intracelular é reduzida por meio de bombas de cálcio na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático. A miosina que foi fosforilada durante a contração é desfosforilada pela ação de uma enzima chamada miosina fosfatase que inativa a miosina e ocorre o relaxamento muscular. A actina e a miosina voltam ao seu estado inativo e o músculo se relaxa (GASH et al., 2023) (Figura 3).

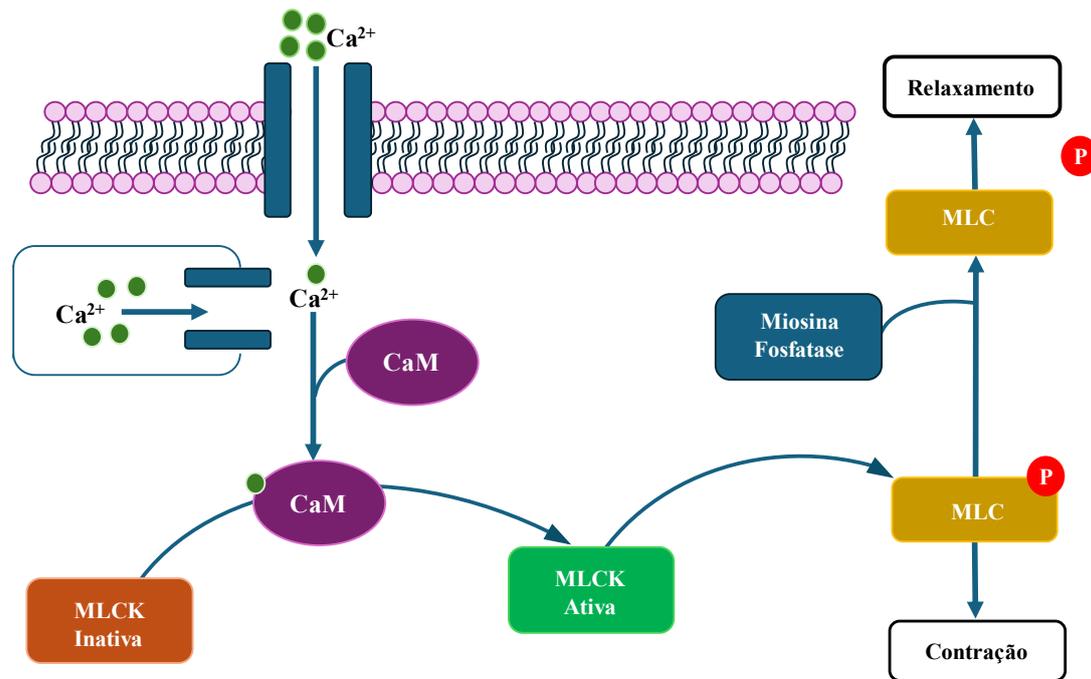


Figura 3 - Representação do Mecanismo de Contração na Célula Muscular Lisa (Adaptado de GUYTON e HALL, 2017). Ca^{2+} - íon cálcio: elemento chave no processo de contração muscular, ligando-se à calmodulina para ativar a miosina-quinase. CaM – calmodulina: proteína que, ao se ligar ao cálcio, ativa a miosina-quinase. MLCK - Miosina Quinase de Cadeia Leve: enzima que fosforila a miosina, permitindo a sua interação com a actina. P - Fosfato - grupo químico adicionado à miosina pela MLCK, essencial para a ativação da miosina. MLC – Miosina de cadeia leve: proteína que, quando fosforilada pela MLCK, permite a interação da miosina com a actina, levando à contração muscular.

2.7. Participação do Endotélio no Vasorrelaxamento

As artérias consistem em três camadas distintas: a camada adventícia, a camada média e a camada íntima, esta última dividida em lâmina elástica interna, lâmina basal e endotélio (Figura 4). Por muito tempo, o endotélio foi considerado um tecido exclusivamente destinado ao revestimento do sistema vascular (MONCADA, 2018). No entanto, no estudo desenvolvido por Furchgott & Zawadzki (1980), foi observado que o relaxamento promovido pela acetilcolina em anéis aórticos de coelho era dependente da presença de endotélio vascular e mediado por uma substância que mais tarde seria conhecida como óxido nítrico (NO), (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA; HIGGS, 2006). Atualmente, sabe-se que as células endoteliais não apenas compõem a camada de revestimento mais íntima dos vasos, mas também desempenham um papel crucial em processos como a angiogênese, coagulação, agregação plaquetária e regulação do tônus vascular, sendo essenciais para a regulação da homeostase vascular (DE MELO GHISI et al., 2010).

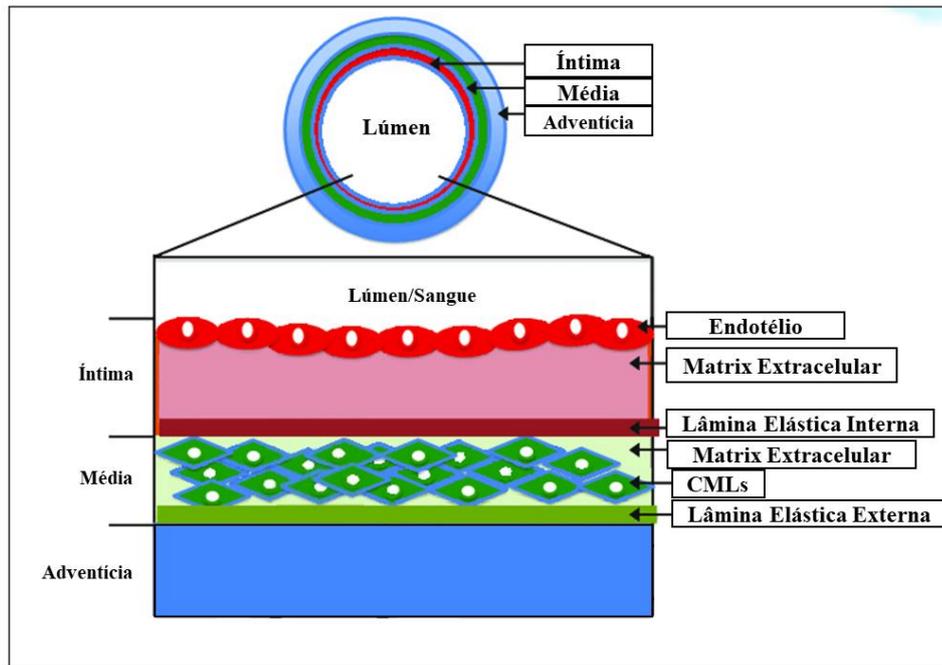


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura das artérias. (Adaptado de KLOC; GHOBRIAL, 2014).

A camada endotelial tem a capacidade de sintetizar e liberar várias substâncias que influenciam diretamente a musculatura lisa vascular, incluindo o NO, os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) e as prostaciclina (PGI_2), que promovem o relaxamento do músculo liso (GALLEY; WEBSTER, 2004).

2.8. Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma molécula gasosa e atua como um importante mensageiro molecular que desempenha diversos processos fisiológicos, como vasodilatação, respostas imunes, apoptose, reprodução, neurotransmissão, entre outros. A principal fonte de NO no corpo é a sua produção por via endotelial. Esse processo envolve a óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (ANDRABI et al., 2023). Existem três subtipos de NOS: NOS neuronal (nNOS), encontrada em neurônios específicos do SNC e SNP. NOS induzível (iNOS), expressa em células do sistema imunológico. E NOS endotelial (eNOS) encontrada no endotélio (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A produção de NO pela enzima eNOS pode ser desencadeada por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (NOSAREV et al., 2014), ou químicos, como a ativação por agonistas vasodilatadores. Na principal via, a ligação de um mensageiro ao receptor endotelial ativa a proteína Gq, levando à ativação subsequente da fosfolipase C- β (PLC- β). A PLC- β então catalisa a hidrólise do fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 liberado ativa os receptores de IP_3 no retículo

sarcoplasmático, resultando na liberação de Ca^{2+} para o citosol. O Ca^{2+} liberado se liga à calmodulina, formando o CaM. Esse complexo ativa a eNOS, promovendo a conversão de arginina em NO e citrulina. O NO produzido difunde-se para as células musculares lisas adjacentes. Lá, ele interage com a guanilato ciclase (GC), ativando-a. A GC converte o guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). O cGMP, por sua vez, ativa a proteína quinase G (PKG), que fecha os canais para Ca^{2+} , resultando na diminuição da concentração de cálcio intracelular. Além disso, a PKG inibe a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), promovendo a desfosforilação da cadeia leve de miosina e, conseqüentemente, o relaxamento da musculatura lisa vascular (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015) (Figura 5).

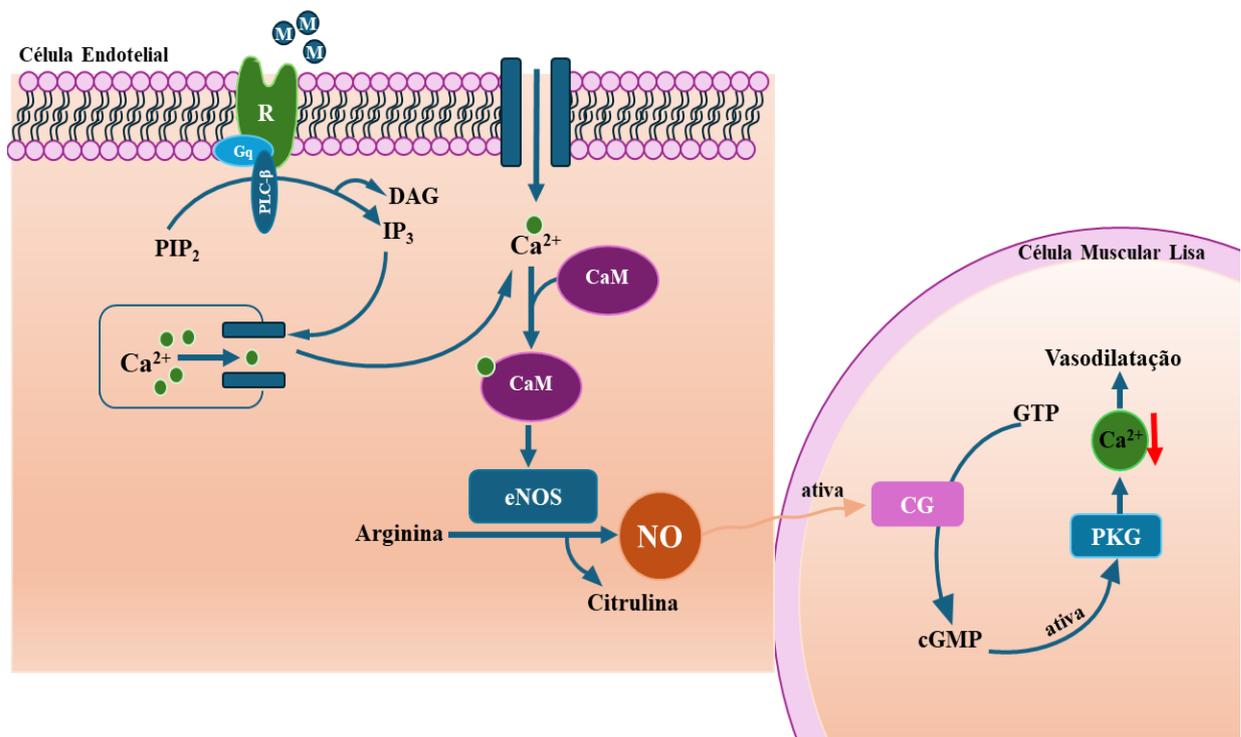


Figura 5 - Representação do Mecanismo de Produção de NO. (Adaptado de DESPOPOLOUS, 2003). **M** – Mensageiro. **R** - Receptor. **Gq** – Proteína Gq: proteína que, quando ativada por um receptor, estimula PLC-β para desencadear a sinalização intracelular através da produção de IP₃ e DAG. **PLC-β** - Fosfolipase C-β: enzima que catalisa a hidrólise de PIP₂ em IP₃ e DAG. **PIP₂**: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato - fosfolípido de membrana que é hidrolisado pela PLC-β para formar IP₃ e DAG. **DAG**: Diacilglicerol - molécula que, junto com IP₃, é produzida a partir da hidrólise de PIP₂ pela PLC-β. **IP₃**: Inositol 1,4,5-trifosfato - molécula que ativa os receptores de IP₃ no retículo sarcoplasmático, resultando na liberação de Ca²⁺ para o citosol. **Ca²⁺**: Cálcio - íon chave no processo de sinalização celular. **CaM**: Calmodulina - proteína que se liga ao Ca²⁺, formando um complexo que ativa a eNOS. **eNOS**: Óxido Nítrico Sintase Endotelial - subtipo de NOS encontrado no endotélio que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. **NO** – Óxido nítrico: mensageiro molecular que ativa a GC. **GC**: Guanilato Ciclase - enzima que converte o GTP em cGMP. **cGMP**: Monofosfato de Guanosina Cíclico - molécula que ativa a PKG. **PKG**: Proteína Quinase G - enzima que fecha os canais para Ca²⁺ e inibe a MLCK, resultando na desfosforilação da cadeia leve de miosina e no relaxamento da musculatura lisa vascular.

2.9. Disfunção Endotelial e Hipertensão

A disfunção endotelial, por sua vez, pode ser definida como um conjunto de alterações fisiológicas que afetam o endotélio, resultando em um desequilíbrio na liberação dos mediadores que regulam o tônus vascular e outras funções do endotélio (DE CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006). Doenças cardiovasculares, especialmente a hipertensão, estão diretamente ligadas a essa disfunção, juntamente com fatores associados ao estilo de vida, ao tabagismo e sedentarismo. É interessante notar que essa disfunção, ao invés de ser somente causada por uma complicação cardiovascular, muitas vezes a precede e pode contribuir para o desenvolvimento de DCVs (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

No caso da HAS, a disfunção endotelial pode levar à redução da vasodilatação, o que pode estar relacionado ao aumento da liberação de fatores contráteis derivados do endotélio, como a prostaglandina H₂ (PGH₂) e a angiotensina II (Ang II). Além disso, outros fatores que podem contribuir incluem a diminuição da responsividade das células musculares lisas ao NO, a diminuição da expressão da atividade da guanilil ciclase solúvel e a liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (CARVALHO et al., 2001).

2.10. Plantas Mediciniais e Metabólitos Secundários

De acordo com Petrovska, (2012) a cura com plantas medicinais é uma prática tão antiga quanto a própria humanidade. Desde os primórdios das civilizações, os seres humanos têm utilizado plantas para tratar diversas doenças e promover a saúde. Este conhecimento foi transmitido de geração em geração, formando a base das práticas de medicina tradicional que ainda são amplamente utilizadas em muitas partes do mundo. A base científica para o uso de plantas medicinais na medicina tradicional são os efeitos biológicos promovidos pelos metabólitos secundários (HUSSEIN et al., 2018).

Os metabólitos secundários são produzidos por uma grande diversidade de plantas. Além de serem amplamente utilizados pela indústria cosmética e de produtos de saúde, é apontado como uma das principais fontes associadas a essas propriedades biológicas advindas das plantas. Dentre os principais grupos de metabólitos secundários estão os polifenóis, alcaloides e os terpenos que possuem na literatura uma ampla quantidade de estudos que caracterizam suas propriedades biológicas (ZHANG et al., 2021).

Os terpenos são os metabólitos secundários mais abundantes em óleos essenciais de plantas (SOMMANO et al., 2020). E são classificados de acordo com a sua unidade estrutural que é composta por unidades constituídas por cinco átomos de carbono (5C), denominadas de

unidades de isopreno. Essas categorias de terpenos se subdividem da seguinte forma: hemiterpenos (5C) formados por uma única unidade isoprenóide, mono (10 C), sesqui (C15), di (C20), seste (C25), tri (C30), tetra (C40) e os politerpenos que são os terpenos formados por mais de 40 unidades de isopreno (TETALI, 2019).

2.11. Monoterpenos

Os monoterpenos constituem a maior, mais diversa e mais estudada classe dos terpenos. E seus derivados podem subdividir-se em acíclicos (linalool, nerol, e citronelol), cíclicos (timol, limoneno e (-)-mentol) e bicíclico (mirtenol, α -pineno e (-)-borneol). Ademais, possuem diversas ações bioativas descritas na literatura, dentre as quais, destaca-se, as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, neuroprotetoras, entre outros (ZIELIŃSKA-BŁAJET; FEDER-KUBIS, 2020).

Além das propriedades supracitadas, os monoterpenos possuem uma vasta descrição de suas propriedades terapêuticas sobre o sistema cardiovascular. Costa (2021) verificou em seu estudo que o uso oral e diário de carvacrol (20 mg/kg) por si só tem ação hipotensora sobre a pressão de ratos espontaneamente hipertensos e ainda evidenciou que o esse efeito pode ser potencializado se associado ao treinamento físico aeróbio. Marinho (2022) descreveu a ação antiarrítmica do D-limoneno complexado em hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelo animal de arritmia induzida por Bay K 8644 e atestou que esse monoterpeno é capaz de reduzir arritmias e prevenir a taquicardia.

Silva (2021) demonstrou as atividades biológicas de 16 diferentes monoterpenos sobre doenças cardiovasculares e foram verificadas ações sobre a hipertensão, infarto do miocárdio, hipertensão pulmonar, hipertrofia cardíaca e arritmia. Sugerindo que os monoterpenos são compostos promissores para o desenvolvimento de terapias farmacológicas para o tratamento e prevenção de doenças e complicações cardíacas. Além disso, Santos (2011) também descreveu em seu trabalho diferentes tipos de monoterpenos e suas respectivas propriedades biológicas sobre o sistema cardiovascular, dentre as quais é possível destacar os efeitos hipotensor, vasorelaxante, antiarrítmico e cardioprotetor.

2.12. Isopulegol (ISO)

Dentre os monoterpenos encontramos o isopulegol, um monoterpeno monocíclico (Figura 6) com peso molecular 154,25g /mol (ANDRADE PRÓSPERO et al., 2018). Que ocorre majoritariamente em *Salvia* (*Salvia* sp.) (ÜRGEOVÁ et al., 2023) e é encontrado em outras plantas como hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) (BULEANDRA et al., 2016), menta

(*Mentha pulegium*) (MONTENEGRO et al., 2020), cannabis (*Cannabis sativa* L.) (CHACON et al., 2022), erva-doce (*Foeniculum vulgare*) (SHAROPOV et al., 2017), eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (GHAFAR et al., 2015), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (HAQUE; REMADEVI; NAEBE, 2018), erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) (BOUNIHI et al., 2013), entre outras (SANKARANARAYANAN C; KALAIVANI K, 2021).

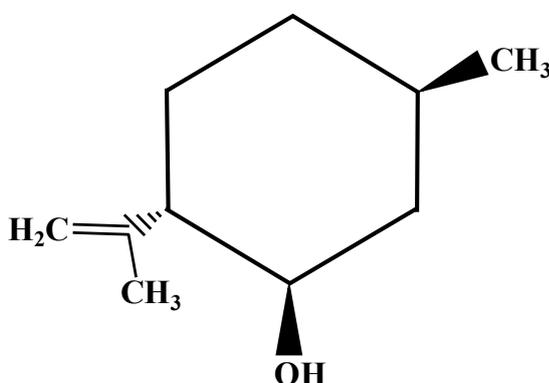


Figura 6 -Estrutura química do (-)-isopulegol. (Adaptado de FILHO, 2019).

Ademais, é frequentemente utilizado como uma matéria-prima para a síntese de outros compostos orgânicos, incluindo perfumes e produtos de higiene pessoal, bem como sabores alimentares e fragrâncias (BHATIA et al., 2008). Por exemplo, é empregado como intermediário sintético na produção de mentol, que é amplamente utilizado em produtos para alívio de dores musculares e como aromatizante em produtos de cuidados pessoais e na indústria alimentícia (DYLONG et al., 2022). Além da sua relevância para a área industrial, o ISO apresenta diversas evidências de potencial terapêutico descritas na literatura (Quadro 4).

Quadro 4 - Estudos com Isopulegol: Modelos Animais, Atividade Biológica e Doses Utilizadas

Referência	Animal/modelo	Atividade Biológica	Dose/via
(RAMOS et al., 2020)	Camundongo/Inflamação	antiedematogênica e anti-inflamatória	1, 5, 10 mg/kg/v.o.
(KANG et al., 2021)	Camundongo/Parkinson	Neuroproteção	-
(SILVA et al., 2009b)	Camundongo/Epilepsia	Anticonvulsivante, neuroprotetor, antioxidante	100 e 200 mg/kg/i.p.

(SILVA et al., 2009a)	Camundongo/Lesão gástrica	Gastroprotetor	25, 50, 100 e 200 mg/kg/v.o.
(SANKARANARAYANA N; KALAIVANI, 2020)	Rato/Diabetes	Antioxidante	100 e 200 mg/kg/v.o.
(KALAIVANI; SANKARANARAYANA N, 2021)	Rato/Diabetes	Insulinotrófico	50, 100, 200 mg/kg/v.o.
(ANDRADE PRÓSPERO et al., 2018)	Camundongo/ Nocicepção e Inflamação	Antinociceptiva	0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 and 25 mg/kg/v.o.
(SILVA et al., 2007)	Camundongo/Ações do Sistema Nervoso Central	Depressor e Ansiolítico	25 e 50 mg/kg/i.p.

No entanto, o potencial do ISO sobre o sistema cardiovascular ainda é pouco explorado. Em seu trabalho, Filho (2019) demonstrou que os isômeros do ISO foram capazes de agir como bloqueadores dos canais para cálcio tipo L e de atenuarem a hipertrófica cardíaca quando administrados em ratos por 7 dias na dose 50 mg/kg/dia/i.p. Promovendo a redução do estresse oxidativo, de mediadores inflamatórios, da corrente de cálcio tipo-L e transiente intracelular do cálcio em cardiomiócitos isolados.

Essas propriedades terapêuticas apresentadas pelo ISO são fundamentais no tratamento de DCVs, especialmente, da HAS. Esta condição, pode ser exacerbada pela presença de radicais livres e inflamação, que podem levar à disfunção endotelial e conseqüentemente resultar na perda da produção de fatores relaxantes endoteliais, incluindo o NO, que normalmente ajudam a manter a vasodilatação e a pressão arterial em níveis normais. A redução da vasodilatação e a elevação da resistência vascular periférica são determinantes para hipertensão arterial (NASRI; BARADARAN; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; ZHANG et al., 2022).

