



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

GABRIELLE SOBRINHO DOS REIS

**AÇÃO DO NEROLIDOL PURO E COMPLEXADO EM LIPOSSOMA SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

ARACAJU

2023

GABRIELLE SOBRINHO DOS REIS	AÇÃO DO NEROLIDOL PURO E COMPLEXADO EM LIPOSSOMA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL	2023

GABRIELLE SOBRINHO DOS REIS

**AÇÃO DO NEROLIDOL PURO E COMPLEXADO EM LIPOSSOMA SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

ARACAJU

2023

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

R375a Reis, Gabrielle Sobrinho dos
 Ação do nerolidol puro e complexado em lipossoma sobre o
 sistema cardiovascular em modelo animal de hipertensão arterial /
 Gabrielle Sobrinho dos Reis ; orientador André Sales Barreto. –
 Aracaju, 2023.
 93 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
 Federal de Sergipe, 2023.

 1. Ciências da saúde. 2. Hipertensão arterial. 3.
 Sesquiterpenos. 4. Biotecnologia. 5. Modelo animal. I. Barreto,
 André Sales, orient. II. Título.

CDU 616.12-008.331.1

GABRIELLE SOBRINHO DOS REIS

**AÇÃO DO NEROLIDOL PURO E COMPLEXADO EM LIPOSSOMA SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

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

Aprovada em: 26/07/2023

Documento assinado digitalmente
 **ANDRÉ SALES BARRETO**
Data: 01/08/2023 14:11:25-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. André Sales Barreto

Documento assinado digitalmente
 **MÁRCIO ROBERTO VIANA DOS SANTOS**
Data: 02/08/2023 09:13:55-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO CAVALCANTE DUARTE**
Data: 01/08/2023 14:13:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

2º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte

*Dedico esse mestrado a Deus e minha família,
que estiveram comigo a cada instante e multiplicaram
minhas forças para chegar até aqui. Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para chegar até aqui, Ele sempre esteve ao meu lado. E eu entreguei tudo em suas mãos. Se cheguei até aqui, foi graças a Ele;

À minha família, à minha mãe Diva, às minhas irmãs Diviane, Jociane e Regiane. Aos meus sobrinhos Isaque, Samuel, Israel e Jordana. E à minha sogra, Silvia. Que tornavam os dias mais leves e torceram por mim em cada passo dessa jornada. O amor de vocês foi o meu combustível;

Ao meu noivo, Luan, que me levou indeterminadas vezes na UFS, passou madrugadas fazendo experimentos comigo, me ajudou em diversas situações e compreendeu minha ausência. Você foi essencial nesse processo;

Ao meu pai (in memoriam), que sonhou com nosso futuro e que estaria feliz nesse momento;

Ao meu professor Marcos (in memoriam), que foi o primeiro a me dar uma oportunidade de pesquisa, e que sem dúvida irei fazer valer eternamente à pena;

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Sales Barreto, pela confiança, paciência e disponibilidade em me orientar durante esse trabalho;

Aos colegas e amigos do LAFAC, Lucas, Ivinne, Ed, Marcelli e Eric. Em especial a Izabel e Wesliane que foram meu braço direito e nunca me deixaram sozinha. Ganhei duas irmãs de alma que serei eternamente grata. Vocês fizeram cada segundo, cada dificuldade, cada conquista valer a pena. Eu não teria chegado até aqui sem vocês;

Ao meu amigo e professor de inglês José Neto, que esteve comigo desde do início do projeto e me ajudou em todas as etapas;

Aos parceiros do LEFT, Eloisa e Prof. Adriano que ajudaram a desenvolver o complexo;

Aos professores do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), por cada ensinamento compartilhado;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em estar presente na finalização dessa etapa tão importante;

E por último, mas não menos importante, aos animais que dedicaram suas vidas em prol da ciência.

REIS, G.S. Ação do Nerolidol puro e complexado em lipossoma sobre o sistema cardiovascular em modelo animal de hipertensão arterial, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, p.93. 2023.

RESUMO:

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs), as quais apresentam elevada taxa de morbimortalidade em todo o mundo. Estudos salientam que o uso de produtos naturais reflete positivamente no tratamento da HAS, dentre eles se encontram os terpenos, cujas propriedades terapêuticas possuem ação sobre o sistema cardiovascular. O nerolidol (NRD), é um sesquiterpeno que possui ação anti-inflamatória, antioxidante e cardioprotetora. Porém, devido a sua baixa solubilidade e alta volatilidade, é necessário a inclusão em uma formulação que aumente a biodisponibilidade e absorção por via oral. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares do NRD puro e complexado em lipossoma (NLIP) em modelo animal de hipertensão. Foram utilizados ratos Wistar machos (CEPA: 7471310521/3941310521) hipertensos (L-NAME, 20 mg/kg/dia, 7 dias). Medidas de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram realizadas antes e após administração intravenosa (i.v.) do NRD (1; 5; 10; 20 mg/kg) e, após administração oral (200 mg/kg; gavagem) do NRD ou NLIP. Após a realização do tratamento oral foram avaliados os efeitos hemodinâmicos por 48h. No tratamento intravenoso o NRD produziu resposta hipotensora em todas as doses ($-19,8 \pm 3,87$, $-25,5 \pm 3,08$, $-36,10 \pm 4,87$, e $-45,53 \pm 4,61$, $n = 7$) e bradicardia nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg ($-32,55 \pm 11,97$ e $-54,11 \pm 8,18$, $n = 7$). A hipotensão foi inibida pelos pré-tratamentos (10 mg/kg e 20 mg/kg) com atropina (ATR) ($-3,54 \pm 1,71$, $-9,31 \pm 6,14$, $n=5$), L-NAME ($-12,72 \pm 6,38$, e $-14,86 \pm 5,16$, $n = 7$), e indometacina (INDO) ($-19,36 \pm 4,56$ e $-20,43 \pm 6,11$, $n = 6$), já a bradicardia foi atenuada com ATR ($-0,83 \pm 0,30$ e $-1,57 \pm 1,51$, $n=6$), L-NAME ($-10,96 \pm 9,67$, e $-9,33 \pm 9,48$, $n=6$) e hexametônio (HEXA) ($-1,40 \pm 2,40$ e $-6,26 \pm 2,03$, $n=5$). No tratamento oral o NRD e o NLIP induziram respostas anti-hipertensivas, sendo as maiores respostas encontradas no tempo de 48h ($112 \pm 5,04\%$ mmHg) do NLIP; 0,5h e 1h ($137 \pm 4,47\%$ e $139 \pm 4,47\%$ mmHg, respectivamente) do NRD. Os resultados demonstram que o NRD induz a hipotensão com bradicardia pela via intravenosa e, quando administrado via oral em sua forma pura e complexada, apresentou um efeito anti-hipertensivo promissor.

Palavras-chaves: Hipertensão arterial; Sesquiterpeno; Nerolidol; Biotecnologia.

REIS, G.S. Action of pure and complexed nerolidol in liposome on the cardiovascular system in an animal model of arterial hypertension, Dissertation (Master in Health Sciences), - Graduate Program in Health Sciences (PPGCS), Federal University of Sergipe, Aracaju-SE, p.94. 2023.

ABSTRACT:

Systemic arterial hypertension (SAH) is one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases (CVDs), which have a high morbidity and mortality rate worldwide. Studies point out that the use of natural products reflects positively on the treatment of SAH, among which are terpenes, whose therapeutic properties have an effect on the cardiovascular system. Nerolidol (NRD) is a sesquiterpene that has anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective action. However, due to its low solubility and high volatility, it is necessary to include it in a formulation that increases oral bioavailability and absorption. The aim of this study was to evaluate the cardiovascular effects of pure and liposome-complexed NRD (NLIP) in an animal model of hypertension. Male Wistar rats (CEPA: 7471310521/3941310521) hypertensive (L-NAME, 20 mg/kg/day, 7 days) were used. Measurements of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were performed before and after intravenous (i.v.) administration of NRD (1; 5; 10; 20 mg/kg) and after oral administration (200 mg/kg; gavage) of the NRD or NLIP. After oral treatment, the hemodynamic effects were evaluated for 48h. In intravenous treatment, NRD produced a hypotensive response at all doses (-19.8 ± 3.87 , -25.5 ± 3.08 , -36.10 ± 4.87 , and -45.53 ± 4.61 , $n = 7$) and bradycardia at doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg (-32.55 ± 11.97 and -54.11 ± 8.18 , $n = 7$). Hypotension was inhibited by pretreatments (10 mg/kg and 20 mg/kg) with atropine (ATR) (-3.54 ± 1.71 , -9.31 ± 6.14 , $n=5$), L-NAME (-12.72 ± 6.38 , and -14.86 ± 5.16 , $n = 7$), and indomethacin (INDO) (-19.36 ± 4.56 and -20.43 ± 6.11 , $n = 6$), whereas bradycardia was attenuated with ATR (-0.83 ± 0.30 and -1.57 ± 1.51 , $n=6$), L-NAME (-10.96 ± 9.67 , and -9.33 ± 9.48 , $n=6$) and hexamethonium (HEXA) (-1.40 ± 2.40 and -6.26 ± 2.03 , $n=5$). In the oral treatment, NRD and NLIP induced antihypertensive responses, with the highest responses found within 48 hours ($112 \pm 5.04\%$ mmHg) of NLIP; 0.5h and 1h ($137 \pm 4.47\%$ and $139 \pm 4.47\%$ mmHg, respectively) of NRD. The results demonstrate that NRD induces hypotension with bradycardia intravenously and, when administered orally in its pure and complexed form, showed a promising antihypertensive effect.