A capacidade do ISO de bloquear os canais de cálcio é outra característica importante. O Ca^{2+} é um íon essencial para a contração muscular, incluindo a dos vasos sanguíneos. Ao

inibir os canais para Ca^{2+} , o ISO, especialmente o seu isômero (-), pode promover a vasodilatação e ajudar a reduzir a resistência vascular periférica e, portanto, a pressão arterial.

3. OBJETIVOS:

3.1. Geral:

Avaliar os efeitos cardiovasculares do (-)-isopulegol em animais normotensos e hipertensos.

3.2. Específicos:

In vivo:

Caracterizar:

- Os efeitos da administração intravenosa aguda (i.v.) do (-)-ISO puro na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos;
- Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do (-)-ISO na PAM e na FC em ratos normotensos: participação muscarínica, nicotínica, óxido nítrico e ciclooxigenase;
- Os efeitos da administração oral subaguda (v.o.) de (-)-ISO puro na PAM e na FC em ratos hipertensos.

In vitro:

Avaliar:

- Os efeitos do (-)-ISO na reatividade vascular da artéria mesentérica superior de ratos normotensos;
- Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do (-)-ISO sobre a reatividade vascular de ratos normotensos: papel do endotélio, participação dos canais para cálcio de membrana e intracelular, participação dos canais para potássio e envolvimento da maquinaria contrátil.

In silico:

- Avaliar a interação molecular com os receptores nicotínicos e canais para cálcio tipo L.

4. METODOLOGIA:

4.1. Animais:

Foram utilizados 76 ratos da linhagem *Wistar* (espécie: *Rattus norvegicus*) (Figura 7), sendo 36 para os protocolos intravenosos (CEUA: 2521170223), 18 para os protocolos orais (CEUA: 9546170223) e 22 para os protocolos in vitro (CEUA: 1239150223), com intervalo de peso compreendido entre 250-300g. Esses animais foram adquiridos por intermédio do biotério setorial localizado no Departamento de Fisiologia (DFS) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), foram alojados no biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFAC) (regulamentado no CIUCA/CONCEA) em gaiolas de polipropileno (258 cm² x 17,8 cm) e subdivididos em grupos de no máximo 5 animais por gaiola. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições ambientais, incluindo temperatura (23 + 2°C), umidade, ruído, ciclo claro-escuro de 12 horas (06:00-18:00 horas) e tiveram acesso contínuo a ração comercial (Nuvilab; Quimtia) e água filtrada ao longo de todo o período experimental.

Os protocolos experimentais foram iniciados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFS (CEUA/UFS) e respeitaram todos os critérios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).
Certificados em Anexo



Figura 7 - Ratos Wistar. Fonte: Autor

4.2. Ferramentas Farmacológicas:

O quadro 5 detalha as principais ferramentas farmacológicas utilizadas para a avaliação dos mecanismos de ação subjacentes às respostas cardiovasculares induzidas pelo (-)-ISO.

Quadro 5 – Ferramentas Farmacológicas Utilizadas no Estudo: Peso Molecular e Mecanismo de Ação

Ferramentas Farmacológicas	Peso Molecular (g/mol)	Mecanismo de Ação	Referência
L-NAME (N ^o -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride)	269,69	Inibidor da síntese de NO	(PFEIFFER et al., 1996)
Sulfato de Atropina	694,83	Antagonista competitivo não seletivo dos receptores muscarínicos	(BOLTON, 1977)
Cloreto de Hexametônio	273,29	Antagonista dos receptores nicotínicos e bloqueador ganglionar	(FORD, 1962)
Indometacina	357,79	Inibidor da ciclooxigenase (COX)	(MITCHELL et al., 1993)
Cloreto de Acetilcolina	181,66	Agonista dos receptores colinérgicos	(BYLUND, 2007)
Cloridrato de L(-)Fenilefrina	203,70	Agonista α 1-adrenérgico	(DEFILY; NISHIKAWA; CHILIAN, 1999)
Tetraetilamônio	165,7	Bloqueador dos canais para K ⁺	(LENAEUS et al., 2005)
Ortovanadato de Sódio	183,91	Inibidor da miosina fosfatase	(YAYAMA et al., 2014)

(S)-(-)-Bay-K8644	356,30	Agonista do canal para Ca ²⁺ sensível à voltagem	(SAITO et al., 1986)
--------------------------	--------	-------------------------------------------------------------	----------------------

4.3. Soluções nutritivas:

As Tabelas 1 a 6 apresentam as composições das diferentes soluções nutritivas utilizadas nos experimentos. No preparo das soluções de Tyrode com 20, 60 ou 80 mM de KCl, a concentração de NaCl foi ajustada para garantir que todas as soluções fossem isotônicas e que as células estudadas estivessem expostas a condições osmoticamente equilibradas. Essa condição é fundamental para manter a integridade e a função celular durante os experimentos.

Tabela 1 - Substâncias presentes na solução nutritiva de Tyrode, com suas concentrações correspondentes

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	158,3
KCl	74,55	4,0
CaCl ₂	203,3	2,0
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42
Glicose	180,15	5,6

Fonte: (TANAKA et al., 1999)

Tabela 2 - Substâncias presentes na solução nutritiva de Tyrode nominalmente sem Cálcio, com suas concentrações correspondentes

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	158,3
KCl	74,55	4,0
CaCl ₂	-	-
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42
Glicose	180,15	5,6

Tabela 3 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM com suas concentrações correspondentes

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	82,3
KCl	74,55	80,0
CaCl ₂	203,3	2,0
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42
Glicose	180,15	5,6

Tabela 4 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM com suas concentrações correspondentes

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	102,3
KCl	74,55	60,0
CaCl ₂	203,3	2,0
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42
Glicose	180,15	5,6

Tabela 5 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem cálcio com suas concentrações correspondentes

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	102,3
KCl	74,55	60,0
CaCl ₂	-	-
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42

Glicose	180,15	5,6
---------	--------	-----

Tabela 6 - Substâncias presentes na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM com suas concentrações correspondentes.

Substância	Peso Molecular (g/mol)	Concentração (mM)
NaCl	58,44	102,3
KCl	74,55	20,0
CaCl ₂	203,3	2,0
MgCl ₂	147,01	1,05
NaHCO ₃	84,00	10,0
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,42
Glicose	180,15	5,6

4.4. Categorização dos grupos experimentais:

4.4.1. Tratamento Agudo (i.v.):

Os animais normotensos submetidos ao tratamento agudo foram subdivididos em 6 grupos:

- I. (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n = 6);
- II. Salina- NaCl 0,9% + Tween 80 (0,2%) (n = 6);
- III. Atropina (2 mg/kg) + (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n = 6);
- IV. Hexametônio (20 mg/kg) + (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n = 6);
- V. L-NAME (20 mg/kg) + (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n = 6);
- VI. Indometacina (5 mg/kg) + (-)-ISO (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n = 6).

4.4.2. Tratamento Subagudo (v.o.):

Os animais hipertensos foram subdivididos em 3 grupos para avaliação do efeito do tratamento oral:

- I. (-)-ISO puro (200 mg/kg) (n = 6);
- VII. Controle (Salina- NaCl 0,9% + Tween 80 (0,2%) (n = 6);
- II. Nifedipina (NIF) (10 mg/kg) (n = 6).

4.4.3. *In vitro*:

Para avaliação do efeito do (-)-ISO sobre a reatividade vascular, os animais foram subdivididos em 10 grupos:

- I. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}), com endotélio (E^+) ($n = 6$);
- II. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}), sem endotélio (E^-) ($n = 6$);
- III. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}) + KCl 20 mM, sem endotélio (E^-) ($n = 6$);
- IV. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}) + TEA 1 mM, sem endotélio (E^-) ($n = 6$);
- V. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}) + KCl 80 mM, sem endotélio (E^-) ($n = 6$);
- VI. (-)-ISO (10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2}) + $CaCl_2$ (10^{-6} - 10^{-3} M), sem endotélio (E^-) ($n = 18$);
- VII. (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2}) + Bay-K, sem endotélio (E^-) ($n = 5$);
- VIII. (-)-ISO (10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2}) + FEN $1 \mu M$, sem endotélio (E^-) ($n = 5$);
- IX. (-)-ISO (10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2}) + Na_3VO_4 (10^{-5} - 10^{-2}) sem endotélio (E^-) ($n = 18$).

4.5. Procedimentos Experimentais “in vivo”:

4.5.1. *Indução da hipertensão*:

Para a indução da hipertensão os animais foram tratados via gavagem com L-N^o-Nitro arginine methyl ester (L-NAME/20 mg/kg) ou solução veículo (salina – NaCl 0,9% + Tween 80 – 0,2%), uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos. No último dia de indução, os animais dos respectivos grupos passaram pelo procedimento cirúrgico de cateterização da artéria e veia femorais (Figura 8). A indução da hipertensão com L-NAME já é bem estabelecida na literatura, e o mecanismo de ação envolvido nesse processo é o bloqueio da síntese de óxido nítrico (NO) nas artérias de grande e pequeno diâmetro (PAULIS et al., 2008).

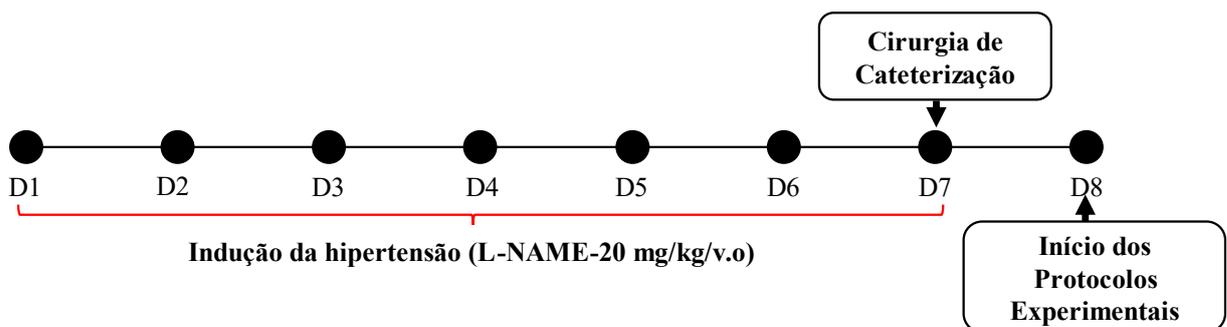


Figura 8 - Esquema do delineamento experimental para indução da hipertensão e cirurgia de cateterização. D-dia.

4.5.2. Cirurgia de cateterização:

Os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (80 mg/kg, i.p) e xilazina (10 mg/kg, i p). Antes do início do procedimento cirúrgico foram verificados a ausência de movimentação corporal, resposta ao pinçamento plantar da pata traseira e reflexo palpebral do animal para garantir a efetividade do estado anestésico. Após isso, procedeu-se à incisão na região inguinal esquerda, seguida pela dissecação da veia e artéria femorais. Em seguida, foi realizado o implante de um cateter de polietileno (PE) constituído por um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) com uma das extremidades fundida a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (9:1, v/v), nos vasos correspondentes. Os cateteres venosos somente foram implantados para a administração do (-)-ISO no modelo de tratamento agudo (via intravenosa) (Figura 9).

Após a inserção dos cateteres nos vasos, estes foram tunelizados subcutaneamente ao longo do dorso do animal e exteriorizados na região cervical. As incisões foram suturadas. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam analgésico (Dipirona; 80 mg/kg i.m.) e foram acomodados individualmente para o período de pós-operatório de 24 horas.

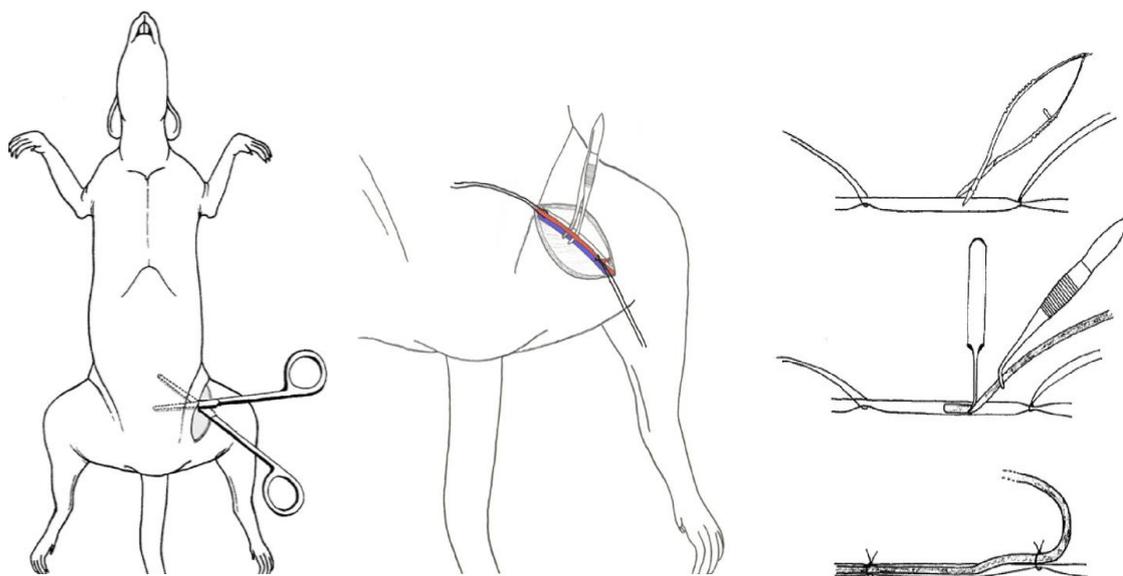


Figura 9 - Representação Esquemática da Cirurgia de cateterização da artéria e veia femoral (Adaptado de JESPERSEN; KNUPP; NORTHCOTT, 2012)

4.5.3. Avaliação hemodinâmica:

Após o período de recuperação, os animais que apresentaram mobilidade espontânea foram submetidos a um período de aclimação de 30 minutos na sala de avaliação hemodinâmica, com o intuito de estabilizar os parâmetros cardiovasculares. Posteriormente, o

cateter foi conectado ao transdutor de pressão (Edwards Lifescience, Irvine, CA, EUA) pré-calibrado e acoplado a um amplificador (Bridge Amp FE221, ADInstruments). Após a estabilização do registro, doses randomizadas do (-)-ISO foram administradas via intravenosa em bolus (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.). Foram respeitados os intervalos de tempo suficientes para o retorno dos parâmetros basais entre cada administração. A PA foi registrada por meio de um microcomputador com interface analógico-digital. O sinal de PA foi registrado e processado pelo software computacional LabChart Pro versão 7 (ADInstruments, USA) pontos de inflexão foram identificados e geradas séries temporais, batimento a batimento, utilizando frequência de amostragem de 2000 Hz. Valores de PAM (mmHg), sistólica (mmHg), diastólica (mmHg), e frequência cardíaca (FC) (bpm) foram obtidos e mensurados. Os valores da PAM e FC foram computados antes da administração (valores basais) e imediatamente após a administração do (-)-ISO e das ferramentas farmacológicas (Figura 10).

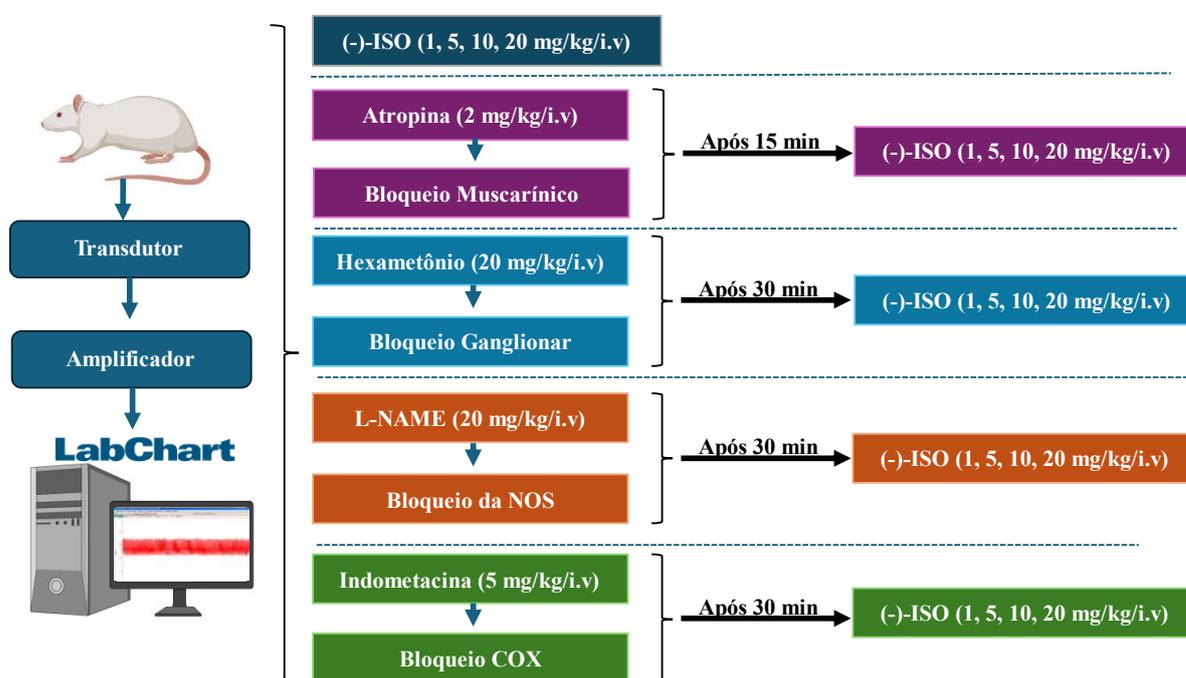


Figura 10 - Representação Esquemática do Protocolo *In vivo* Intravenoso. NOS- óxido nítrico sintase, COX- ciclo-oxigenase. (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6. Procedimentos Experimentais “*in vitro*”:

4.6.1. Preparo da artéria mesentérica:

Os animais foram anestesiados com isoflurano (3%), um anestésico inalatório, e posteriormente foram eutanasiados por dessangramento. Após essa etapa, foi realizada uma incisão abdominal para a remoção e dissecação da artéria mesentérica superior visando a completa remoção de tecido conjuntivo e adiposo. Após a limpeza, a artéria foi seccionada em

anéis de aproximadamente 1 a 2 mm. Estes anéis foram montados no sistema de banho de órgãos, mantidos sob uma tensão de repouso de 0,75 g por 60 minutos (60'), imersos em 10 mL de solução nutritiva de Tyrode (pH 7,4 a 37 °C) e gaseados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) (Figura 11). A troca da solução nutritiva foi realizada a cada 15 minutos para evitar a interferência de metabólitos.

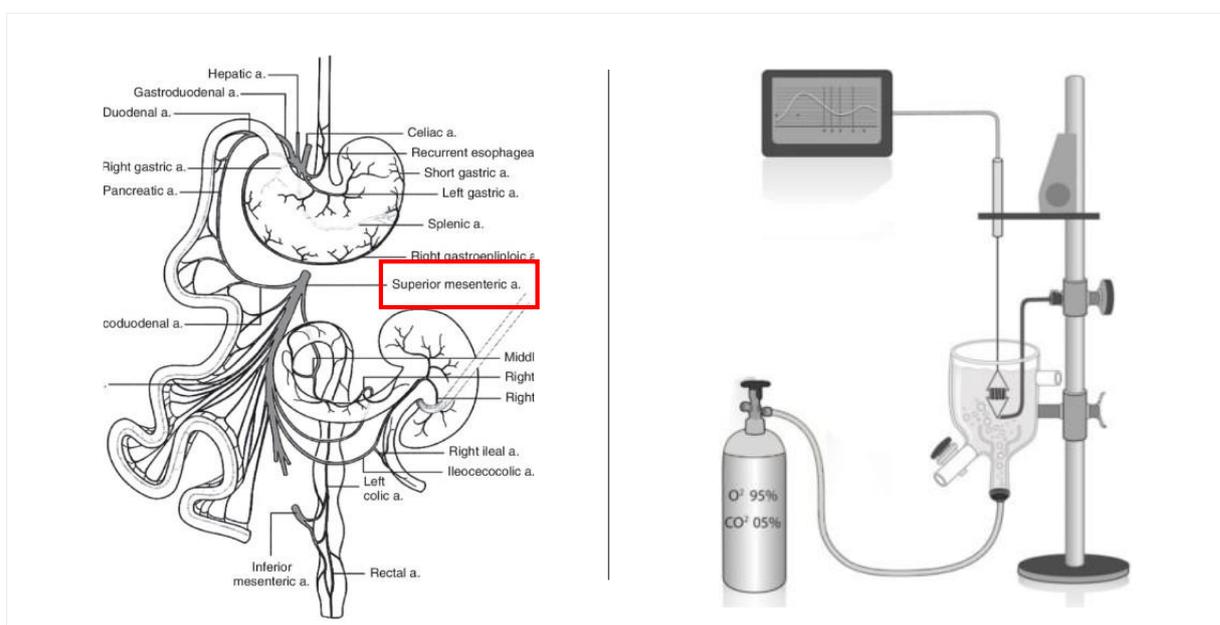


Figura 11 - Representação da artéria mesentérica superior de ratos e anel de artéria montado em sistema de banho de órgãos, inseridos em solução nutritiva Tyrode e gaseada com carbogênio. (Adaptado de ALBUQUERQUE et al., 2016; DESESSO; JACOBSON; WILLIAMS, 2012).

Para os protocolos que não dependiam do endotélio, a remoção deste foi efetuada por meio do atrito entre as paredes internas do vaso com o auxílio de uma haste de aço. A verificação da sua funcionalidade foi realizada mediante o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) 1 μM dos anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN) 1 μM. Os anéis que apresentaram relaxamento superior a 75% foram considerados com endotélio funcional, enquanto aqueles com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio funcional. Para o cálculo da porcentagem de relaxamento, e consequentemente determinação da presença ou ausência do endotélio funcional, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Relaxamento} = \frac{\text{CF} - \text{RA}}{\text{CF} - \text{LB}} \times 100$$

CF- contração obtida após a adição de 1 μM de FEN, RA- relaxamento obtido após a adição de 1 μM acetilcolina, LB- linha de base.