Keywords: Arterial hypertension; Sesquiterpene; Nerolidol; Biotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Doenças cardiovasculares.....	4
2.2 Hipertensão arterial sistêmica	5
2.3 Endotélio vascular	7
2.4 Sistema Nervoso Autônomo	12
2.5 Plantas Medicinais e Terpenos	17
2.6 Nerolidol.....	19
2.7 Complexação em lipossoma	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Complexação do nerolidol em lipossoma.....	26
4.2 Caracterização físico-química das capsulas de lipossoma com NRD	26
4.3 Protocolo de indução da Hipertensão	27
4.4 Animais.....	28
4.5 Substâncias	28
4.6 Ensaios Farmacológicos in vivo	29
4.6.1 Categorização dos grupos	29
4.6.1.1 Tratamento agudo via intravenosa (i.v)	29
4.6.1.2 Tratamento subagudo via oral (v.o)	29
4.6.2 Preparação dos animais para medida dos dados hemodinâmicos	30
4.6.3 Coleta dos dados hemodinâmicos	31
4.7 Protocolos para elucidação do mecanismo de ação do NRD	31
4.8 Eutanásia.....	33

4.9 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Caracterização do complexo de nerolidol em lipossoma (NLIP)	34
5.2 Avaliação dos efeitos induzidos pela administração intravenosa (i.v.) aguda do nerolidol (NRD) sobre a PAM e FC em ratos hipertensos	37
5.3 Avaliação dos efeitos induzidos pela administração oral (v.o) do nerolidol puro e complexado em Lipossoma sobre a PAM e FC em ratos hipertensos	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
7 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Detalhe da parede arterial mostrando a túnica adventícia, média e a íntima (Fonte: smart.servier.com).....	8
Figura 2: Liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras derivadas do endotélio. Óxido nítrico (NO); prostaciclina (PGI ₂); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); espécie reativa de oxigênio (ROS); endotelina-1 (ET1); tromboxano-2 (TXA-2); prostaglandina (PGH ₂) (SANTANA, 2022).....	9
Figura 3: Isoformas de NOS (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).	10
Figura 4: Efeitos cardiovasculares do óxido nítrico (NO) (MILLER; MEGSON, 2007).	11
Figura 5: Síntese de óxido nítrico pela célula endotelial (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2011).	12
Figura 6: Sinalização da proteína G _q (receptores ímpares: M ₁ , M ₃ e M ₅) (Adaptado de GOLAN et al., 2009).....	15
Figura 7: Sinalização da proteína G _i (receptores pares: M ₂ e M ₄) (Adaptado de GOLAN et al., 2009).	16
Figura 8: Ativação dos receptores muscarínicos (M ₃) do endotélio (Adaptado de GOLAN et al., 2009).....	16
Figura 9: Estrutura química do NRD (mistura racêmica). Massa Molecular: 222.37 (SIGMA-ALDRICH, 2023).	19
Figura 10: Formação da molécula de lipossoma (NEVES et al., 2021).	22
Figura 11: Estrutura da molécula de lipossoma (Adaptado de HAMMOUD et al., 2020). ...	22
Figura 12: Classificação dos lipossomas em relação ao número de camadas: 1- Vesículas multilamelares (MLVs); 2- Vesículas unilamelares (ULVs); 2a- Vesículas unilamelares gigantes (GUV); 2b- Vesículas unilamelares pequenas; 2c- Vesículas multivesiculares (MVV) (NEVES et al., 2021).	23
Figura 13: Esquema representativo da preparação do lipossoma (Adaptado de NUNES et al., 2011).	26
Figura 14: Protocolo experimental (Adaptado de SILVA, 2018)	27
Figura 15: Ilustração do procedimento de cateterização da artéria e veia femorais em ratos (JESPERSEN; KNUPP; NORTHCOTT, 2012).....	30
Figura 16: Curva de calibração do NRD. O gráfico em questão relaciona área do pico com as concentrações analisadas (10, 30, 50, 100 e 150). O gráfico também apresenta a equação da	