Os dados foram registrados por um transdutor de força (Leticia Scientific Instruments, TRI 210, Barcelona, Espanha) acoplado a um amplificador-gravador (AECAD 0804, AVS, São Paulo-SP, Brasil) e a uma interface conversora analógica-digital (DATAQ Instruments, DI 148U, Akron – OH, EUA), utilizando o software DATAQ Instruments Windaq Lite (Akron – OH, EUA) para o registro da tensão isométrica.

4.6.2. Avaliação dos efeitos do (-)-ISO sobre a artéria mesentérica superior de ratos:

Após a estabilização, os anéis com endotélio funcional foram pré-contraídos com FEN (1 μM) e sobre a fase tônica dessa concentração foram adicionadas à cuba concentrações crescentes e cumulativas do (-)-ISO (10⁻⁶-10⁻²M) para a obtenção da curva concentração-resposta de vasorrelaxamento (Figura 12).

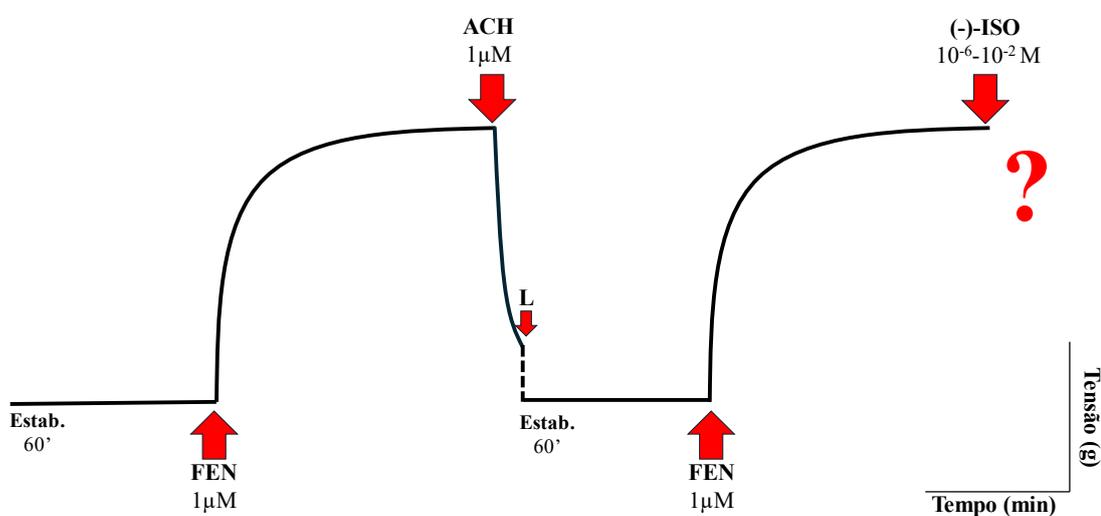


Figura 12 - Esquema do protocolo experimental realizado para a caracterização dos efeitos do (-)-ISO sobre a artéria artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.3. Avaliação do papel do endotélio no efeito induzido pelo (-)-ISO:

Após a estabilização, os anéis sem endotélio funcional foram pré-contraídos com FEN (1 μM) e sobre a fase tônica dessa concentração foram adicionadas à cuba concentrações crescentes e cumulativas do (-)-ISO (10⁻⁶-10⁻²M) para a obtenção da curva concentração-resposta de vasorrelaxamento (Figura 13).

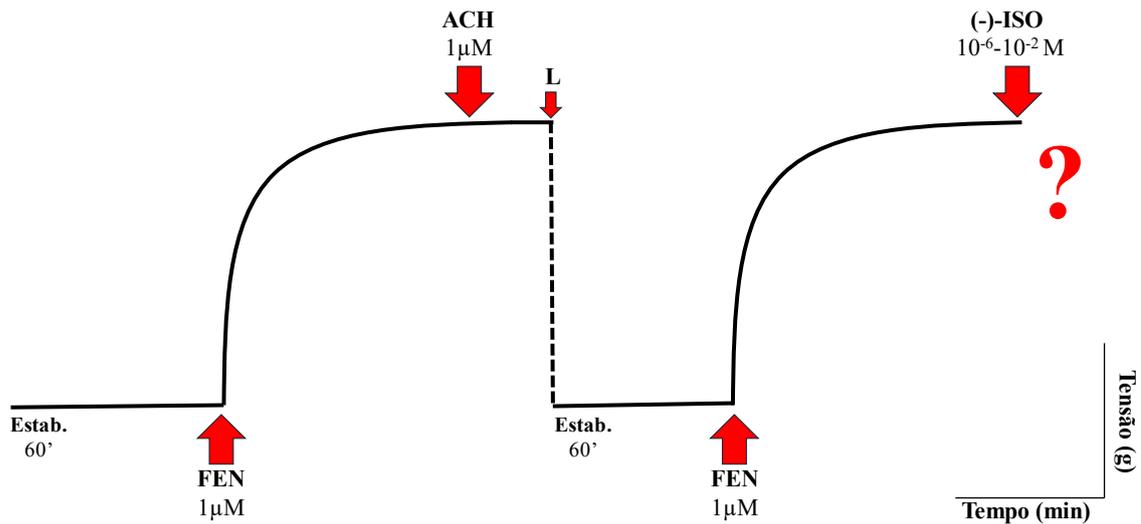


Figura 13 - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do papel do endotélio nos efeitos do (-)-ISO sobre artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.4. *Avaliação da participação dos canais para Ca^{2+} nas respostas induzidas pelo (-)-ISO em anéis de artéria mesentérica superior de ratos incubados com KCl 80 mM:*

Após a verificação da ausência do endotélio e estabilização, foi avaliada a capacidade do (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) em relaxar anéis sem endotélio funcional e pré-contraídos com KCl 80 mM. Para isso, o meio nutritivo (Tyrode) foi substituído pela solução despolarizante KCl 80 mM (Figura 14).

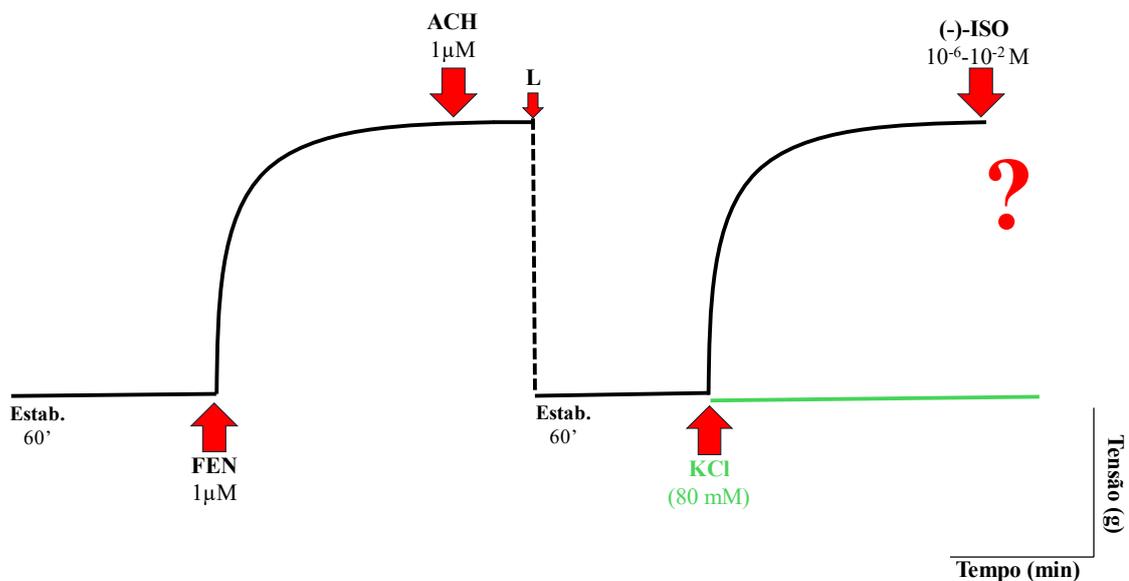


Figura 14 - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação da participação dos canais para Ca^{2+} nas respostas induzidas pelo (-)-ISO em anéis de artéria mesentérica superior de ratos incubados com KCl 80 mM. Estab- estabilização da tensão basal, FEN - fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.5. Avaliação do efeito do (-)-ISO (10^{-3} , $3 \times 10^{-3}M$ ou 10^{-2}) sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem, em contrações induzidas por cloreto de cálcio ($CaCl_2$):

Curvas concentração-resposta foram obtidas para concentrações crescentes e cumulativas de $CaCl_2$ (10^{-6} – $3 \times 10^{-2} M$) em anéis sem endotélio funcional mantidos em solução de Tyrode com KCl a 60 mM (KCl 60) sem Ca^{2+} antes e depois da pré-incubação com (-)-ISO (10^{-3} , $3 \times 10^{-3}M$ ou 10^{-2}). As curvas obtidas na presença e na ausência de (-)-ISO foram comparadas (Figura 15).

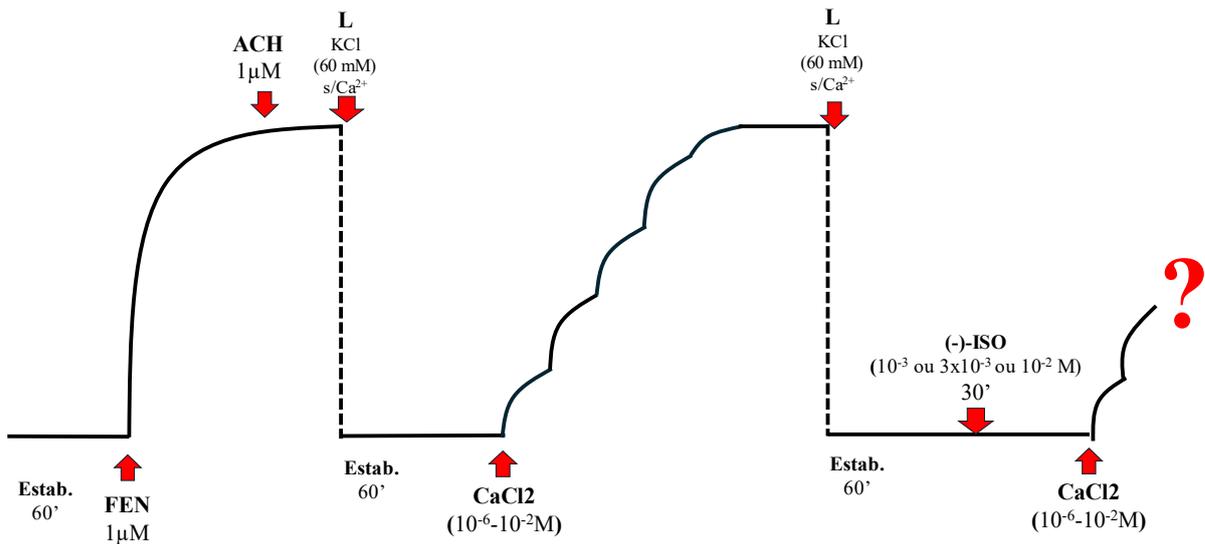


Figura 15 - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do efeito do (-)-ISO (10^{-6} - $10^{-2} M$) sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem, em contrações induzidas por cloreto de cálcio ($CaCl_2$). Estab-estabilização da tensão basal, FEN - fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.6. Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis à voltagem do tipo-L:

Após a verificação da ausência de endotélio, os tecidos foram submetidos a uma solução despolarizante de KCl 20 mM por um período de 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM), e uma vez que a fase tônica foi estabelecida, concentrações crescentes e cumulativas do (-)-ISO (10^{-6} – $10^{-2} M$) foram adicionadas à cuba (Figura 16).

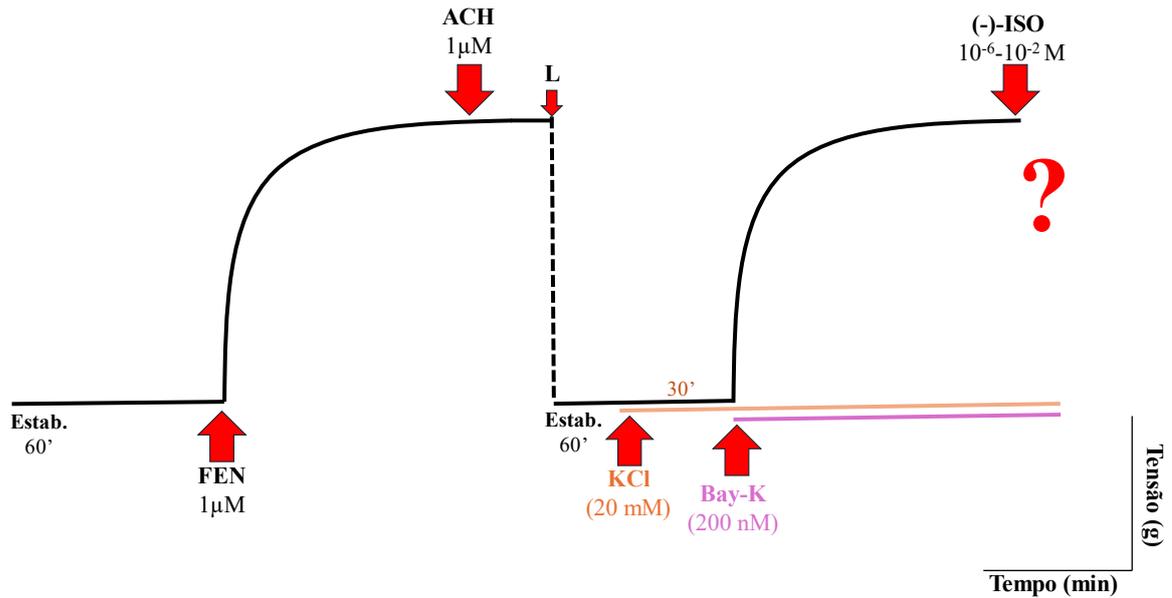


Figura 16 - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.7. Avaliação da participação dos canais para K^+ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO:

Após a verificação do endotélio, os anéis foram pré-incubados com TEA por 30 minutos. Em seguida os anéis foram pré-contraídos com FEN (1 μ M) e após o estabelecimento da fase tônica foram construídas curvas concentração-resposta para o (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) (Figura 17).

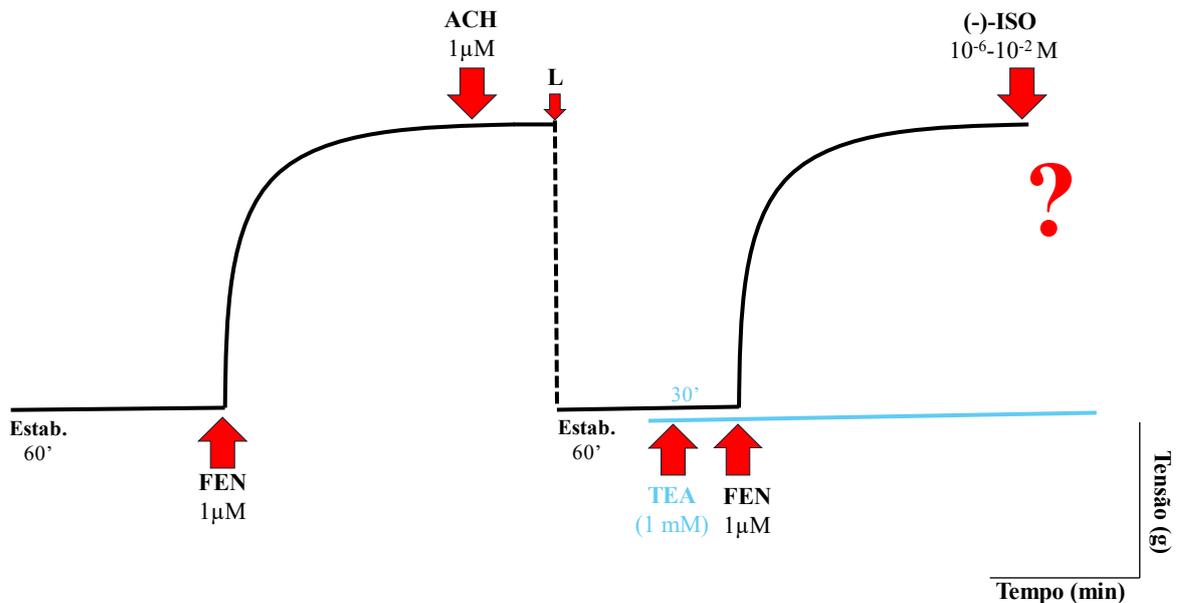


Figura 17 - Esquema do protocolo experimental realizado para a avaliação da participação dos canais para K^+ nas respostas induzidas pelo (-)-ISO. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, TEA- tetraetilamônio, (-)-ISO-(-)-isopulegol.

4.6.8. Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações transientes induzidas por FEN (1 μ M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos:

Após a verificação da ausência do endotélio, a solução Tyrode foi substituída pela solução despolarizante KCl 60 mM, que, por sua vez, foi substituída por solução Tyrode nominalmente livre de Ca^{2+} . Após isso, contrações transientes foram induzidas por FEN (1 μ M) na ausência de (-)-ISO. Em seguida, os anéis passaram novamente pelo mesmo processo, no entanto, as contrações induzidas por FEN foram realizadas após a pré-incubação durante 20 minutos com o (-)-ISO nas concentrações 10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2} M (Figura 18).

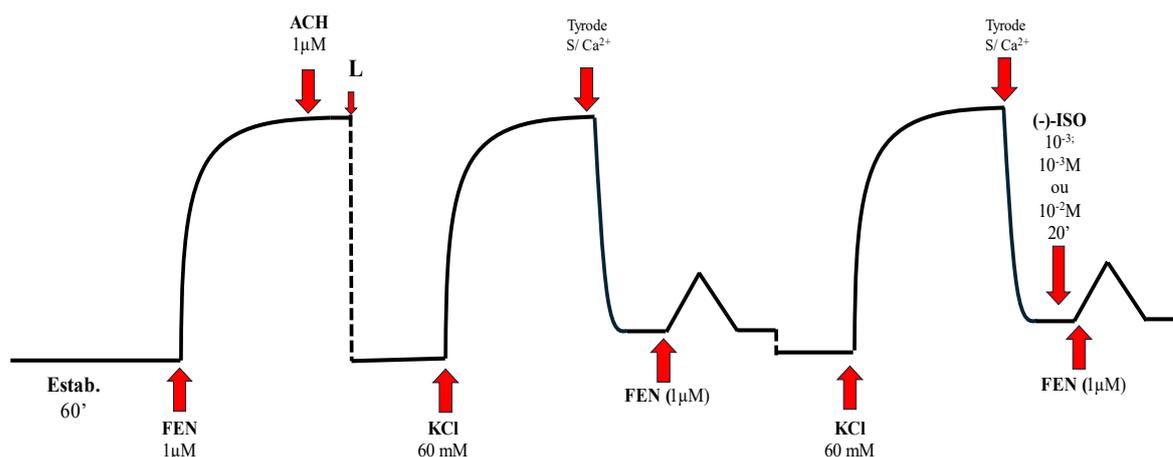


Figura 18 - Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações transientes induzidas por FEN (1 μ M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, KCl- solução de cloreto de potássio, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.6.9. Avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações induzidas por Na_3VO_4 em anéis de artéria mesentérica superior de ratos:

Após a verificação da ausência do endotélio, foi construída uma curva concentração-resposta para o ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) (10^{-5} - 10^{-2}). Posteriormente, as preparações foram lavadas com Tyrode e passaram novamente por um período de estabilização (60 minutos), após isso, os anéis foram pré-incubados com concentrações do (-)-ISO (10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2} M) por 30 minutos e uma nova curva foi construída para o (Na_3VO_4). As curvas obtidas na presença e na ausência de (-)-ISO foram comparadas (Figura 19).

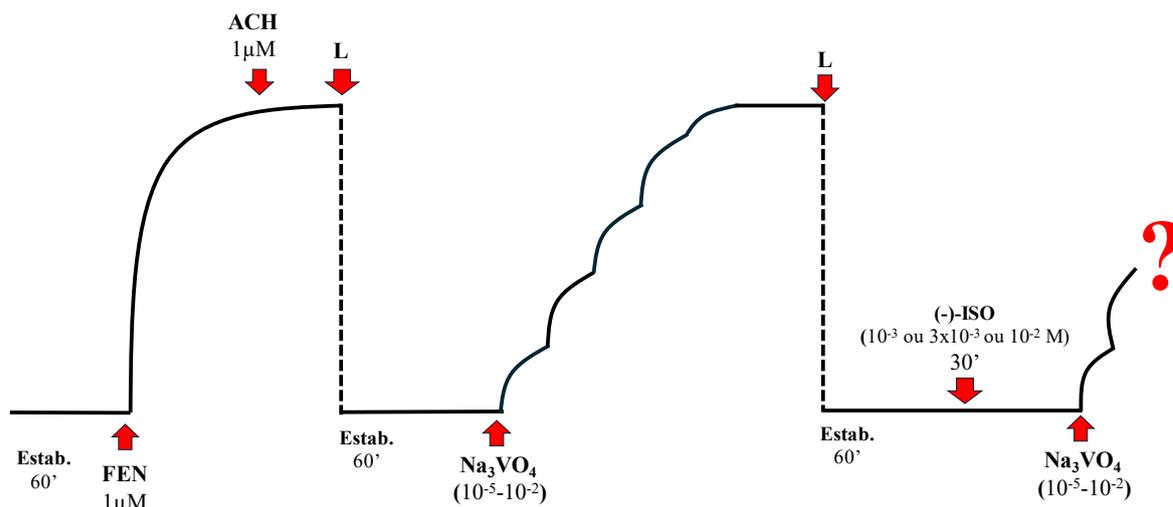


Figura 19 - Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do (-)-ISO sobre contrações induzidas por Ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. Estab- estabilização da tensão basal, FEN- fenilefrina, ACH- acetilcolina, L- lavagem, (-)-ISO- (-)-isopulegol.

4.7. Procedimentos Experimentais “*in silico*”:

4.7.1. Análise Docking Molecular

Os experimentos *in silico* foram realizados em parceria com o Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia (GMBio), localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), no bloco B do departamento de biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As estruturas dos receptores nicotínicos não estão determinadas experimentalmente para *Rattus Norvegicus* no Protein Databank (código PDB: 5ZHP), e, por isso, foram modeladas, segundo Silva et al. (2021). A análise de docking molecular foi realizada entre o (-)-ISO e o receptor utilizando uma abordagem comparativa com as interações entre os alvos e agonistas conhecidos. A estrutura do (-)-ISO (ID do composto: 170833) foi obtida no banco de dados PubChem ([//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)). Além disso, a Nicotina [NCT: agonista do receptor nicotínico] também foi utilizada como ligante para determinar os sítios de ligação correspondentes, segundo Silva et al. (2021).

As interações entre (-)-ISO e a subunidade α -1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem foram investigadas por análise de acoplamento molecular. A estrutura 3D da subunidade α -1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem de *Rattus Norvegicus* foi obtida do Protein Data Bank (código PDB: AF-P22002). A análise de acoplamento molecular entre (-)-ISO e o canal de Ca^{2+} tipo L dependente de voltagem de rato foi realizada utilizando uma abordagem comparativa com as interações entre o mesmo receptor e um agonista

conhecido (Nifedipina). A estrutura de (-)-ISO (ID do composto: 170833) e Nifedipina (ID do composto: 4485) foi obtida no banco de dados PubChem ([//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Estruturas de ligantes e receptores foram preparadas usando o Open Babel dentro do pacote PyRx (O'BOYLE ET AL., 2011; DALLAKYAN E OLSON, 2015). Os cálculos de acoplamento molecular foram realizados utilizando Autodock Vina (TROTTE E OLSON, 2009). Para cada receptor, o centro da caixa da grade foi posicionado no local de ligação do agonista e o tamanho da caixa foi definido para 25x25x25 Å. Para visualização dos resultados foi utilizado o Discovery Studio v16 (BIOVIA).

4.8. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As comparações estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 10.3.0 (San Diego, CA, EUA). O teste de normalidade de variância foi processado pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste t-student, ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. *In vivo* agudo:

Conforme ilustrado na figura 20, a administração intravenosa de (-)-ISO induziu hipotensão ($-24 \pm 7\%$; $-38 \pm 5\%$ e $-33 \pm 7\%$) e bradicardia ($-41 \pm 12\%$; $-57 \pm 14\%$; e $-59 \pm 9\%$) nas doses 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente ($n = 6$)

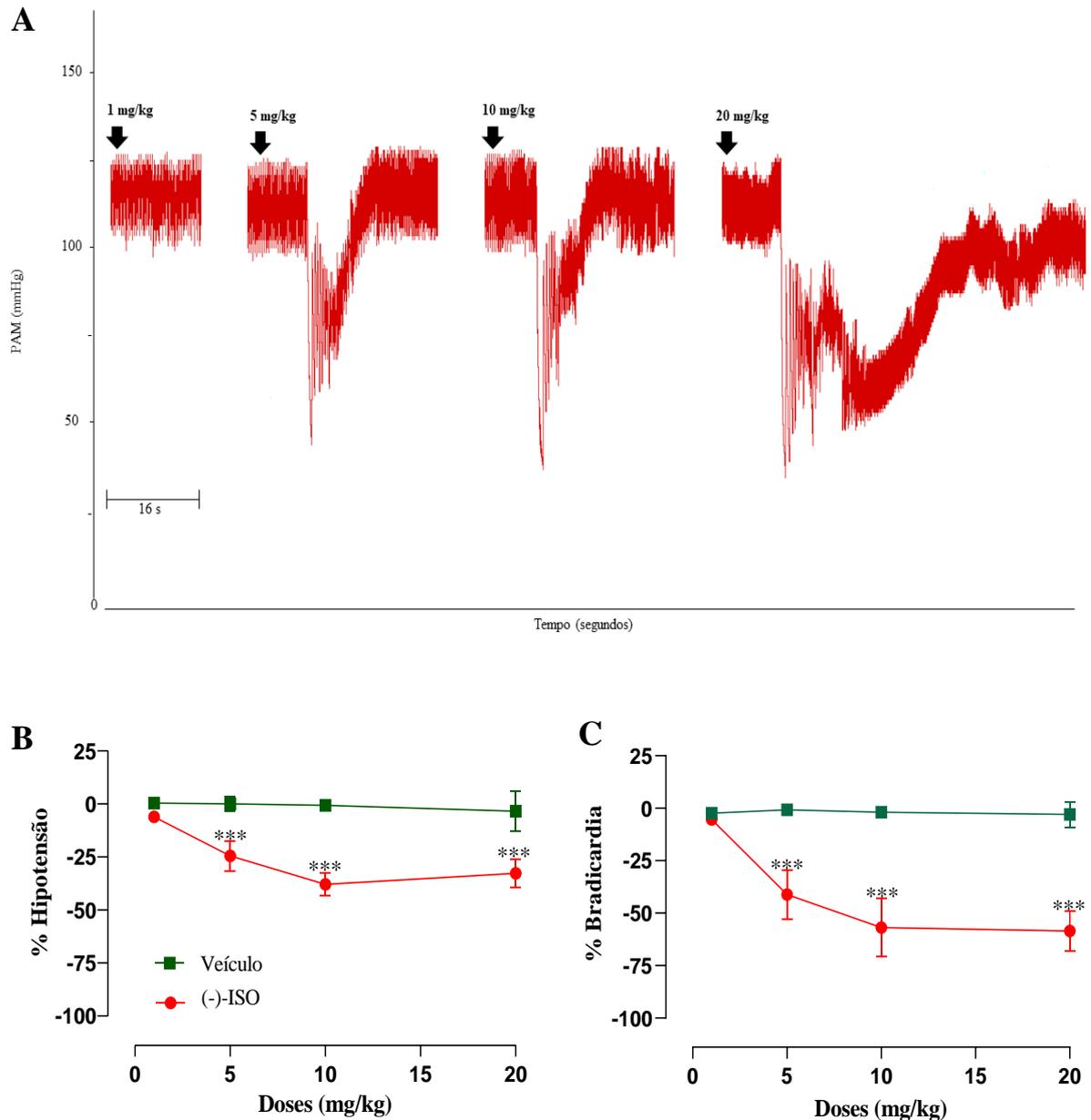


Figura 20 - A- Registro original mostrando as variações de pressão média (mmHg) em função do tempo (segundos) após a administração aguda (i.v.) randomizadas do isopulegol (-)-ISO (1, 5, 10 e 20 mg/kg) em um rato normotenso não anestesiado. A setas indicam o momento da administração das doses. Efeito hipotensor (**B**) e bradicárdico (**C**) induzido pela administração aguda de doses randomizadas de (-)-ISO (1, 5, 10 e 20 mg/kg i.v.)

em ratos normotensos (n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 vs veículo.

De maneira geral, o efeito hipotensor pode ser atribuído a mecanismos cardíacos diretos, como a redução da frequência cardíaca, uma vez que a pressão arterial (PA) é determinada pela relação entre débito cardíaco (DC) e resistência vascular sistêmica (RVS). Quando a frequência cardíaca diminui, o débito cardíaco é reduzido, resultando em menor PA. Além disso, efeitos vasculares podem contribuir para a hipotensão. Por exemplo, a ativação dos receptores muscarínicos endoteliais aumenta os níveis de cálcio intracelular, levando à liberação de agentes vasorrelaxantes derivados do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; SATERNOS ET AL., 2018). Essa vasodilatação reduz a resistência vascular periférica, diminuindo a PA (ALVES-LOPES, NEVES, & TOUYZ, 2019). Efeitos diretos nas células musculares lisas vasculares também podem induzir a vasodilatação, contribuindo para a redução da PA (BROZOVICH et al., 2016).

Ademais, os monoterpenos alcoólicos são um dos tipos mais estudados de monoterpenos sobre o sistema cardiovascular, especialmente na hipertensão. Em seu estudo, Silva (2021) demonstrou que, dentre 16 diferentes tipos de monoterpenos analisados, 25% eram alcóolicos e, entre estes, aproximadamente 27% apresentam efeito sobre a hipertensão. Dessa maneira, é possível que o efeito hipotensor induzido pelo (-)-ISO, um monoterpeno alcoólico, esteja de alguma maneira relacionado a constituição química da sua molécula. Efeitos similares foram obtidos para outros monoterpenos desse tipo, como por exemplo, para o d-limoneno, que apresentou efeito hipotensor e bradicárdico nas doses 10, 20 e 40 mg/kg em ratos normotensos (NASCIMENTO, 2019).

É comum que a redução da PA seja acompanhada por uma resposta taquicárdica reflexa. Na literatura, há evidências de terpenos, como citronelol (BASTOS et.al., 2009), linalol (ANJOS et. al., 2013), (+)- α -pineno e (-)- β -pineno (MENEZES et., al 2010), que apresentaram essa resposta. Por outro lado, os terpenos d-limoneno (NASCIMENTO, 2019), citronelal (ANDRADE et al, 2012), carvacrol (DANTAS, 2015), farnesol (SILVA, 2021) e α -bisabolol (MENEZES et., al 2010) apresentaram efeito hipotensor associado a bradicardia, semelhante ao obtido para o (-)-ISO neste estudo.

A resposta bradicárdica induzida pelo (-)-ISO pode ser elucidada por uma possível estimulação do sistema nervoso parassimpático, que, mediante a liberação do neurotransmissor acetilcolina, ativa os receptores muscarínicos presentes no coração, especialmente no nódulo

sinoatrial (SA), resultando na redução da taxa de disparo e, conseqüentemente, na diminuição da frequência cardíaca (MOSS et al., 2018).

Além disso, Filho (2019) demonstrou em seu estudo que os isômeros de (-)-ISO agem como bloqueadores dos canais para cálcio (CCBs). A literatura relata que os CCBs reduzem a velocidade de condução dos sinais elétricos cardíacos promovendo bradicardia (NADEMANEE; SINGH, 1988). Levando essas informações em consideração, também é possível hipotetizar que o efeito bradicárdico induzido pelo (-)-ISO pode estar relacionado com a sua capacidade de bloquear esses canais. No entanto, mais estudos precisam ser realizados.

A determinação das doses utilizadas neste estudo para administração intravenosa foi embasada nos efeitos hipotensores observados em estudos anteriores com terpenos semelhantes. Por exemplo, Bastos e colaboradores (2009) demonstraram os efeitos hipotensores e taquicárdicos do citronelol em ratos normotensos utilizando as doses 1, 5, 10 e 20 mg/kg. Em outro estudo, Menezes et al. (2010) evidenciaram que a administração intravenosa do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (EOCW), cujos compostos majoritários são monoterpenos, nas mesmas doses, também resultou na redução da pressão arterial, possivelmente mediada pela participação dos canais para cálcio, sendo observada bradicardia apenas na dose mais elevada. Adicionalmente, pesquisas com outros monoterpenos, como d-limoneno (NASCIMENTO, 2019), citronelal (ANDRADE et al, 2012), carvacrol (DANTAS, 2015), linalol (ANJOS et al, 2013) e pinenos (MENEZES et al., 2010), corroboram a utilização dessas doses.

Para investigar o mecanismo de ação pelo qual o (-)-ISO promove esses efeitos sobre PAM e FC e considerando que esses efeitos podem estar associados a mecanismos cardíacos e vasculares buscamos avaliar a participação dos receptores muscarínicos, receptores nicotínicos do NO e das PGI₂.

5.1.1. Avaliação da Funcionalidade das Ferramentas Farmacológicas:

Para a avaliação dos mecanismos de ação do (-)-ISO envolvidos nos efeitos hipotensor e bradicárdico foram utilizadas quatro ferramentas farmacológicas com diferentes repercussões sobre a PAM e FC (Tabela 7). Após administração de ATR, um antagonista dos receptores muscarínicos (BOLTON, 1977), constatou-se um aumento na FC, relacionado ao bloqueio do estímulo parassimpático no coração e, conseqüente, predomínio do simpático, desencadeando taquicardia. Já a ausência de alteração na PAM pode ser atribuída à falta de inervação colinérgica na maioria dos vasos sanguíneos (BROADLEY; KELLY, 2001). A inibição dos

receptores nicotínicos com HEXA, um bloqueador ganglionar (FORD, 1962), promoveu a redução da PAM como resultado do bloqueio da atividade dos gânglios simpáticos (KLEINZ; SPENCE, 2008). É sabido que o óxido nítrico (NO) é um importante regulador da homeostase vascular promovendo o vasorrelaxamento. Após o bloqueio de sua síntese com L-NAME é possível observar um aumento significativo da PAM acompanhado de uma redução da FC, provavelmente mediada pelo barorreflexo (KÜNG et al., 1995). A administração de INDO, um inibidor da ciclooxigenase (MITCHELL et al., 1993), não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. Esses achados corroboram os obtidos em outros estudos disponíveis na literatura, comprovando a funcionalidade das ferramentas farmacológicas utilizadas (BASTOS et al., 2010; DE MENEZES et al., 2010; SILVA et al., 2021)

Tabela 7 - Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados antes (controle; n = 6) e após administração aguda (i.v.) de ATR (2 mg/kg; n = 6), HEXA (20 mg/kg; n = 6), L-NAME (20 mg/kg; n = 6) e INDO (5 mg/kg; n = 6). PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; ATR: atropina; HEXA: hexametônio; L-NAME: Nw-nitro-L-arginina-metil-éster; INDO: indometacina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m dos registros obtidos. Foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni; *** p < 0,001 vs controle.

	Controle	Após ATR	Após HEXA	Após L-NAME	Após INDO
PAM (mmHg)	118,2 \pm 2	115,4 \pm 3,2	72,97 \pm 3***	153,6 \pm 7,9***	127,3 \pm 2,2
FC (bpm)	406 \pm 24	531,3 \pm 5,8***	419,6 \pm 33,7	268,9 \pm 7,6***	348 \pm 10,3

5.1.2. Avaliação da Participação dos Receptores Muscarínicos

Afim de confirmar a participação dos receptores muscarínicos nas respostas induzidas pelo (-)-ISO sobre a PAM e FC, foram realizados experimentos com ATR (2mg/kg). Como é possível observar na figura 21, após o bloqueio desses receptores, a resposta bradicárdica induzida pelo (-)-ISO foi significativamente abolida nas doses 5, 10 e 20 mg/kg (-4 \pm 2; -3 \pm 2; -6 \pm 2), respectivamente, n = 6). No entanto, não houve diferença na hipotensão.

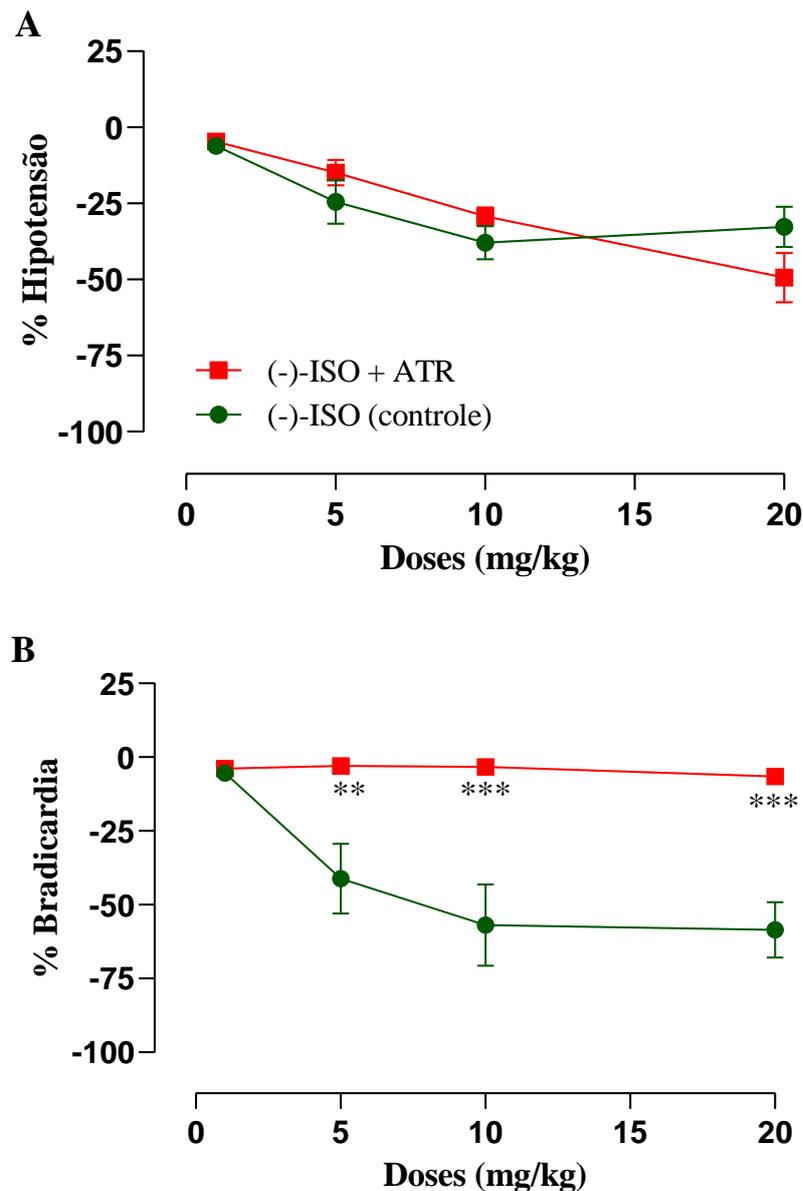


Figura 21 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com atropina (ATR) (2mg/kg, i.v., n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs controle.

Esses achados indicam que os receptores muscarínicos cardíacos (M2) podem estar envolvidos na modulação da resposta bradicárdica induzida pelo (-)-ISO. Seja pela ativação direta do (-)-ISO agindo diretamente sobre esses receptores ou pela ação indireta por ativação neural colinérgica, especialmente do nervo vago, um dos principais componentes do sistema nervoso parassimpático, que libera ACh e estimula os receptores muscarínicos presentes nos nódulos SA provocando bradicardia (CAPILUPI; KERATH; BECKER, 2020) Além disso, como o pré-tratamento com ATR não foi capaz de abolir ou atenuar a resposta hipotensora

induzida pelo (-)-ISO, pode-se inferir que apesar do envolvimento dos receptores muscarínicos M2, não há participação dos receptores muscarínicos endoteliais (M3).

5.1.3. Avaliação da Participação dos Receptores Nicotínicos

Para avaliar a ação do (-)-ISO sobre a ativação vagal indireta via estímulo nicotínico, foram realizados protocolos com HEXA 20 mg/kg. De acordo com os dados obtidos, a pré-administração de HEXA não alterou a hipotensão induzida pelo (-)-ISO, já a bradicardia foi abolida nas doses 5, 10 e 20 mg/kg (-3 ± 5 ; 0 ± 2 ; -9 ± 9 , respectivamente, $n=5$) (Figura 22).

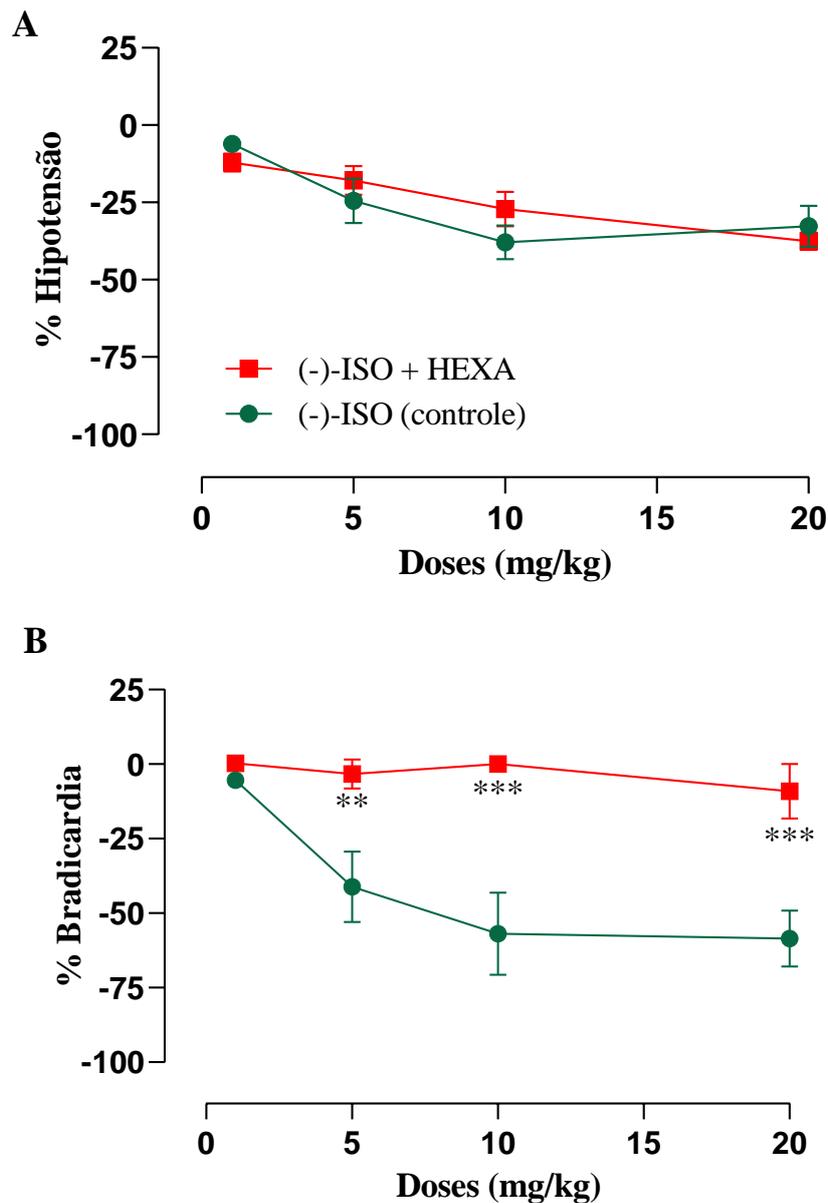


Figura 22 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, ($n = 6$) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com hexametônio (HEXA) (20 mg/kg, i.v., $n = 6$). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle

Resultados semelhantes foram observados para o monoterpene citronelal. Após a administração dos bloqueadores ATR ou HEXA, a resposta bradicárdica foi abolida nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. E seu mecanismo de ação foi associado à ativação indireta dos receptores muscarínicos através do nervo vago. Além disso, o efeito hipotensor não foi alterado em nenhuma das condições. Nesse estudo, a confirmação da hipótese de que a bradicardia induzida pelo citronelal envolve a regulação autonômica da função do nó sinoatrial foi realizada por meio de eletrocardiograma (ECG). O citronelal demonstrou a capacidade de bloquear o nó sinoatrial, e esse efeito foi revertido após o bloqueio com ATR (ANDRADE et al., 2012).