reta, com o valor de coeficiente angular (R^2), quanto mais próximo de 1 melhor a reta descrita, como demonstrado na figura. 34

Figura 17: Gráfico da análise do potencial Zeta, demonstrando o teste de DLS. No eixo Y tem-se a intensidade de luz transmitida e no eixo X o tamanho da partícula em relação ao espalhamento da luz. Com 8% de intensidade, é atingido o pico de tamanho de partícula, entre 10-100 nm..... 35

Figura 18: Registro original exibindo as variações de pressão média (mmHg) em função do tempo (segundos), após administração aguda (i.v.) de doses randomizadas do NRD (1, 5, 10 e 20 mg/kg) em um rato hipertenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração das doses. 38

Figura 21: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos (n=7). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p = 0,05$; *** $p = 0,001$ vs controle veículo (CV). 40

Figura 22: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD, n=7) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos antes e após pré-tratamento com ATR (2mg/kg, i.v., n = 5). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle. 43

Figura 23: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD, n=7) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos após pré-tratamento com HEXA (20 mg/kg, i.v., n = 5) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ vs controle. 44

Figura 24: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=7) em ratos hipertensos após pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v., n = 6) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle 46

Figura 25: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=7) em ratos hipertensos após pré-tratamento com INDO (5 mg/kg, i.v., n = 6) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos

como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle. 48

Figura 26: Efeito do tratamento oral (via gavagem) do nerolidol puro (NRD) (200 mg/kg), nerolidol complexado em lipossoma (NLIP) (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 e 48 h após os tratamentos. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. § § $p < 0,01$ NRD vs NLIP; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ CV, NRD, NLIP vs CN; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ NRD, NLIP vs CV; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NLIP, NP vs CV; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ NLIP, CV vs CN. ... 50

Figura 27: Efeito do tratamento oral (via gavagem) do nerolidol puro (NRD) (200 mg/kg), nerolidol complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg), controle nifedipina (CN) (10 mg/kg) vs 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 e 48 h após os tratamentos. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ CN, NRD, NLIP vs CV. 51

Figura 28: Efeito do tratamento oral com NRD complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg, $n = 5$), controle veículo (CV) e controle nifedipina (CN) (10 mg/kg, $n = 5$) sobre a PAM de ratos hipertensos (L-NAME) após 48 h. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ NLIP, CN vs CV. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores do tamanho da partícula e o índice de polidispersão.	36
Tabela 2: Valores basais de PAM e FC em ratos hipertensos não anestesiados antes (controle; n = 8) e após administração aguda (i.v.) de atropina (2 mg/kg; n = 8), HEXA (20 mg/kg; n = 6), LNAME (20 mg/kg; n = 6) e INDO (5 mg/kg; n = 6).	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos.....	14
Quadro 2: Atividades biológicas do NRD sobre o sistema cardiovascular	20

ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Adenililciclase

ACh - Acetilcolina

AMPc – Segundo Mensageiro

Ang II - Angiotensina II

ATR – Atropina

AV - Atrioventricular

Ca²⁺ - Canais para Cálcio

Cav - Canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem

CEPA – Comitê de ética em pesquisa animal

CIUCA - Cadastro das instituições de uso científico de animais

CLs - Lipossomas convencionais

CN – Controle nifedipina

CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal

COX – Ciclooxigenase

CV – Controle veículo

DAG - Diacilglicerol

DC – Débito cardíaco

DCLS - Sistema droga-em-ciclodextrina-em-lipossomas

DCV – Doença cardiovascular

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DOX - Doxorrubicina

e.p.m. – Erro padrão da média

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF - Endothelial-derived relaxing factor

EE - Eficiência de encapsulação

ET 1 - Endotelina-1

FC – Frequência cardíaca

FC – Frequência Cardíaca

FCDE - Substâncias vasoconstritoras

FEN - Fenilefrina

FM - Fase móvel

FN - Farnesol

FRDE - Substâncias vasodilatadoras

GCs - Enzima guanilato ciclase solúvel

GDP - Subunidade GDP

GMPc - GMP cíclico

GTP - Subunidade GTP

GUV - Vesículas unilamelares gigantes

HAS – Hipertensão arterial cardíaca

HEXA – Hexametônio

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

i.v. – Intravenoso

IAM – Infarto agudo do miocárdio

ICLAS - International Council for Laboratory Animal Science

INDO – Indometacina

IP3 - Inositol trifosfato

ISO – Isoproterenol

K⁺ - Íons de potássio

KCL - Cloreto de Potássio

LAFAC – Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

LDH – Lactato desidrogenase

L-NAME – N G -nitro L-arginina metil éster

L-NOHA - N-hidroxi-Larginina

LQFMO32 - 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol

LR - Taxa de carregamento

MLVs - Vesículas multilamelares

mmHg – Milímetro de mercúrio

MVV - Vesículas multivesiculares

NA - Noradrenalina

Na⁺ - Íons de Sódio

NaCl – Hipoclorito de sódio

NF- κ B/MAPK - Fator de transcrição

NLIP – Nerolidol complexado em lipossoma

Nm - Receptor nicotínico neuromuscular
Nn - Receptor nicotínico neuronal
NO – Óxido nítrico
NOS - Enzimas óxido nítrico sintase
NPS - Nanopartículas lipídicas
NRD – Nerolidol
NR-LNPS - Nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com nerolidol
OA-MVLS - Lipossomas multivesiculares com o ácido oleanólico
OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde
PA – Pressão arterial
PAD – Pressão arterial diastólica
PAM – Pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PDI - Índice de polidispersão
PE - Cateter de polietileno
PGH2 - Prostaglandina
PGI2 - Prostaciclina
pH – Potencial hidrogeniônico
PIP2 - Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína cinase
PKG - Proteína quinase dependente de cGMP
PLC - Fosfolipase C
PXT - Paclitaxel
QRS, T – Ondas do eletrocardiograma
ROS - Espécie reativa de oxigênio
SNA – Sistema Nervoso Autônomo
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD – Superóxido dismutase
TXA2 - Tromboxana A2
ULVs - Vesículas unilamelares
v.o. – via oral

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares (DCVs) são responsáveis por aproximadamente 18,6 milhões de óbitos a cada ano, correspondendo a cerca de 31% das mortes em todo mundo e estima-se que em 2030 ocorrerão cerca de 23,6 milhões de mortes. Segundo a American Heart Association (2023) aproximadamente 85% dessas mortes são ocasionadas principalmente por doenças isquêmicas do coração, cerebrovasculares e hipertensão. Há mais de 20 anos as DCVs caracterizam um dos maiores desafios para a saúde pública, atingindo principalmente regiões de média e baixa renda. No Brasil, complicações cardiovasculares como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e hipertensão somaram um custo financeiro de 52,5 bilhões para o sistema de saúde no ano de 2015 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2023).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada pela elevação de forma sustentada da pressão arterial (PA), no qual os níveis pressóricos dispõem-se igualmente ou superior a 140/90 milímetros de mercúrio (mmHg). Ela é apontada como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversos problemas cardiovasculares e considerada um dos principais desafios para saúde pública (PEREIRA, 2016; JORDAN; KURSCHAT; REUTER, 2018; LOGANATHAN et al., 2019).

Atualmente existe uma gama de medicamentos que visam o tratamento da HAS, ainda assim, apesar dos grandes avanços trazidos por essas terapias tradicionais, as mesmas são acompanhadas de algumas limitações, como por exemplo, os efeitos colaterais, necessidade de associação de mais de um fármaco e consequente baixa adesão por parte da população. Já o tratamento não medicamentoso, se baseia na melhora de todos os fatores de risco modificáveis (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016; GALVÃO; SOARES, 2016; MENGUE et al., 2016).