Moreira (2013) evidenciou, em sua pesquisa, o efeito hipotensor e bradicárdico do monoterpene citral nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. Além disso, observou que esses efeitos foram revertidos após a administração dos bloqueadores ATR e HEXA, indicando que ambos os efeitos são decorrentes da ativação indireta dos receptores muscarínicos cardíacos via ativação do nervo vago. Essa hipótese foi confirmada a partir do tratamento com tiopental sódico, um barbitúrico com efeito vagolítico central (MOREIRA, 2013).

A vagotomia bilateral é outra técnica comumente utilizada para a confirmação do estímulo vagal por terpenos. Menezes 2010, demonstrou que o EOCW foi capaz de induzir hipotensão associada bradiarritmia na dose 20 mg/kg. Em ratos vagotomizados os efeitos foram similares aos observados em animais tratados com ATR, sugerindo que esse óleo essencial foi capaz de promover bradicardia devido a uma ativação muscarínica secundária a uma estimulação vagal.

Como a resposta bradicárdica pode estar relacionada a uma ativação direta dos receptores nicotínicos, buscamos avaliar a afinidade de ligação do (-)-ISO com esses receptores. Para isso, foi avaliada a presença de ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, que favorecem a afinidade e estabilização dos complexos (VARMA et al., 2010; WILLIAMS; LADBURY, 2005).

As interações entre (-)-ISO e o receptor nicotínico mostraram a presença de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gln563, e três interações hidrofóbicas (π -alquil e π -sigma) com Trp695. Além disso, o (-)-ISO estava envolvido em uma interação doador-doador desfavorável com o resíduo Asn119 (Figura 23).

A ligação do (-)-ISO ao sítio ortostérico do receptor nicotínico, como sugerido pelo docking, corrobora os achados nos experimentos intravenosos *in vivo*. A interação com o resíduo Gln563 e as interações hidrofóbicas com Trp695 podem desempenhar um papel na

ativação dos receptores nicotínicos e na subsequente resposta bradicardia. A interação desfavorável com o resíduo Asn119 pode não estar diretamente relacionada à resposta bradicardia, mas pode influenciar a afinidade ou eficácia do (-)-ISO como agonista.

A análise de docking molecular foi validada com base no redocking do ligante NCT, em seu respectivo alvo. A posição dos ligante e do resíduo de interação foi comparada com as obtidas para o (-)-ISO. A interação do receptor nicotínico com seu agonista (NCT) ocorre com os resíduos Tyr93, Trp149, Tyr190 e Tyr197. Os resultados mostraram que o (-)-ISO também pode se ligar ao sítio ortostérico do receptor nicotínico, porém com ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas com diferentes resíduos de aminoácidos (Figura 23). Essas ligações diferentes, indicam que o (-)ISO pode ter um mecanismo de ação distinto em relação ao agonista conhecido (NCT) podendo abrir caminho para novas possibilidades terapêuticas.

Diante disso, mais estudos precisam ser realizados para uma compreensão mais clara de como o (-)-ISO interage com esses receptores.

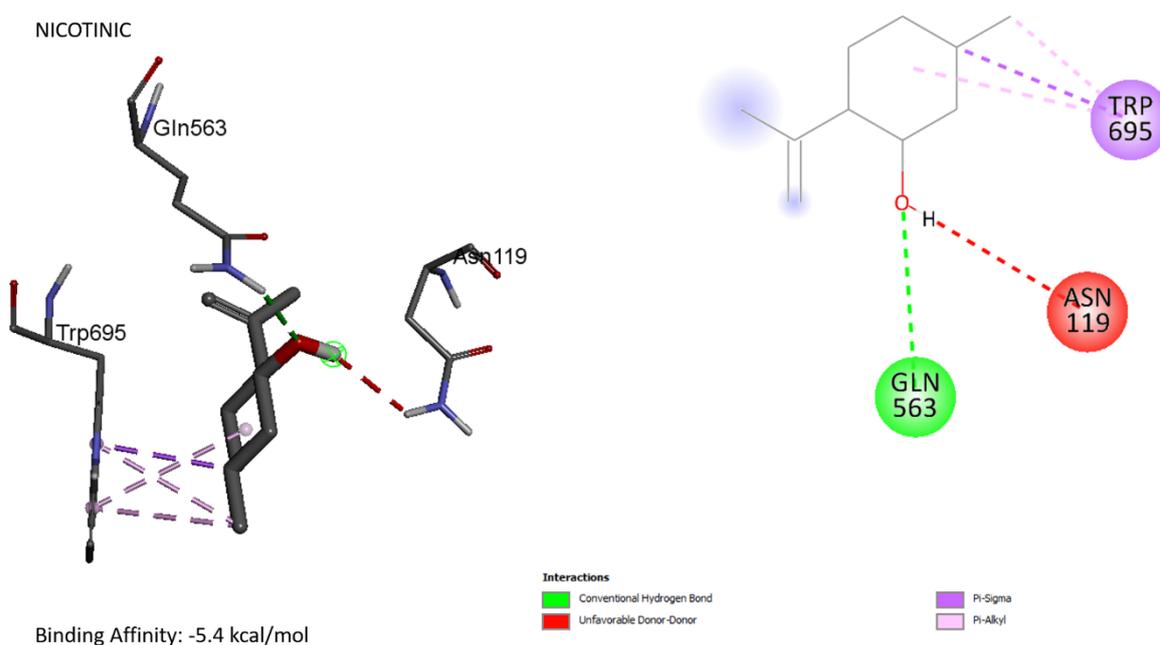


Figura 23 - Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de docking entre (-)-Isopulegol e o receptor nicotínico de *Rattus Norvegicus*.

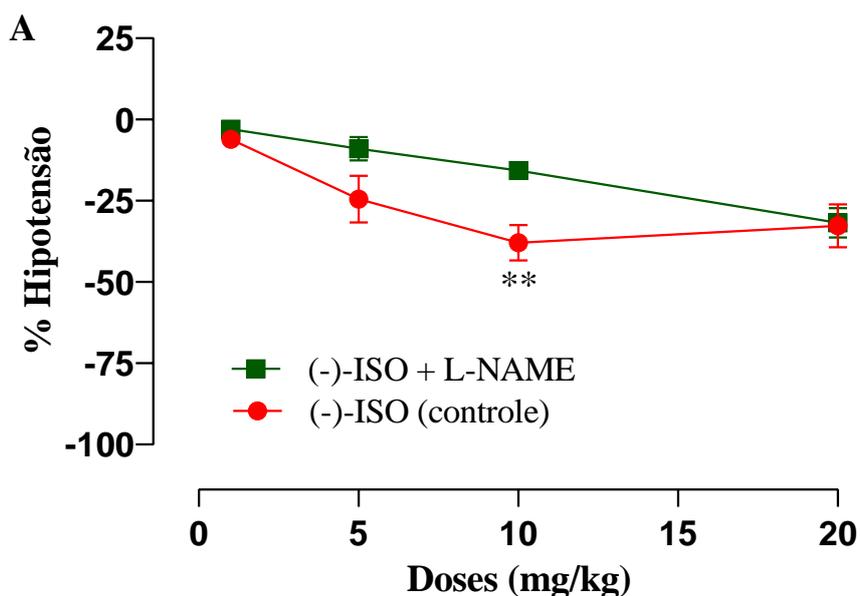
Os resultados obtidos no docking e após os bloqueios dos receptores muscarínicos e nicotínicos ajudam a traçar um caminho importante para a elucidação do mecanismo de ação do (-)-ISO. No entanto, é importante considerar a hipótese de que o efeito bradicárdico induzido por ele pode estar relacionado a ações no sistema nervoso central. Dessa maneira, é possível supor que o (-)-ISO pode estimular diretamente os receptores nicotínicos liberando ACh, que

por sua vez, ativa os receptores muscarínicos no coração, levando a efeitos bradicárdicos. No entanto, para confirmar essa hipótese são necessários mais estudos.

5.1.4. Avaliação da Participação do Óxido Nítrico

Do ponto de vista fisiológico, sabe-se que a hipotensão pode ser causada em resposta a uma vasodilatação resultante do relaxamento vascular, o qual pode ser influenciado por fatores relacionados ou não à camada endotelial. O NO é um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) e tem papel crucial na regulação do tônus vascular e consequentemente, na resistência vascular periférica, determinando a condição da pressão arterial (CARVALHO et al., 2001).

Dessa maneira, para tentar elucidar o mecanismo pelo qual o (-)-ISO promove hipotensão buscou-se avaliar o possível envolvimento do NO. Como podemos observar na figura 24, após o bloqueio da síntese do NO com L-NAME 20 mg/kg, o efeito hipotensor do (-)-ISO foi atenuado significativamente na dose 10 mg/kg (-15 ± 1 ; $n = 6$), indicando um possível envolvimento desse mediador na hipotensão induzida pelo (-)-ISO. No entanto, não houve diferença na bradicardia.



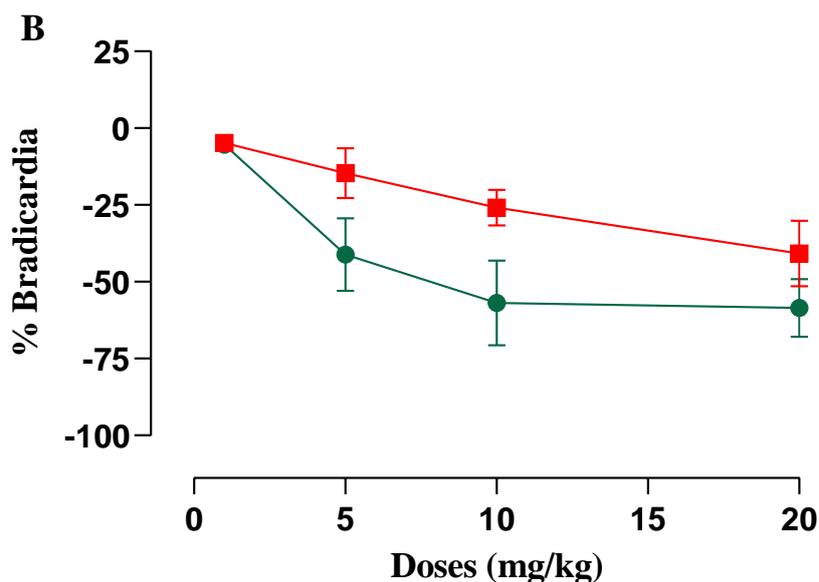


Figura 24 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v., (n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. **p < 0,01 vs controle.

Na literatura, de modo geral, não é tão comum encontrar evidências da participação do NO como principal via responsável pela hipotensão induzida por monoterpenos. Em estudos com citronelal (ANDRADE et al., 2012) e citronelol (BASTOS et al., 2010), por exemplo, o pré-tratamento com L-NAME não demonstrou alterações significativas na hipotensão, sugerindo que esse mecanismo não desempenha um papel importante na resposta hipotensora promovida por esses terpenos. Em contrapartida, Anjos (2013) demonstrou que essa via está parcialmente associada com o efeito hipotensor induzido pelo linalol, de maneira similar ao encontrado para o (-)-ISO neste estudo.

5.1.5. Avaliação da Participação da Ciclooxygenase

Apesar de ter uma menor contribuição na vasodilatação derivada do endotélio, as prostaciclina (PGI₂) também possuem papel importante na regulação do tônus vascular (CARVALHO et al., 2001). Dessa maneira buscamos investigar sua participação na resposta hipotensora induzida pelo (-)-ISO através de experimentos onde os animais foram pré-tratados com INDO (5 mg/kg).

Como demonstrado na figura 25, o pré-tratamento com INDO não foi capaz de atenuar os efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pelo (-)-ISO, indicando a não participação dos metabólitos de ciclooxygenase. Efeitos similares foram encontrados para monoterpenos como

linalol (ANJOS et., al 2013), citronelal (ANDRADE et., al 2012) e citronelol (BASTOS et.al., 2009).

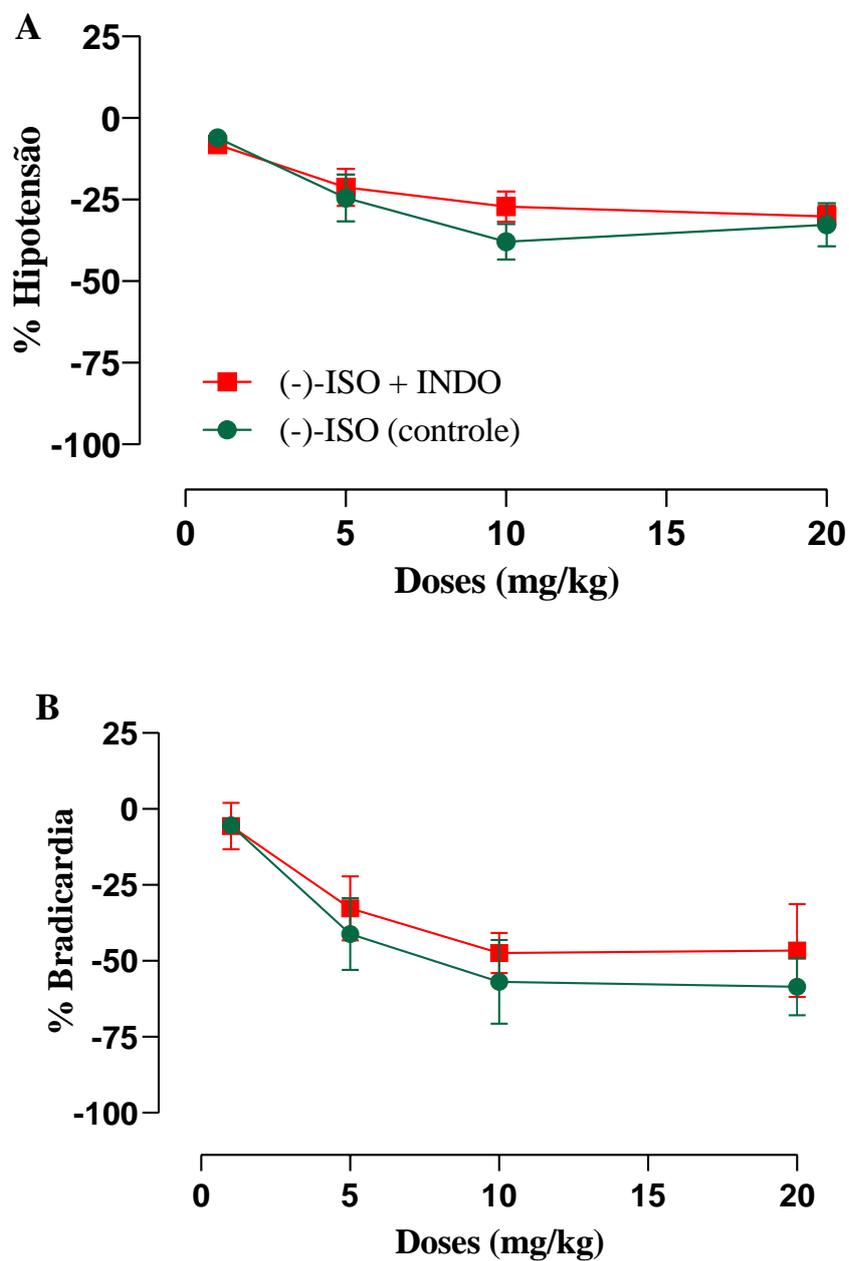


Figura 25 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses aleatórias de (-)-ISO, (n = 6) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos normotensos após pré-tratamento com indometacina (INDO) (5 mg/kg, i.v., n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

5.2. *In vivo* subagudo:

Após a constatação dos efeitos agudos promovidos pelo (-)-ISO sobre a PAM e FC, seus efeitos foram avaliados através da administração oral, considerada a via mais comum de administração de fármacos, especialmente de medicamentos de uso regular e crônico, devido à economia, facilidade de administração e adesão pelos pacientes (ALQAHTANI et al., 2021; KIM; JESUS, 2023).

Como demonstrado na figura 26 A, tanto a nifedipina, um fármaco anti-hipertensivo bem estabelecido, quanto o (-)-ISO reduziram significativamente a PAM em comparação ao grupo controle. No entanto, o (-)-ISO demonstrou uma redução mais pronunciada e duradoura ao decorrer do tempo, especialmente nas horas 24, 30 e 48 após a sua administração.

Em relação à FC, houve uma taquicardia reflexa observada 0,5 horas após a administração de nifedipina, em resposta à queda na pressão arterial causada pela vasodilatação promovida por este fármaco. De forma semelhante, o (-)-ISO alterou significativamente a FC, promovendo uma taquicardia reflexa após 2 horas (T2H) e 48 horas (T48H) em comparação à linha de base (T0H) (figura 26 B). Esse resultado contrasta com a administração aguda, que foi capaz de promover bradicardia.

Essa diferença possivelmente está associada à via de administração. Quando uma substância é administrada oralmente, a absorção é gradual e a concentração no sangue aumenta de forma mais lenta. Quando administrada intravenosamente, ela geralmente atinge circulação sistêmica de forma rápida e em uma concentração mais elevada podendo ativar diretamente receptores no coração e/ou vasos (JAIN, 2020; KIM; JESUS, 2023).

Dessa maneira, para confirmação desses resultados, mais estudos precisam ser realizados.

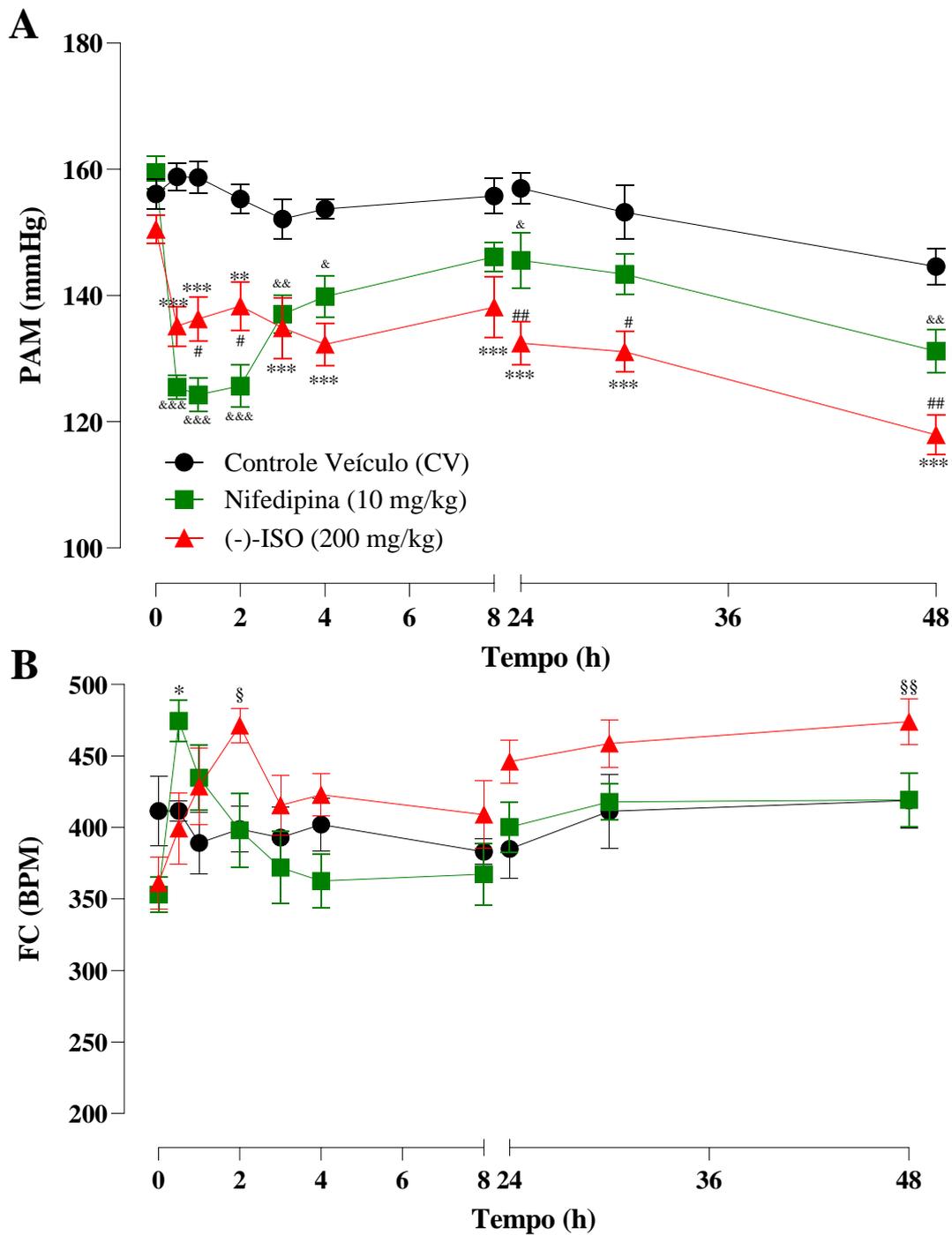


Figura 26 - Efeito do tratamento oral (via gavagem) do (-)-ISO puro (200 mg/kg) (n = 6), controle nifedipina (CN) (10 mg/kg) (n = 5) e controle veículo (CV) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos hipertensos (L-NAME) (n = 6) antes (tempo 0) e 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 24; 30; 48 h após os tratamentos. Os valores são expressos como média \pm e.p.m. Foi utilizado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (-)-ISO vs CV; &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001 CN vs CV, §p < 0,05 T2H vs T0H, §§p < 0,01 T48H vs T0H.

Para o tratamento oral, a escolha da dose ocorreu através da busca em artigos publicados que demonstraram os efeitos biológicos do isopulegol. Em seu estudo, Silva et al,

(2009) demonstrou que o isopulegol na dose de 200 mg/kg/v.o foi mais eficaz em reduzir lesões gástricas e proteger a mucosa em modelo de úlcera induzida por etanol e indometacina. Além disso, em modelo de convulsão, a dose de 200 mg/kg/i.p foi a mais eficaz, proporcionando 100% de proteção contra a mortalidade, comparável ao diazepam (controle positivo) (SILVA et al., 2009b).