As plantas foram os primeiros recursos terapêuticos a serem utilizados pela humanidade. Registros mostram relatos da utilização de plantas medicinais desde 2.600 a.C. Nos dias atuais a medicina popular tradicional ainda é muito utilizada a fim de tratar males que afetam a saúde humana. Além da forte utilização popular, os produtos naturais vêm sendo o foco de diversos estudos científicos, e têm demonstrado potenciais efeitos biológicos. Muitas dessas propriedades terapêuticas são provenientes dos chamados metabólitos secundários, como os

terpenos, que podem apresentar efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, cardiovasculares, entre outros (LIA; BRANDELLI, 2017; TSIOUFIS; THOMOPOULOS, 2017).

Os terpenos são metabólitos secundários e os principais componentes presentes nos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas. Eles são classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno (blocos de cinco carbonos- C_5) que possuem. Dentre a diversidade de ações terapêuticas, os terpenos possuem efeitos cardiovasculares, atuando, por exemplo, como anti-hipertensivos e cardioprotetores. Os sesquiterpenos são encontrados em óleo essencial de cravo, arnica-da serra, casca de laranja, gengibre, entre outros. Além disso, possuem propriedades biológicas importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos (FELIPE; BICAS, 2017; KIYAMA, 2017; PAULINO, 2019).

O nerolidol (NRD) ou peruvicol é um sesquiterpeno acíclico que pode ser encontrado nas folhas de diversas plantas. Além de ser muito utilizado pela indústria de cosméticos, produtos de limpeza e alimentícia, o NRD apresenta uma gama de efeitos bioativos: atividade antioxidante, antibacteriana, anti-biofilme, antifúngica, antiparasitária, antinoceptiva, anti-inflamatória, antitumoral, cardioprotetora, entre outros. Diante dessa versatilidade, o NRD pode ser um caminho promissor para o desenvolvimento de novas terapias (CHAN et al., 2016; ASAIKUMAR et al., 2019; GONÇALVES, 2020).

Embora o NRD possua diversos efeitos biológicos, durante o processo de extração de óleos essenciais há uma certa perda fazendo com que o volume final seja bem reduzido. Além disso, ele é lipossolúvel, o que acaba dificultando a absorção pelo organismo e consequentemente reduz o aproveitamento de suas propriedades bioativas. Para aumentar a biodisponibilidade dos princípios ativos dos óleos essenciais, sistemas de veiculação de fármacos como o lipossoma têm sido muito utilizados (LILA; ISHIDA, 2017; EL-HAMMADI; ARIAS, 2019; IQUBAL et al., 2019, GONÇALVES, 2020).

Os lipossomas são estruturas vesiculares de propriedade anfifílica formadas por fosfolipídios organizados em bicamadas lipídicas que atuam como um sistema de liberação de fármacos até seu sítio de ação. Dessa forma, através dessa biotecnologia é possível contornar propriedades limitantes do NRD, além de potencializar seus efeitos terapêuticos, reduzindo também possíveis efeitos colaterais (EL-HAMMADI; ARIAS, 2019; LAI; ROGACH, 2020).

O uso de biotecnologias como sistema de veiculação e transporte de fármacos, a exemplo do lipossoma, pode influenciar significativamente na melhora da biodisponibilidade dos

sesquiterpenos, desta forma, pode vir a favorecer a intensidade dos efeitos biológicos do NRD sobre o sistema cardiovascular, especialmente, na resposta anti-hipertensiva. Diante do exposto, através da incorporação do sesquiterpeno NRD em lipossoma, o estudo visa contribuir com uma nova estratégia e abordagem terapêutica para redução dos impactos causados pela HAS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças cardiovasculares

O sistema cardiovascular é composto pelo coração, vasos sanguíneos e sangue, e a capacidade de fornecer e manter o fluxo sanguíneo é considerada sua função primordial. A homeostase proveniente do bombeamento deste sangue e sua passagem pelo lúmen dos vasos sanguíneos resulta na manutenção da pressão arterial (PA). Em condições normais, a PA deve se manter em uma determinada faixa de variação, permitindo a adequada perfusão dos órgãos e tecidos. No decorrer da vida, possíveis fatores podem vir a alterar o equilíbrio do sistema cardiovascular, levando assim, ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs) (KRIEGER; IRIGOYEN; KRIEGER, 1999; SANTANA et al., 2019; DANTAS; RONCALLI, 2019).