Essa dose também se mostrou mais eficaz nas respostas anti-hipertensivas induzidas por outros monoterpenos. O citronelal na dose 200 mg/kg promoveu uma redução significativa da PAM apresentando efeito mais duradouro que a NIF (3 mg/kg), enquanto a dose 100 mg/kg não demonstrou efeito (ANDRADE et al., 2012). Outros exemplos são o linalol que na sua forma pura também reduziu a pressão nas três primeiras horas após administração e o β -pineno que após a complexação em β -ciclodextrina promoveu redução da pressão nos tempos 36 e 48 horas nessa mesma dose (ANJOS et al., 2013; MOREIRA et al., 2016).

Para a escolha da dose, a toxicidade também foi levada em consideração. De acordo com Próspero (2019) o isopulegol é uma substância de baixo risco de toxicidade. Apresentando DL_{50} (dose letal média para 50% dos animais) igual a $1,03 \pm 0,10$ mL mL/kg (v.o) em ratos de ambos os sexos (BHATIA et al., 2008; TAKAHASHI et al., 1986).

O modelo de hipertensão induzido por L-NAME já é bem estabelecido na literatura. Andrade et al, (2012), demonstrou que animais tratados com L-NAME 50 mg/kg na água de beber por 7 dias aumentou significativamente a PAM, de 126 ± 5 para 161 ± 4 mmHg, sem efeito na FC. No estudo de Moreira et al, (2016) a administração oral (gavagem) de L-NAME (20 mg/kg/7 dias) promoveu o aumento da PAM de 118 ± 4 para 156 ± 7 mmHg em ratos *Wistar*.

Os dados de PAM e FC demonstrados na tabela 8 são semelhantes aos estudos supracitados, comprovando que o tratamento com L-NAME realizado neste estudo foi eficiente em induzir elevação da PA.

Tabela 8 - Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos induzidos por L-NAME (20 mg/kg).

	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Normotensos	$119,4 \pm 1,3$	$370,6 \pm 13,5$
Hipertensos	153 ± 1 ***	$376,5 \pm 5,5$

Os valores estão expressos como média \pm e.p.m (Teste "t" Student não pareado; *** $p < 0,001$ hipertensos vs normotensos; n = 6).

De maneira geral, os terpenos apresentam características como curto tempo de meia vida, alta volatilidade, baixa solubilidade, biodisponibilidade e absorção pelo organismo que são fatores limitantes para o total aproveitamento dos possíveis benefícios trazidos por eles. Devido a isso, diversos estudos estão associando o uso dos terpenos à biotecnologia, através da complexação (inclusão hospedeiro-hóspede) dos mesmos em meios de veiculação de fármacos, como o lipossoma e a ciclodextrina, por exemplo (CAMPOS et al., 2019; DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS et al., 2013; TIEFENSEE RIBEIRO et al., 2019).

Apesar das limitações que podem ser apresentadas pelos terpenos puros, o (-)-ISO puro foi capaz de promover um efeito hipotensor significativo na dose 200 mg/kg. No entanto, a implementação de biotecnologia, como o uso de β -ciclodextrina, pode potencialmente melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e absorção do (-)-ISO, o que poderia permitir uma resposta hipotensora similar em doses menores, bem como promover algum efeito sobre a FC.

Esses resultados sugerem que o (-)-ISO tem potencial como agente anti-hipertensivo de longa duração, similar à nifedipina, um bloqueador dos canais para cálcio comumente usado no tratamento da hipertensão arterial. Portanto, o (-)-ISO pode representar uma alternativa interessante no tratamento da hipertensão.

5.3. *In vitro*:

A hipotensão induzida por monoterpenos é frequentemente justificada pela capacidade desses compostos de induzirem vasorrelaxamento. Para avaliar mais a fundo os mecanismos de ação envolvidos no efeito hipotensor induzido pelo (-)-ISO, procuramos investigar seus efeitos sobre a reatividade vascular, uma vez que é sabido que o tônus vascular é determinante para a regulação desse parâmetro. Para isso, buscamos elucidar seus efeitos diretos na artéria mesentérica superior, que por ser um vaso de menor calibre apresenta uma melhor representatividade da resistência vascular periférica (CHAUDHRY; MIAO; REHMAN, 2022).

A administração de doses crescentes e cumulativas de (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) foi capaz de promover relaxamento vascular, por via independente do endotélio ($E_{m\acute{a}x} = 87 \pm 8\%$, com endotélio, $n = 7$; *versus* $115 \pm 5\%$, sem endotélio, $n = 6$) (Figura 27). Este resultado sugere que o endotélio vascular pode não desempenhar um papel significativo na expressão desta resposta, indicando o envolvimento de uma via independente do endotélio vascular no vasorrelaxamento induzido pelo (-)-ISO.

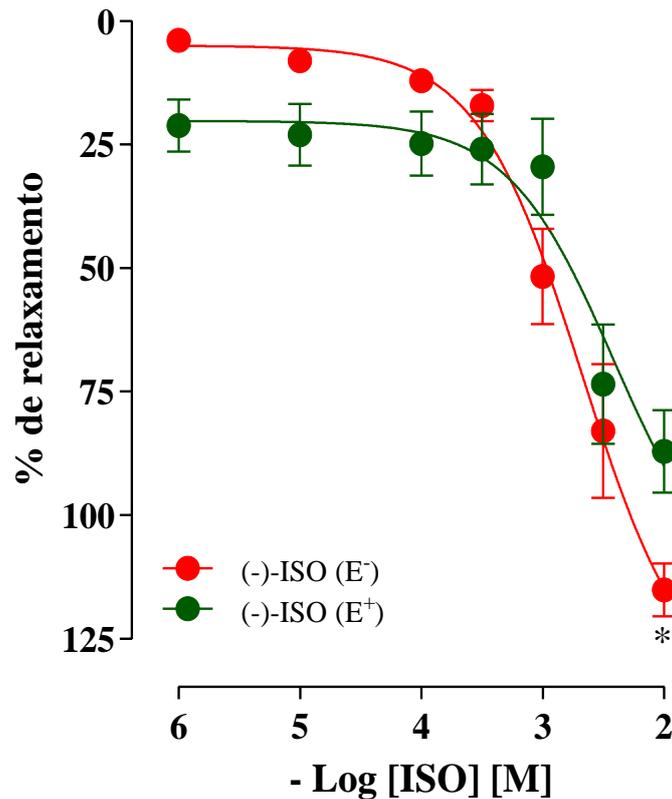


Figura 27 - Curvas concentração-resposta para (-)-ISO: (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos com endotélio funcional (E^+) ($n = 7$) e sem endotélio funcional (E^-) ($n = 6$) pré-contráido com FEN ($1\mu\text{M}$). Os valores foram expressos como média \pm sem. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

A literatura relata que, para diversos monoterpenos, o efeito de vasorrelaxamento está associado a mecanismos independentes do endotélio. Por exemplo, estudos anteriores demonstraram que o linalol, quando administrado em doses crescentes e cumulativas ($6,4 \times 10^{-6}$ - $6,4 \times 10^{-3}$), induziu relaxamento vascular dependente da concentração, sem diferença significativa quando em comparação com anéis vasculares sem endotélio funcional. A partir desses achados, os autores sugeriram que a redução da pressão arterial causada pelo linalol está relacionada a um efeito direto sobre o músculo liso vascular.

Apesar de o resultado *in vivo* demonstrar que o L-NAME bloqueou a hipotensão induzida pelo (-)-ISO na dose 10 mg/kg, indicando uma participação parcial do NO (figura 24). É notável que o achado *in vitro*, ilustrado na figura 27, reforça a concepção de que o NO não desempenha um papel significativo no efeito hipotensor induzido pelo (-)-ISO, uma vez que o NO é um fator endotelial, e o endotélio, de acordo com os resultados *in vitro* encontrados, não participa do vasorrelaxamento promovido pelo (-)-ISO.

Essa discordância entre experimentos *in vivo* e *in vitro* também foi observada no estudo de Moreira 2013 onde o pré-tratamento com L-NAME, bloqueou o efeito hipotensor do citral nas doses 5, 10 e 20 mg/kg/i.v, demonstrando a participação do NO. Em contrapartida, nos resultados *in vitro*, também realizados em anéis de artéria mesentérica, não houve diferença de relaxamento entre anéis com e sem endotélio funcional, demonstrando que os fatores derivados do endotélio não tinham participação no vasorrelaxamento induzido pelo citral.

É importante considerar que experimentos *in vivo* abrangem uma complexidade de mecanismos que podem biotransformar substâncias no organismo após a sua administração, resultando em efeitos que podem diferir dos observados em estudos *in vitro* (PEREIRA, 2007). Essa característica é fundamental para entender as divergências entre os resultados obtidos para o (-)-ISO nos estudos *in vivo* e *in vitro*.

Para entender como o (-)-ISO induziu vasorrelaxamento independente do endotélio, exploramos os mecanismos de relaxamento que envolvem vias de sinalização no músculo liso vascular. Investigamos a abertura de canais de potássio ou o bloqueio dos canais de cálcio como potenciais mediadores desse efeito vasorrelaxante. Essas vias de sinalização têm sido associadas ao relaxamento vascular e podem explicar os resultados observados para o (-)-ISO.

5.3.1. Avaliação da Participação dos Canais para Potássio (K^+) nas respostas induzidas pelo (-)-ISO:

Os canais para potássio (K^+), devido à sua influência sobre o potencial de membrana, são essenciais para a regulação do tônus vascular. O aumento na concentração intracelular de K^+ tende a despolarizar a membrana celular, tornando-a mais positiva. Isso pode levar à abertura dos canais para cálcio voltagem-dependentes, resultando na entrada de cálcio para o interior da célula que contribui para a vasoconstrição. Já a saída desses íons hiperpolariza a membrana celular, tornando-a mais negativa, contribuindo para o fechamento dos canais para cálcio e para a redução da concentração intracelular desse íon e promovendo consequentemente o vasorrelaxamento (DOGAN et al., 2019).

A despolarização com KCl 20 mM impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados pela abertura de canais para K^+ (CLARK; FUCHS, 1997). Diante disso, avaliamos a participação desses canais nas respostas induzidas pelo (-)-ISO. Como podemos observar na figura 28, não houve diferença no vasorrelaxamento induzido pelo (-)-ISO após a

despolarização com KCl 20 mM ($E_{\text{máx}} = 110 \pm 6\%$, (-)-ISO + KCl 20, $n = 6$; *versus* $115 \pm 5\%$, (-)-ISO), sugerindo a não participação desses canais.

No entanto, após o bloqueio dos canais para potássio com TEA (1 mM), (KHODAKHAH; MELISHCHUK; ARMSTRONG, 1997) curiosamente, a resposta vasorrelaxante promovida pelo o (-)-ISO foi significativamente potencializada ($E_{\text{máx}} = 188 \pm 24\%$, (-)-ISO+TEA, $n = 6$).

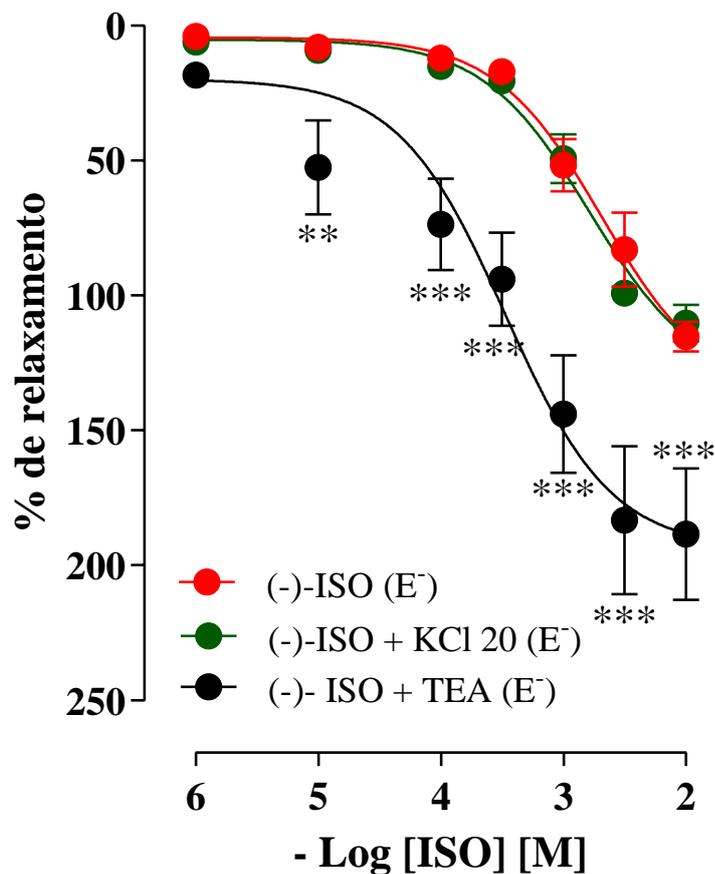


Figura 28 - Curvas concentração-resposta para (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolados de ratos sem endotélio funcional (E^-), pré-contraídos com FEN ($1\mu\text{M}$) antes ($n = 6$) e após incubação com TEA (1mM) ou KCl 20 mM ($n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm sem. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs (-)- ISO (E^-).

No estudo publicado por Silva-Filho et al., (2012), o monoterpene (-)-borneol (10^{-9} – 3×10^{-4} M) promoveu um efeito vasorrelaxante independente do endotélio em anéis de artéria aorta de ratos. Uma das vias associadas a esse efeito foi a ativação dos canais para potássio do tipo dependentes de voltagem (K_v) e sensíveis a ATP (K_{ATP}). Em outro estudo, os canais para potássio também demonstraram participar do efeito vasorrelaxante em anéis aórticos induzido por outro monoterpene, o *p*-cimeno (SILVA et al., 2015). Assim como a rotundifolona que também promoveu relaxamento em anéis de artéria mesentérica superior de ratos via ativação

dos canais para potássio ativados por cálcio de grande condutância (BKca) (SILVA et al., 2011).

Em contrapartida, em estudos como os realizados por Moreira et al. (2016) com o β -pineno, BASTOS et al. (2010) com o citronelol e ANJOS et al. (2013) com o linalol em anéis mesentéricos, foi observado que a pré-incubação com TEA 1 mM não eliminou o efeito vasorrelaxante induzido por esses monoterpênicos, indicando que esses canais não desempenham um papel relevante nessa resposta, de forma semelhante ao que foi observado para o (-)-ISO.

5.3.2. Avaliação da Participação dos Canais para Cálcio (Ca^{2+}) nas Respostas Induzidas pelo (-)-ISO:

A pré-contracção com a solução de KCl 80 mM promove a contracção do músculo liso vascular através da despolarização da membrana celular, que por sua vez ativa os canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), resultando em um influxo de cálcio e subsequente contracção muscular (KARAKI; WEISS, 1988). Sob essa condição, o vasorrelaxamento promovido pelo (-)ISO foi maior em anéis pré-contráídos com KCl 80 mM nas concentrações 3×10^{-4} ($E_{máx} = 17 \pm 3\%$, FEN, n = 6 vs $37 \pm 4\%$, KCl 80, n = 6), 10^{-3} ($E_{máx} = 51 \pm 9\%$, FEN, n = 6 vs $87 \pm 7\%$, KCl 80, n = 6) e 3×10^{-3} ($E_{máx} = 83 \pm 13\%$, FEN, n = 6 vs $113 \pm 2\%$, KCl 80, n = 6) (Figura 29).

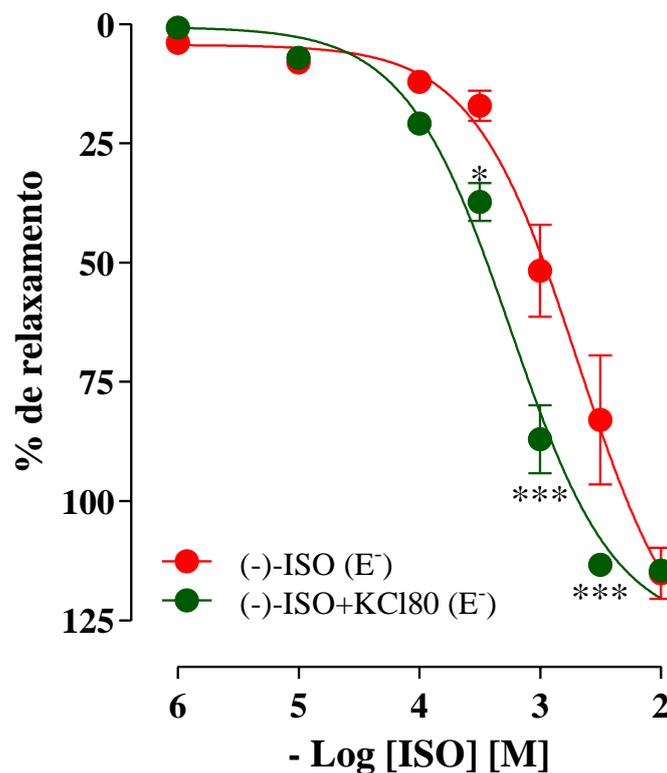


Figura 29 - Curvas concentração-resposta para o (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E⁻), pré-contraídos com FEN (1 μ M) (n = 6) e com KCl 80 mM (n = 6). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados estatísticos foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05; ***p < 0,001 (-)-ISO + KCl80 vs (-)-ISO (E⁻).

Com base nesses achados, podemos inferir que o (-)-ISO pode modular a atividade dos canais para cálcio (Cav), impedindo ou reduzindo a entrada de cálcio nas células musculares lisas vasculares e, como resultado, promover o relaxamento dessas células. Além disso, é crucial considerar que, embora a FEN promova contração por um mecanismo farmacomecânico e o KCl 80 mM por um mecanismo eletromecânico, ambos os agentes contráteis compartilham o cálcio como um mediador central desse processo. Esta convergência no mecanismo de contração sugere fortemente que o (-)-ISO pode estar agindo através do bloqueio do influxo desse íon.

Além disso, foram realizados protocolos com concentrações crescentes e cumulativas de CaCl₂. Após a pré-incubação com (-)-ISO nas concentrações 10^{-3} e 3×10^{-3} as contrações induzidas com CaCl₂ foram significativamente atenuadas, enquanto na de 10^{-2} essas contrações foram completamente abolidas ($E_{m\acute{a}x} = 101 \pm 0,7\%$, controle, n = 6 vs $46 \pm 6\%$, (-)-ISO 10^{-3} , n = 6 vs $27 \pm 3\%$, (-)-ISO 10^{-3} , n = 6 vs $2 \pm 1\%$, (-)-ISO 10^{-2} , n = 6) (Figura 30).

Esses resultados reforçam o pressuposto de que o (-)-ISO pode atuar como um bloqueador dos Cav, impedindo ou reduzindo a entrada de cálcio nas células musculares lisas, interferindo na capacidade do CaCl₂ de induzir contração.

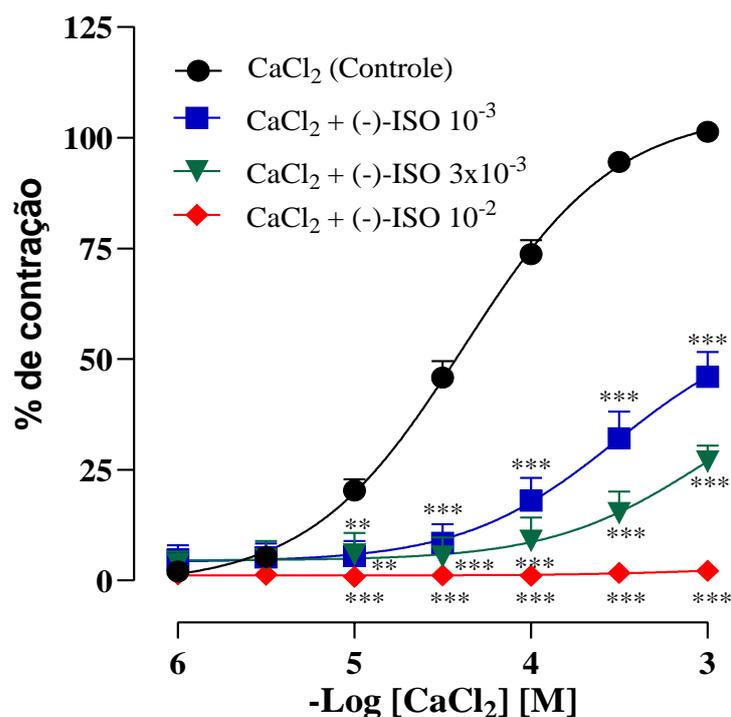


Figura 30 - Curvas concentração-resposta para o CaCl₂ (10⁻⁶ -10⁻³ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E-), antes (controle) (n = 6) e após a pré-incubação com (-)-ISO (10⁻³, 3x10⁻³ ou 10⁻² M; n = 5). Os valores foram expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. **p < 0,01; ***p < 0,001 vs controle.

Os canais para cálcio sensíveis à voltagem são responsáveis pelo influxo de cálcio nas células musculares lisas vasculares (CMLVs). Os canais CaV regulam a entrada de cálcio, promovendo a vasoconstrição. O principal canal para cálcio operado por voltagem encontrado no músculo liso vascular é o CaV 1.2. (HOFMANN et al., 2014).

Para confirmar a hipótese de que o (-)-ISO age por esses canais, foi realizada a pré-contracção com o S(-)-Bay-K 8644, um ativador seletivo dos canais para cálcio tipo L (HOFMANN et al., 2014). Nessa condição, o efeito vasorrelaxante do (-)-ISO foi potencializado ($E_{m\acute{a}x} = 236 \pm 51\%$, n = 5 vs $115 \pm 5\%$, FEN, n = 6) (Figura 31). Esse resultado, corrobora os obtidos anteriormente e sugere que esse efeito ocorre através da inibição das correntes de Ca⁺² de fontes extracelulares através dos canais para cálcio tipo L.

Outros monoterpenos também tem demonstrado capacidade de modular correntes de Ca²⁺. O carvacrol por exemplo, inibiu de maneira significativa as correntes de Ca²⁺ dependentes de voltagem em miócitos mesentéricos. Este efeito foi observado através da redução das

correntes iônicas medidas durante a despolarização da membrana celular, indicando uma ação direta do carvacrol sobre os canais para cálcio do tipo L (DANTAS et al., 2015).

Além disso, Filho, (2019) demonstrou em seu estudo, através da técnica “patch-clamp” que em cardiomiócitos ventriculares isolados os isômeros de isopulegol foram capazes de reduzir a corrente de Ca^{2+} tipo L e que o (-)-ISO foi mais eficaz em comparação com o (+)-ISO. Esse achado ajuda a fortalecer os resultados encontrados no presente estudo, no entanto, para confirmar de fato se o (-)-ISO inibe as correntes de Ca^{2+} em células musculares lisas vasculares, mais estudos precisam ser realizados.

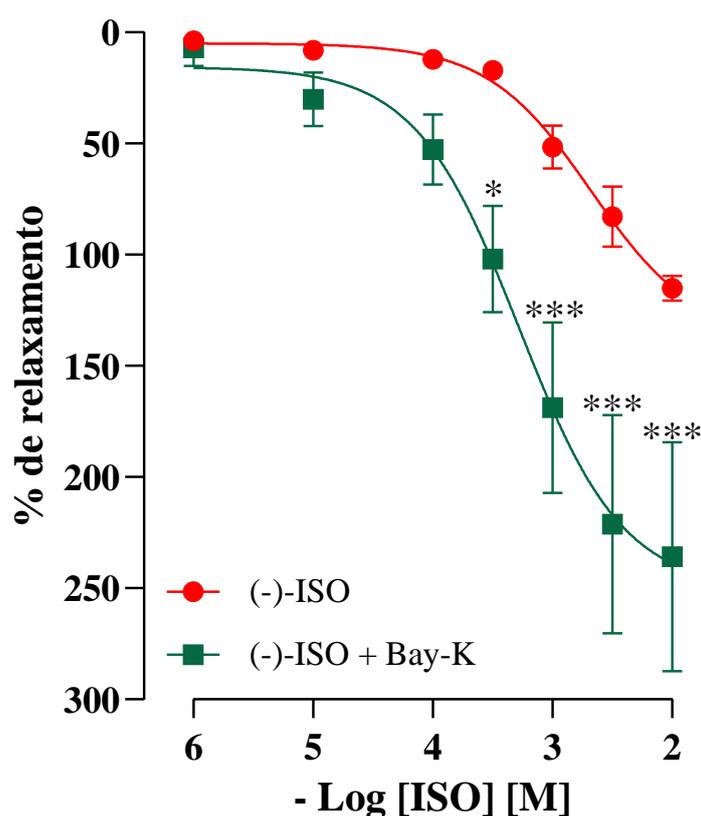


Figura 31 - Curvas concentração-resposta para o (-)-ISO (10^{-6} - 10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (E⁻), pré-contraídos com FEN ($1\mu\text{M}$) ($n = 6$) e com S(-)-Bay-K 8644 ($n = 5$). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (-)-ISO + S(-)-Bay-K 8644 vs (-)-ISO + FEN ($1\mu\text{M}$).

Esses resultados estão de acordo com os relatados para outros monoterpênicos. Tanto o (-)-borneol em anéis aórticos quanto o β -pineno em anéis mesentéricos foram capazes de promover vasorrelaxamento em anéis pré-contraídos com KCl 80 mM, semelhante ao efeito observado nas pré-contrações induzidas pela FEN. Além disso, esses monoterpênicos induziram uma inibição das contrações induzidas pelo CaCl_2 , bem como, relaxou anéis pré-contraídos com

S-(-) Bay-k 8644. De acordo com os autores, esses resultados indicam que esses monoterpenos promovem vasorrelaxamento devido a sua capacidade de bloquear os canais para cálcio do tipo L (MOREIRA et al., 2016a; SILVA-FILHO et al., 2012).

Apesar de compartilhar efeitos similares aos observados para outros monoterpenos, o (-)-ISO exibiu uma característica particularmente interessante. Nos protocolos com TEA (figura 28), KCl 80 mM (figura 29) e Bay-k (figura 31), condições em que a célula estava despolarizada, o efeito vasorrelaxante foi significativamente potencializado. Esse efeito sugere que o (-)-ISO pode ter um mecanismo de ação similar ao da nifedipina (NIF). Para fortalecer essa hipótese, foi realizado o docking molecular para prever a interação do (-)-ISO com a subunidade $\alpha 1C$ dos canais de cálcio do tipo L.

A afinidade de ligação prevista para NIF e (-)-ISO foi de -6,5 e -5,0 kcal/mol, respectivamente. O (-)-ISO apresentou quatro interações hidrofóbicas (Alkyl e Pi-Sigma) com Ile1058, Met1490, Leu1491 e Phe1494 (Figura 32). A análise de docking molecular foi validada com base no redocking da NIF no receptor de canal de Ca^{2+} tipo L dependente de voltagem de rato. As posições deste ligante e os resíduos de interação foram comparados com os obtidos para o (-)-ISO. As principais interações ocorreram entre o ligante e Phe1190, Phe1143, Tyr1489, Met1490 e Ala1493 através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Pi-Sigma, Pi-Enxofre e Pi-Pi-Stacked) (Figura 33). Da mesma forma, a interação entre (-)-ISO e o receptor do canal de Ca^{2+} tipo L dependente de voltagem de rato é estabilizada no mesmo sítio de ligação da NIF, por interações com quatro resíduos, um deles também interagindo com a NIF (Met1490).

(-)-Isopulegol – AF-P22002

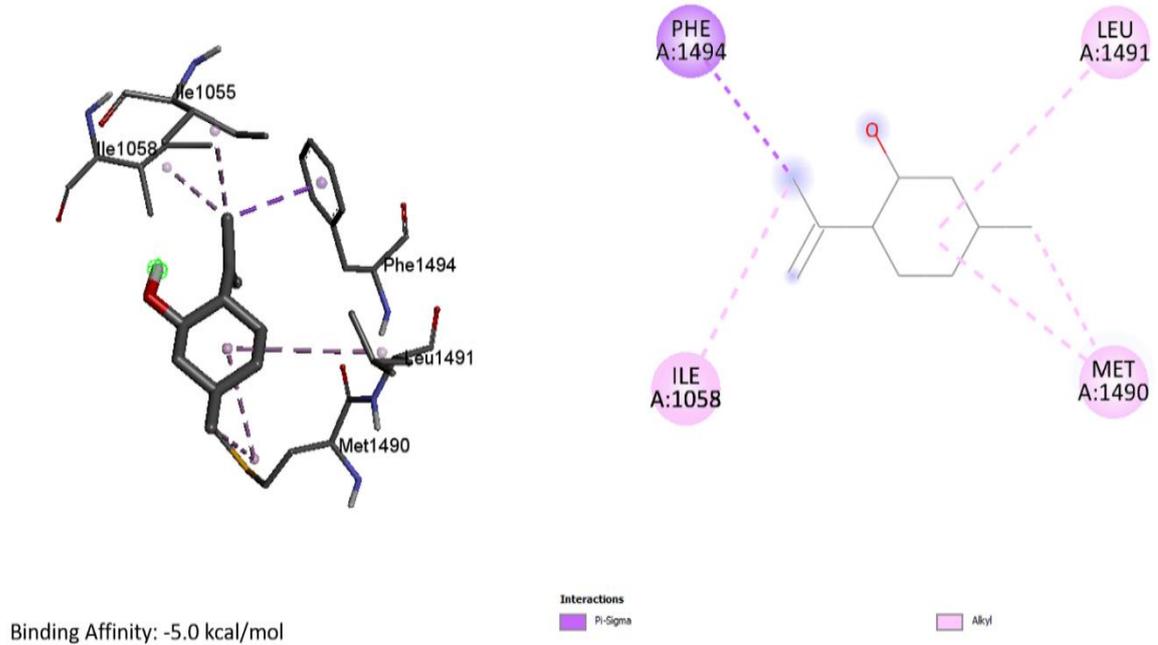


Figura 32 - A- Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de acoplamento entre (-)-Isopulegol e a subunidade alfa-1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem de *Rattus Norvegicus*.

Nifedipine – AF-P22002

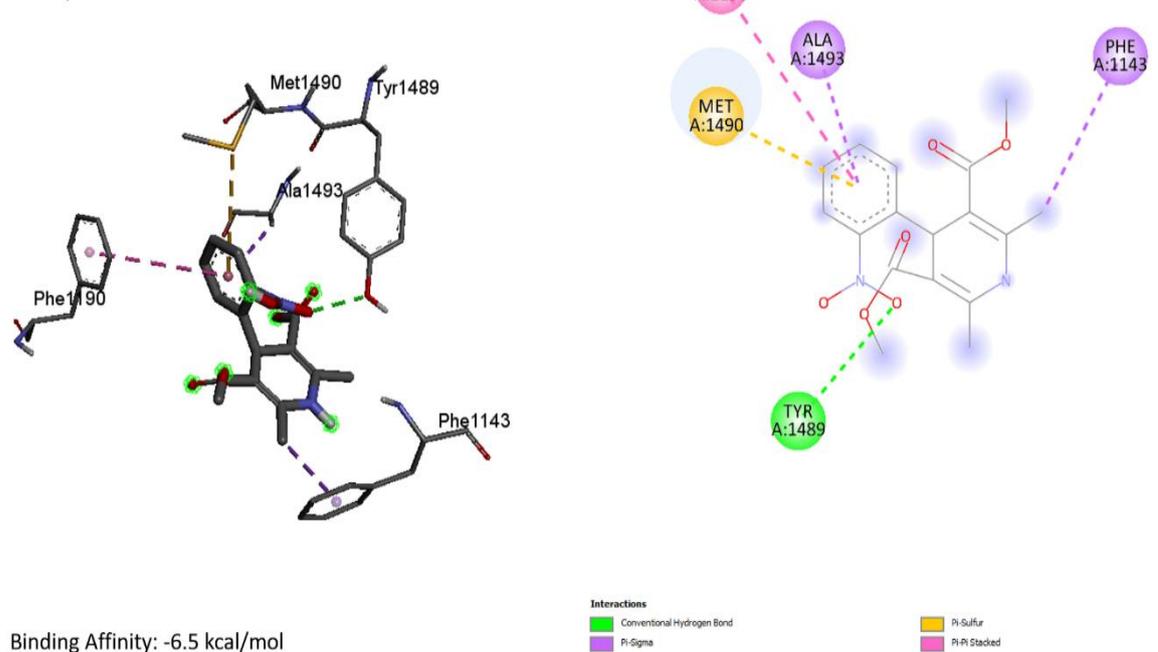


Figura 33 - Representação tridimensional e bidimensional das interações moleculares previstas na análise de acoplamento entre a nifedipina e a subunidade alfa-1C do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem de *Rattus Norvegicus*.

A NIF é um antagonista dos canais para cálcio tipo L dependente de voltagem da subclasse das dihidropiridinas (KHAN; PATEL; SCHAEFER, 2023). Os canais para cálcio tipo L são proteínas transmembranares compostas por várias subunidades. A subunidade α -1 é a principal e forma o poro pelo qual os íons cálcio entram na célula (STRIESSNIG et al., 2014). Quando a membrana celular se despolariza, os canais para cálcio do tipo L abrem, permitindo a entrada de íons cálcio no citoplasma da célula. Em um estado despolarizado, mais canais para cálcio estão abertos, proporcionando mais oportunidades para a NIF se ligar e bloquear esses canais, uma vez que seu sítio de ligação é dentro da subunidade α 1 (TIKHONOV; ZHOROV, 2009). Isso pode resultar em uma maior eficácia do bloqueio da entrada de cálcio, aumentando o efeito vasorrelaxante da NIF.

Portanto, com base nos dados experimentais e na análise de docking molecular, podemos inferir que o (-)-ISO exerce seu efeito vasorrelaxante através de um mecanismo similar ao da NIF, envolvendo o bloqueio dos canais para cálcio tipo L. Este achado abre novas perspectivas para o uso terapêutico do (-)-ISO em condições cardiovasculares que se beneficiam da vasodilatação mediada pela inibição dos canais para cálcio. Estudos adicionais são necessários para confirmar essas interações moleculares e explorar plenamente o potencial do (-)-ISO como um tratamento alternativo ou complementar na terapia cardiovascular.

Além de serem mediadas pelo influxo de cálcio extracelular, as respostas contráteis podem ser mediadas pela liberação de cálcio pelos receptores de IP_3 do retículo sarcoplasmático (HILL-EUBANKS et al., 2011). Diante disso, foi avaliada a participação desses receptores nas respostas induzidas pelo (-)-ISO na ausência de cálcio extracelular. Nesse contexto, foram identificadas contrações transientes originadas dos depósitos intracelulares, já que a entrada de cálcio na célula é essencial para a manutenção da fase tônica (WANG et al., 2002).

A ativação com um agonista leva a um breve aumento na quantidade de cálcio presente no citosol, isso acontece devido ao aumento na geração de IP_3 (PATEL; JOSEPH; THOMAS, 1999). A FEN é um agonista α 1 adrenérgico (RICHARDS; LOPEZ; MAANI, 2023) e embora atue principalmente através da ativação desses receptores, seu mecanismo de ação pode, indiretamente, resultar em um aumento na concentração de cálcio citosólico, por indução da produção de IP_3 e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (CAPEL et al., 2019). Dessa maneira, buscamos avaliar a participação dos receptores de IP_3 por meio dessa ferramenta farmacológica.

Como evidenciado pela figura 34, o (-)-ISO nas concentrações 10^{-3} , 3×10^{-3} e 10^{-2} M foram capazes de atenuar as contrações transientes induzidas por FEN ($1 \mu M$) ($Emax = 100\%$,

CON vs $69 \pm 6\%$, (-)-ISO 3×10^{-3} vs $1 \pm 0,4\%$, (-)-ISO 10^{-2}). Indicando a possibilidade da participação desses receptores nos efeitos promovidos pelo (-)-ISO.

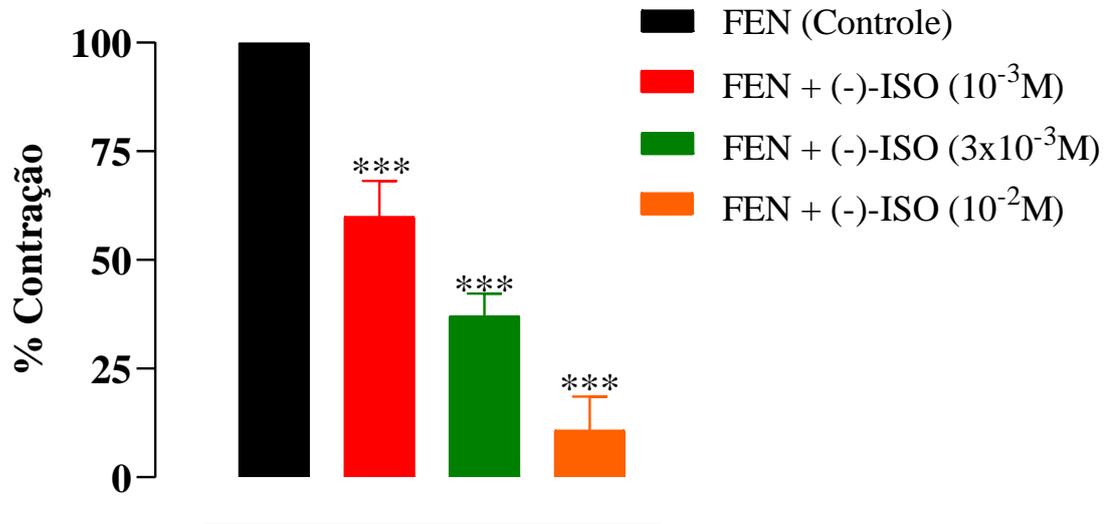


Figura 34 - Efeito das concentrações isoladas de (-)-ISO sobre as contrações transientes induzidas por FEN ($1 \mu\text{M}$), em anéis de artéria mesentérica em solução livre de Ca^{2+} sem endotélio funcional ($n = 5$). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs controle.

Os receptores de IP_3 parecem ter participação nas respostas vasorrelaxantes induzidas por outros monoterpêneos. O (-)-borneol (10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) (SILVA-FILHO et al., 2012), o citronelol ($6,4 \times 10^{-3}$ - $1,9$ M) (BASTOS et al., 2010) e o linalol ($6,4 \times 10^{-6}$ - $6,4 \times 10^{-3}$ M) (ANJOS et al., 2013) também foram capazes de promover a inibição das contrações transientes induzidas pela FEN.

5.3.3. Participação da Maquinaria Contrátil da Musculatura Lisa nas Respostas Induzidas pelo (-)-ISO:

No processo de contração do músculo liso, uma das vias de sinalização intracelular ativadas pelas proteínas G é a via RhoA, que ativa a Rho-quinase (ROCK) que fosforila diretamente a miosina fosfatase, uma enzima que normalmente remove grupos fosfato da miosina, levando à desativação da miosina. A fosforilação da miosina fosfatase pela ROCK inibe sua atividade, resultando na manutenção da miosina em seu estado fosforilado, o que permite a interação contínua com a actina e, assim, prolonga a contração muscular. A inibição da miosina fosfatase pela ROCK aumenta a sensibilidade das células musculares lisas ao cálcio, permitindo uma resposta contrátil mais eficiente mesmo em concentrações de cálcio relativamente baixas (FUKATA et al., 2001; KHALIL, 2010).

Para avaliar a participação do (-)-ISO nessa via, foram realizadas contrações com concentrações crescentes e cumulativas do ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), um inibidor de fosfatases que promove a contração através da inativação dependente de ROCK da fosfatase de cadeia leve da miosina (KIM et al., 2022; YAYAMA et al., 2014).

As contrações induzidas pelo Na_3VO_4 (10^{-5} - 10^{-2}) foram significativamente atenuadas pelas concentrações isoladas do (-)-ISO, especialmente, nos anéis pré-incubados com a concentração 10^{-2} M que foi capaz de abolir as contrações ($E_{\text{máx}} = 100\%$, Controle vs $99,8 \pm 8\%$, 10^{-3} ; $60 \pm 12\%$, 3×10^{-3} ; $2 \pm 1\%$, 10^{-2} , $n = 6$) (Figura 35).

Diante disso, é possível supor que o (-)-ISO pode interferir em uma ou mais etapas do processo de contração muscular mediado pelo Ca^{2+} , possivelmente inibindo o processo de sensibilização ao Ca^{2+} através da via RhoA/ROCK ou a ativação de vias de sinalização envolvidas na contração. Este efeito é semelhante ao observado com o monoterpene β -pineno em artéria mesentérica superior (MOREIRA et al., 2016).

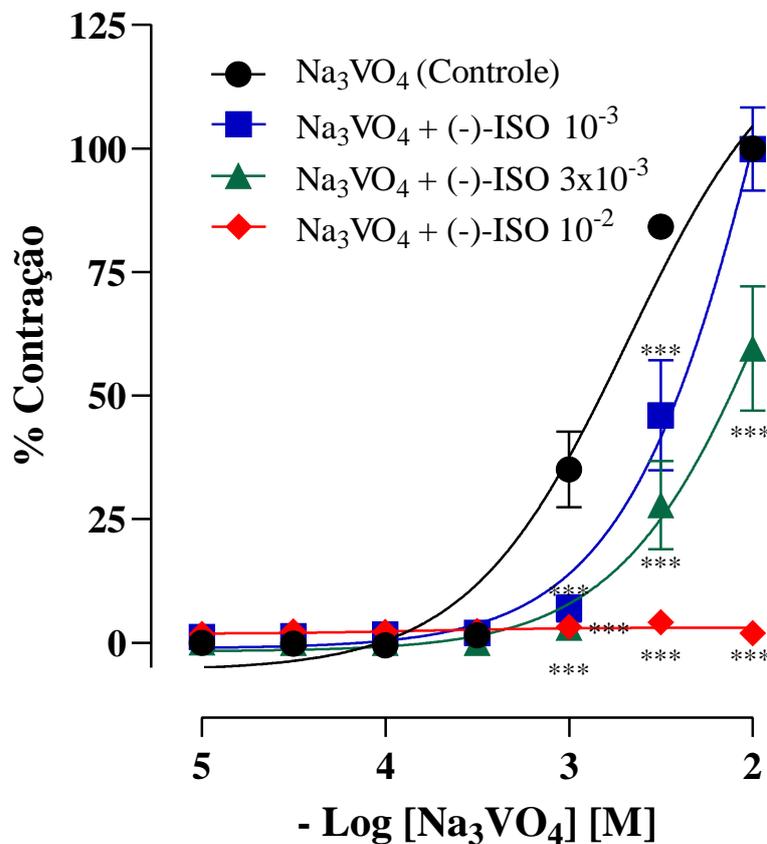


Figura 35 - Curvas concentração-resposta para o ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) (10^{-5} - 3×10^{-2}) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional antes (controle) ($n = 6$) e após a pré-incubação com (-)-ISO (10^{-3} , 3×10^{-3} ou 10^{-2} M) ($n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs controle.

6. CONCLUSÃO:

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que administração intravenosa de (-)-isopulegol induz efeitos hipotensores e bradicárdicos em animais normotensos, enquanto a administração oral demonstrou hipotensão e taquicardia em animais hipertensos. A bradicardia provocada pelo (-)-ISO provavelmente decorre da participação dos receptores nicotínicos. Por outro lado, o efeito hipotensor parece estar mais relacionado a vias independentes do endotélio, envolvendo a inibição dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo L e participação dos receptores IP_3 . Além da sensibilização da maquinaria contrátil na musculatura lisa vascular.

Dessa maneira, é evidente a necessidade da realização de estudos adicionais para maiores esclarecimentos em relação as vias de ação do (-)-ISO. Essa investigação pode levar ao desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o tratamento HAS, oferecendo novas perspectivas para abordagens terapêuticas dessa condição.

7. PERSPECTIVAS:

- Avaliar os efeitos do (-)-ISO sobre correntes de cálcio tipo L usando técnicas de patch-clamp;
- Avaliar a participação do sistema nervoso central na bradicardia induzida pelo (-)-ISO através de experimentos com tiopental sódico ou vagotomia bilateral;
- Avaliar o efeito do (-)-ISO sobre a condução elétrica do coração usando técnicas de ECG;
- Avaliar o perfil farmacocinético do (-)-ISO em modelo *in vivo*;
- Análise do barorreflexo e modulação autonômica;
- Utilização de biotecnologias como as β -ciclodextrinas para a redução da dose de (-)-ISO.