As DCVs são consideradas uma das principais causas de mortes a nível mundial. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2022), cerca de 14 milhões de indivíduos possuem alguma doença cardiovascular e, pelo menos, 400 mil mortes ocorrem a cada ano em decorrência das DCVs, isso corresponde a cerca de 30% dos óbitos no país. As DCVs estão relacionadas ao sistema circulatório e coração e, de acordo com a American Heart Association (2023) as principais são: doenças da artéria coronária, cerebrovascular, arterial periférica, cardíaca congênita, cardiopatia reumática e hipertensão arterial. As DCVs possuem por vezes uma progressão lenta, que pode provocar efeitos a longo prazo. E embora com o passar dos anos tenha havido avanços na medicina, estimativas demonstram que a prevalência das mesmas tende a aumentar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2023).

Há muitos anos as DCVs geram impactos sociais e na saúde, por se tratar de causas multifatoriais, com progressão lenta, diagnóstico tardio, que muitas vezes necessitam de tratamentos a longo prazo e até mesmo internações em casos graves, tendem a demandar recursos financeiros significativos. E estão intimamente relacionadas às regiões de média e baixa renda, onde os indivíduos estão frequentemente expostos aos fatores de risco e possuem menor acesso aos serviços de saúde, gerando assim, um grande desafio para a saúde pública. No Brasil, complicações cardiovasculares como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e hipertensão somaram um custo financeiro de 52,5 bilhões para o sistema de saúde no ano de

2015 (MENGUE et al., 2016; HERING; TRZEBSKI; NARKIEWICZ, 2017; NOONE et al., 2018; LOBO et al., 2017; KARUNATHILAKE; GANEGODA, 2018; MENSAH; ROTH; FUSTER, 2019; ZHANG et al., 2020; BARROSO et al., 2021; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2023).

A incidência das DCVs tem aumentado consideravelmente com o envelhecimento e crescimento populacional, isso pode ser observado ao comparar as taxas de mortalidade e morbidade de DCVs com a idade dos portadores. Nota-se que a prevalência de DCVs é maior em pessoas com idade superior a 65 anos, e especialmente naquelas que possuem mais de 80 anos. Se relacionam a isso os demais fatores de risco como hipertensão, diabetes mellitus, idade, genética, sexo, obesidade, entre outros (GALVÃO; SOARES, 2016; ALVES-SILVA et al., 2016; LOBO et al., 2017; PANENI et al., 2017; HONG; SHAN, 2020; BARROSO et al., 2021).

2.2 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, que se caracteriza pelo nível elevado e sustentado da pressão arterial (PA), onde os níveis pressóricos são encontrados acima de 140 milímetros de mercúrio (mmHg) e de 90 mmHg, da pressão sistólica (PAS) e diastólica (PAD), respectivamente. Para a pressão arterial ser considerada no seu limite de normalidade é levado em conta valores sistólicos entre 130-139mmHg e diastólicos entre 85-89mmHg. Enquanto que para se ter uma pressão arterial considerada ótima, os valores devem ser inferiores a 120mmHg na sistólica e 80mmHg na diastólica (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2023). Por se tratar de uma condição frequentemente assintomática, a elevação prolongada da PA tende a evoluir com alterações funcionais e estruturais em órgãos-alvo, como coração, vasos sanguíneos, cérebro e rins, que pode gerar danos na estrutura do miocárdio, vasculatura coronária, e no sistema de condução elétrica, provocando um aumento no risco da ocorrência de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SOUSA et al., 2016; AL-MALLAH; SAKR; AL-QUNAIBET, 2018; CAREY et al., 2018; GIROTTO; SILVA; CARAMASCHI, 2018; BURNIER, 2019; HUA et al., 2019; BARROSO et al., 2021).

Em indivíduos normotensos em repouso, a PAS deve ser menor que 140 mmHg e a PAD menor que 90 mmHg (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2016). A PAS refere-se a pressão arterial máxima, é caracterizada como o valor medido no momento da sístole

ventricular (ventrículo esquerdo contrai e bombeia o sangue). A PAD corresponde à pressão arterial mínima (ventrículo esquerdo relaxa) (MCARDLE et al., 2016).