8. REFERÊNCIAS:

- ALBUQUERQUE, A. A. S. et al. In vitro reactivity (“organ chamber”) of guinea pig tracheal rings—methodology considerations. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 11, p. 216–216, 1 jun. 2016.
- ALQAHTANI, M. S. et al. Advances in Oral Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 618411, 19 fev. 2021.
- ALSHAK, M. N.; DAS, J. M. Neuroanatomy, Sympathetic Nervous System. **StatPearls**, 8 maio 2023.
- ALVES-LOPES, R.; NEVES, K. B.; TOUYZ, R. M. Muscarinic Receptor Type-3 in Hypertension and Cholinergic-Adrenergic Crosstalk: Genetic Insights and Potential for New Antihypertensive Targets. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 35, n. 5, p. 555, 1 maio 2019.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Understanding Blood Pressure Readings | American Heart Association**. Disponível em: <<https://www.heart.org/en/health-topics/high-blood-pressure/understanding-blood-pressure-readings>>. Acesso em: 9 mar. 2024.
- ANDRABI, S. M. et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. **Advanced Science**, v. 10, n. 30, p. 2303259, 1 out. 2023.
- ANDRADE, F. C. et al. **Antihypertensive Therapeutic Potential of Citronellal**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/271505439>>.
- ANDRADE PRÓSPERO, D. F. et al. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 293, p. 55–60, 25 set. 2018.
- ANJOS, P. J. C. et al. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 68 C, n. 5–6, p. 181–190, 1 jun. 2013.
- ARMSTRONG, M.; KERNDT, C. C.; MOORE, R. A. Physiology, Baroreceptors. **StatPearls**, 6 mar. 2023.
- ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP**, v. 13, n. 8 Suppl B, 2007.
- BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 23 abr. 2021.
- BASTOS, J. F. A. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331–337, abr. 2010.

- BHATIA, S. P. et al. Fragrance Material Review on isopulegol. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 11, n. 11 SUPPL., nov. 2008.
- BHATTI, M. Z. et al. Plant Secondary Metabolites: Therapeutic Potential and Pharmacological Properties. **Secondary Metabolites - Trends and Reviews**, 27 maio 2022.
- BOLTON, T. B. Rate of offset of action of slow-acting muscarinic antagonists is fast. **Nature** **1977** **270:5635**, v. 270, n. 5635, p. 354–356, 1977.
- BOUNIHI, A. et al. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Melissa officinalis L. Essential Oil. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, 2013.
- BROADLEY, K. J.; KELLY, D. R. Muscarinic receptor agonists and antagonists. **Molecules**, v. 6, n. 3, p. 142–193, 2001.
- BROZOVICH, F. V. et al. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 476, 1 abr. 2016.
- BULEANDRA, M. et al. Comparative Chemical Analysis of Mentha piperita and M. spicata and a Fast Assessment of Commercial Peppermint Teas. 2016.
- BYLUND, D. B. Acetylcholine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–3, 1 jan. 2007.
- CAMPOS, C. A. et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. **Life Sciences**, v. 229, p. 139–148, 15 jul. 2019.
- CAPEL, R. A. et al. cAMP signalling is required for the actions of IP3 on Ca²⁺-transients in cardiac atria and beating rate in sino-atrial node. **bioRxiv**, p. 694349, 24 jul. 2019.
- CAPILUPI, M. J.; KERATH, S. M.; BECKER, L. B. Vagus Nerve Stimulation and the Cardiovascular System. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2020.
- CARLSON, A. B.; KRAUS, G. P. Physiology, Cholinergic Receptors. **StatPearls**, 14 ago. 2023.
- CARVALHO, M. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Fortes ZB Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, 2001.
- CHACON, F. T. et al. Secondary Terpenes in Cannabis sativa L.: Synthesis and Synergy. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2022.
- CHAUDHRY, R.; MIAO, J. H.; REHMAN, A. Physiology, Cardiovascular. **StatPearls**, 16 out. 2022.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of Nitric Oxide and Ca-Dependent K Channels in Mediating Heterogeneous Microvascular Responses to Acetylcholine in Different Vascular Beds 1. 1997.

COSTA, H. A. et al. Effect of treatment with carvedilol and aerobic training on cardiovascular function in spontaneously hypertensive rats. **Experimental physiology**, v. 106, n. 4, p. 891–901, 1 abr. 2021.

DAFNI, A.; BÖCK, B. Medicinal plants of the Bible - revisited. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 27 nov. 2019.

DALLAKYAN, S., OLSON, A.J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. In: Hempel, J.E., Williams, C.H., Hong, C.C. (Eds.), *Chemical Biology, Methods in Molecular Biology*. **Springer New York**, New York, NY, pp. 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.

DANTAS, B. P. V. et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvedilol in normotensive rat. **Vascular Pharmacology**, v. 67–69, p. 48–58, 1 abr. 2015.

DE CARVALHO, M. H.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 304–312, abr. 2006.

DE MELO GHISI, G. L. et al. Exercício físico e disfunção endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 5, p. e130–e137, 2010.

DE MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 215–221, 19 mar. 2010.

DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS, J. et al. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436–440, 15 mar. 2013.

DEDKOVA, E. N.; BLATTER, L. A. Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells. **The Journal of Physiology**, v. 539, n. Pt 1, p. 77, 2 fev. 2002.

DEFILY, D. V.; NISHIKAWA, Y.; CHILIAN, W. M. Endothelin antagonists block α 1-adrenergic constriction of coronary arterioles. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 3 45-3, 1999.

DELONG, C.; SHARMA, S. Physiology, Peripheral Vascular Resistance. **StatPearls**, 1 maio 2023.

DESAI, A. N. High Blood Pressure. **JAMA**, v. 324, n. 12, p. 1254–1255, 22 set. 2020.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 209–228, 1 mar. 2001.

DESPOPOULOS, A.; SILBERNAGL, S. **Color Atlas of Physiology**. 5. ed. Stuttgart: Thieme, 2003.

DOGAN, M. F. et al. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 504–523, 1 out. 2019.

DOGAN, M. F. et al. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 504–523, 1 out. 2019.

DYLONG, D. et al. Synthesis of (–)-menthol: Industrial synthesis routes and recent development. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 37, n. 4, p. 195–209, 1 jul. 2022.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial Dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 1983–1992, 1 ago. 2004.

FELDER, C. C. et al. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 23, p. 4333–4353, 16 nov. 2000.

FILHO, J. Os isômeros do isopulegol bloqueiam canais para cálcio tipo-I e atenuam a hipertrofia cardíaca em rato: via PKA e ERK 1/2. 17 jun. 2019.

FORD, R. V. Pharmacology and clinical use of ganglionic blocking agents in the treatment of hypertension*. **The American Journal of Cardiology**, v. 9, n. 6, p. 860–862, 1 jun. 1962.

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

FOUNTAIN, J. H.; KAUR, J.; LAPPIN, S. L. Physiology, Renin Angiotensin System. **StatPearls**, 12 mar. 2023.

FUKATA, Y. et al. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 1, p. 32–39, 1 jan. 2001.

FURCHGOTT; ZAWADSKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance. **Federation Proceedings**, v. 40, n. 3 I, 1980.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105–113, 1 jul. 2004.

GASH, M. C. et al. Physiology, Muscle Contraction. **StatPearls**, 1 abr. 2023.

GHAFFAR, A. et al. Chemical Composition and in-Vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Seven Eucalyptus Species. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20487, 18 nov. 2015.

GUEDES, A. et al. Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods**, 2020.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.— **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017
 Editora Guanabara Koogan, 2002.

HAFEN, B. B.; BURNS, B. Physiology, Smooth Muscle. **StatPearls**, 14 ago. 2023.

HAQUE, A. N. M. A.; REMADEVI, R.; NAEBE, M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. **Cellulose**, v. 25, n. 10, p. 5455–5477, 1 out. 2018.

HARRISON, D. G.; COFFMAN, T. M.; WILCOX, C. S. Pathophysiology of Hypertension. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 847–863, 2 abr. 2021.

HILL-EUBANKS, D. C. et al. Calcium Signaling in Smooth Muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 9, p. 1–20, 2011.

HOFMANN, F. et al. L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 303–326, 1 jan. 2014.

HUSSEIN, R. A. et al. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. **Herbal Medicine**, 5 nov. 2018.

JAIN, K. K. An Overview of Drug Delivery Systems. **Methods in Molecular Biology**, v. 2059, p. 1–54, 2020.

JESPERSEN, B.; KNUPP, L.; NORTHCOTT, C. A. Femoral Arterial and Venous Catheterization for Blood Sampling, Drug Administration and Conscious Blood Pressure and Heart Rate Measurements. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2012.

KACZOROWSKI, G. J. et al. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 28, n. 3, p. 255–267, 1996.

KALAIVANI, K.; SANKARANARAYANAN, C. Modulatory effect of isopulegol on hepatic key enzymes of glucose metabolism in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 127, n. 4, p. 318–326, 2021.

KANG, B. et al. Protective Effect of Isopulegol in Alleviating Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Induced BV-2 Cells and in Parkinson Disease Model Induced with MPTP. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2021, n. 1, p. 1–10, 2021.

KANNAN, A.; JANARDHANAN, R. Hypertension as a risk factor for heart failure. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 7, 2014.

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life sciences**, v. 42, n. 2, p. 111–122, 1988.

KHALIL, R. A. Rho Kinase in Vascular Smooth Muscle. 2010.

KHAN, K. M.; PATEL, J. B.; SCHAEFER, T. J. Nifedipine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–6, 23 maio 2023.

KHODAKHAH, K.; MELISHCHUK, A.; ARMSTRONG, C. M. Killing K Channels with TEA+. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 13335, 11 nov. 1997.

KIM, H. G. et al. Phosphatase inhibition by sodium orthovanadate displays anti-inflammatory action by suppressing AKT-IKK β signaling in RAW264.7 cells. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 1883, 1 jan. 2022.

KIM, J.; JESUS, O. DE. Medication Routes of Administration. **StatPearls**, 23 ago. 2023.

KING, J.; LOWERY, D. R. Physiology, Cardiac Output. **StatPearls**, 17 jul. 2023.

KLEINZ, M. J.; SPENCE, I. The pharmacology of the autonomic nervous system. **Small Animal Clinical Pharmacology**, p. 59, 2008.

KLOC, M.; GHOBRIAL, R. M. Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success. **Burns & trauma**, v. 2, n. 1, p. 3–10, 1 jan. 2014.

KÜNG, C. F. et al. L-NAME Hypertension Alters Endothelial and Smooth Muscle Function in Rat Aorta. **Hypertension**, v. 26, n. 5, p. 744–751, 1995.

LANNER, J. T. et al. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 11, 2010.

LI, A. LE et al. Risk probability and influencing factors of stroke in followed-up hypertension patients. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2022.

LENAEUS, M. J. et al. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 5, p. 454–459, maio 2005.

LIMA MELRO, J. C. et al. Ethnobotanical study of Medicinal plants used by the population assisted by the “Programa de Saúde da Família” (Family Health Program) in Marechal Deodoro - AL, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 410–423, 2 set. 2019.

LIU, M. et al. Cardioprotective effects of alantolactone on isoproterenol-induced cardiac injury and cobalt chloride-induced cardiomyocyte injury. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 1–18, 3 jan. 2022.

MACEDO, F. N. et al. Increased Nitric Oxide Bioavailability and Decreased Sympathetic Modulation Are Involved in Vascular Adjustments Induced by Low-Intensity Resistance Training. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 210066, 28 jun. 2016.

MARINHO, Y. Y. M. et al. Preparation, physicochemical characterization, docking and antiarrhythmic effect of d-limonene and d-limonene hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 71, p. 103350, 1 maio 2022.

MASUO, K. Roles of beta2- and beta3-adrenoceptor polymorphisms in hypertension and metabolic syndrome. **International Journal of Hypertension**, v. 2010, 2010.

- MITCHELL, J. A. et al. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11693–11697, 15 dez. 1993.
- MONCADA, S. The Vascular Endothelium. **Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes**, p. 5–10, 1 jan. 2018.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. Suppl 1, p. S193, jan. 2006.
- MONTENEGRO, I. et al. Antifungal Activity of Essential Oil and Main Components from *Mentha pulegium* Growing Wild on the Chilean Central Coast. **Agronomy 2020, Vol. 10, Page 254**, v. 10, n. 2, p. 254, 10 fev. 2020.
- MOREIRA, I. et al. Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- β -pinene in β -cyclodextrin. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 837–845, 13 jun. 2016.
- MOSS, R. et al. Modeling effects of voltage dependent properties of the cardiac muscarinic receptor on human sinus node function. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 10, 1 out. 2018.
- NADEMANEE, K.; SINGH, B. N. Control of cardiac arrhythmias by calcium antagonism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 522, n. 1, p. 536–552, 1988.
- NASCIMENTO, G. A. et al. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 5, p. 925, 1 nov. 2019.
- NASRI, H.; BARADARAN, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 358, 2014.
- NOSAREV, A. V. et al. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, n. JAN, 7 jan. 2014.
- O'BOYLE, N.M., BANCK, M., JAMES, C.A. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* 3, 33 (2011). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- PARATI, G. et al. Current challenges for hypertension management: From better hypertension diagnosis to improved patients' adherence and blood pressure control. **International Journal of Cardiology**, v. 331, p. 262–269, 15 maio 2021.
- PATEL, S.; JOSEPH, S. K.; THOMAS, A. P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Cell Calcium**, v. 25, n. 3, p. 247–264, 1 mar. 1999.
- PAULIS, L. et al. Regression of L-NAME–Induced Hypertension: The Role of Nitric Oxide and Endothelium-Derived Constricting Factor. **Hypertension Research 2008 31:4**, v. 31, n. 4, p. 793–803, abr. 2008.

- PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, jan. 2007.
- PFEIFFER, S. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 6, p. 1433–1440, 1 jul. 1996.
- PROSPERO, D. F. A. et al. Isopulegol apresenta atividade antinociceptiva e outras ações farmacológicas importantes: Uma Revisão Integrativa / Isopulegol exhibits antinociceptive activity and other important pharmacological actions: An Integrative Review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4271–4280, 2 out. 2019.
- RAMOS, A. G. B. et al. Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods**, v. 9, n. 5, 1 maio 2020.
- RICHARDS, E.; LOPEZ, M. J.; MAANI, C. V. Phenylephrine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–5, 30 out. 2023.
- RIENZO, M. DI et al. Baroreflex contribution to blood pressure and heart rate oscillations: time scales, time-variant characteristics and nonlinearities. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 367, n. 1892, p. 1301, 4 abr. 2009.
- SAITO, Y. et al. Bay K 8644, a voltage-sensitive calcium channel agonist, facilitates secretion of atrial natriuretic polypeptide from isolated perfused rat hearts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 138, n. 3, p. 1170–1176, 14 ago. 1986.
- SANKARANARAYANAN, C.; KALAIVANI, K. Isopulegol Mitigates Hyperglycemia Mediated Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in HFD/STZ Induced Diabetic Rats. **Archives of medical research**, v. 51, n. 3, p. 204–214, 1 abr. 2020.
- SANTOS, M. R. V et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764–771, 2011.
- SATERNOS, H. C. et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. **Physiological genomics**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2018.
- SECOMB, T. W. Hemodynamics. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 975, 1 abr. 2016.
- SHAHOU, J. S.; SANVICTORES, T.; AEDDULA, N. R. Physiology, Arterial Pressure Regulation. **StatPearls**, 28 ago. 2023.
- SHAROPOV, F. et al. Cytotoxicity of the Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare*) from Tajikistan. **Foods**, v. 6, n. 9, 1 set. 2017.
- SILVA, D. F. et al. Rotundifolone-Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 6, p. 465–475, 1 dez. 2011.

- SILVA, E. A. P. et al. Monoterpenes and their derivatives as agents for cardiovascular disease management: A systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, v. 88, p. 153451, 15 jul. 2021.
- SILVA, M. I. G. et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 88, n. 2, p. 141–147, dez. 2007.
- SILVA, M. I. G. et al. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: Investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 3, p. 233–245, 29 set. 2009a.
- SILVA, M. I. G. et al. Effects of isopulegol on pentylentetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 506–513, 1 dez. 2009b.
- SILVA, M. T. M. et al. The vasorelaxant effect of p-cymene in rat aorta involves potassium channels. **TheScientificWorldJournal**, v. 2015, 15 jan. 2015.
- SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of Mechanisms Involved in (–)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171–177, 1 fev. 2012.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana**. 7^o edição ed. [s.l: s.n.].
- SMALL, K. M.; MCGRAW, D. W.; LIGGETT, S. B. Pharmacology and Physiology of Human Adrenergic Receptor polymorphisms. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135823>, v. 43, p. 381–411, 28 nov. 2003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiômetro**. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/>>. Acesso em: 3 dez. 2023.
- SOMMANO, S. R. et al. The Cannabis Terpenes. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **5792**, v. 25, n. 24, p. 5792, 8 dez. 2020.
- STRIESSNIG, J. et al. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Membrane Transport and Signaling**, v. 3, n. 2, p. 15, mar. 2014.
- TAKAHASHI, N. et al. [Toxicity studies of VP 16-213 (I)--Acute toxicity in mice, rats and rabbits]. **The Journal of toxicological sciences**, v. 11 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. 1–16, 1986.
- TALY, A. et al. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery** **2009** **8:9**, v. 8, n. 9, p. 733–750, 2009.
- TANAKA, Y. et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602–1608, 1 dez. 1999.
- TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, 31 jan. 2019.

TIEFENSEE RIBEIRO, C. et al. Oral administration of carvacrol/ β -cyclodextrin complex protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic denervation. **Neurochemistry international**, v. 126, p. 27–35, 1 jun. 2019.

TIKHONOV, D. B.; ZHOROV, B. S. Structural Model for Dihydropyridine Binding to L-type Calcium Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 28, p. 19006, 7 jul. 2009.

TINDLE, J.; TADI, P. Neuroanatomy, Parasympathetic Nervous System. **StatPearls**, 31 out. 2022.

TIWARI, P. et al. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 413, out. 2013.

TROTT, O., OLSON, A.J., 2009. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

TIWARI, P. et al. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 413, out. 2013.

ÚRGEOVÁ, E. et al. Antibacterial Potential of Microwave-Assisted Extraction Prepared Hydrolates from Different Salvia Species. **Plants**, v. 12, n. 6, 1 mar. 2023.

VARMA, A. K. et al. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

WANG, G. J. et al. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, n. 3, p. 239–245, 12 jun. 2002.

WAXENBAUM, J. A.; REDDY, V.; VARACALLO, M. Anatomy, Autonomic Nervous System. **StatPearls**, 24 jul. 2023.

WEBER, T. et al. Hypertension and coronary artery disease: epidemiology, physiology, effects of treatment, and recommendations : A joint scientific statement from the Austrian Society of Cardiology and the Austrian Society of Hypertension. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 128, n. 13–14, p. 467–479, 1 jul. 2016.

WESS, J. Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. **Life sciences**, v. 53, n. 19, p. 1447–1463, 1993.

WILLIAMS, M. A.; LADBURY, J. E. Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. **Protein-Ligand Interactions: From Molecular Recognition to Drug Design**, p. 137–161, 28 jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on hypertension: The race against a silent killer**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEART FEDERATION. World Heart Federation. **World Heart Report 2023: Confronting the World's Number One Killer**, p. 3–41, 2023.

YAYAMA, K. et al. Orthovanadate-induced vasocontraction is mediated by the activation of Rho-kinase through Src-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 2, n. 2, p. 39, 1 abr. 2014.

ZHANG, S. et al. Effects of Light on Secondary Metabolite Biosynthesis in Medicinal Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 2892, 10 dez. 2021.

ZHANG, Z. et al. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 10 jan. 2022.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 1 out. 2015.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, M.; FEDER-KUBIS, J. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–38, 1 out. 2020.

9. ANEXOS



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM (-)-ISOPULEGOL SOBRE A HEMODINÂMICA DE RATOS NORMOTENSOS", protocolada sob o CEUA nº 2521170223 (ID 000682), sob a responsabilidade de **André Sales Barreto e equipe; Izabel Rodrigues de Santana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 04/05/2023.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF ACUTE TREATMENT WITH (-)-ISOPULEGOL ON THE HEMODYNAMICS OF NORMOTENSIVE RATS", utilizing 36 Heterogenics rats (36 males), protocol number CEUA 2521170223 (ID 000682), under the responsibility of **André Sales Barreto and team; Izabel Rodrigues de Santana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 05/04/2023.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2023](#) a [07/2024](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [36](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia.

São Cristóvão, 22 de maio de 2023

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO (-) -ISOPULEGOL PURO E COMPLEXADO EM B-CICLODEXTRINA EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL", protocolada sob o CEUA nº 9546170223 (ID 000729), sob a responsabilidade de **André Sales Barreto e equipe; Izabel Rodrigues de Santana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 24/07/2023.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE SUBACUTE EFFECT OF (-) -ISOPULEGOL, PURE AND COMPLEXED ON B-CYCLODEXTRIN IN AN ANIMAL MODEL OF ARTERIAL HYPERTENSION", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 9546170223 (ID 000729), under the responsibility of **André Sales Barreto and team; Izabel Rodrigues de Santana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 07/24/2023.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2023](#) a [07/2024](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [24](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

São Cristóvão, 07 de março de 2024

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO (-)-ISOPULEGOL SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 1239150223 (ID 000692), sob a responsabilidade de **André Sales Barreto e equipe; Izabel Rodrigues de Santana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 19/05/2023.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF (-)-ISOPULEGOL ON REACTIVITY SUPERIOR MESENTERIC ARTERY VASCULAR OF RATS", utilizing 35 Heterogenics rats (35 males), protocol number CEUA 1239150223 (ID 000692), under the responsibility of **André Sales Barreto and team; Izabel Rodrigues de Santana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 05/19/2023.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2023](#) a [07/2024](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [35](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Sala de experimentação in vitro do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

São Cristóvão, 22 de maio de 2023

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

10. PUBLICAÇÕES E COLABORAÇÕES

Artigo Publicado:

DE OLIVEIRA RODRIGUES JUNIOR, E. et al. The effects of flavonoids in experimental sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy research: PTR*, v. 37, n. 6, p. 2531–2551, 1 jun. 2023.