A pressão sanguínea é considerada dependente de cinco fatores hemodinâmicos: débito cardíaco (DC) e energia da contração ventricular; quantidade de sangue circulante (volemia); qualidade do sangue e viscosidade sanguínea; elasticidade das artérias (resistência central); tonicidade e permeabilidade das arteríolas pré-capilares (resistência periférica). Desta forma, a regulação da pressão sanguínea é considerada um processo que envolve a integração de múltiplos sistemas de regulação do tônus vascular, como por exemplo: o barorreflexo, as vias hormonais, renais, vasculares, sistemas reguladores e a regulação intrínseca exercida por mecanismos locais dentro do um tecido. Todos esses mecanismos influem no débito cardíaco e na resistência vascular periférica, que são considerados os principais parâmetros responsáveis pelo equilíbrio da pressão arterial sistêmica (ARAUJO; ACURI; ABRAMS, 1988; SCHER, 1989).

No Brasil estima-se a existência de aproximadamente 30 milhões de hipertensos, sendo que 30% corresponde à população adulta e 60% a indivíduos com idade superior a 60 anos. A HAS trata-se de uma condição clínica tratável, que ao ser controlada pode evitar ou retardar o aparecimento de outras DCVs. Todavia, existem diversos fatores de risco modificáveis ou não, que predis põem o desenvolvimento da HAS, bem como, das demais DCVs. Os fatores modificáveis referem-se ao sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, obesidade, exposição crônica ao estresse, maus hábitos alimentares, ambiente, medicamentos, estilo de vida e renda. Já os fatores não modificáveis referem-se à idade, sexo, raça e predisposição genética. Compreender tais fatores e suas interações permite melhores abordagens (ALVES-SILVA et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2017; AHUJA; SHARMA; MOHAN, 2017; KARUNATHILAKE; GANEGODA, 2018; LUCENA; GUEDES, 2020).

Os tratamentos para HAS que visam a redução da PA, são considerados meios bem estabelecidos para prevenção de DCVs. De forma que uma diminuição de 10mmHg na PAS e PAD reduz em cerca de 20% as chances de eventos cardiovasculares, e em 13% de mortalidade por todas as causas decorrentes. Devendo sempre ter como objetivo primordial a redução da morbidade e mortalidade por DCVs (TSIOUFIS; THOMOPOULOS, 2017; OMBONI; VOLPE, 2018; VÁZQUEZ-NARVAÉZ; ULIBARRI-VIDALES, 2019; LOGANATHAN et al., 2019;).

O tratamento anti-hipertensivo com medicamentos consiste na utilização de diversas terapias farmacológicas, sendo as principais classes: os diuréticos, bloqueadores dos receptores de angiotensina II, betabloqueadores, bloqueadores dos canais para cálcio e inibidores da enzima conversora da angiotensina. Quanto ao tratamento não medicamentoso, ele é baseado na mudança do estilo de vida, que envolve de forma ativa a melhora de todos os fatores de risco modificáveis (ALVES-SILVA et al., 2016; MENGUE et al., 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Embora as terapias tradicionais sejam importantes, ainda existem limitações, como necessidade de terapia combinada com mais de um fármaco, efeitos incompletos, efeitos colaterais e baixa adesão da população. Sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias, principalmente advindas de plantas medicinais, que busquem a regulação dos fatores responsáveis pela homeostase cardiovascular, a exemplo do endotélio vascular e do sistema nervoso autônomo (WERMELT; SCHUNKERT, 2017; CHOY; MURUGAN; MUSTAFA, 2018; GEWEHR et al., 2018; JORDAN; KURSCHAT; REUTER, 2018; KARUNATHILAKE; GANEGODA, 2018).

2.3 Endotélio vascular

A estrutura anatômica dos vasos sanguíneos apresenta-se em forma de tubo e com uma disposição celular em sua circunferência, essa disposição permite que a luz do vaso reduza no momento da contração muscular. Dessa forma, a musculatura dos vasos consegue se manter contraída por longos períodos com um baixo consumo energético, sendo esse fator fundamental para funções vasculares básicas, permitindo assim, o controle da pressão arterial. Os vasos sanguíneos podem ser divididos anatomicamente em três camadas (**Figura 1**): adventícia, média e íntima. A camada adventícia é a mais externa (composta por um tecido conjuntivo denso e componentes celulares). A camada média é considerada a mais espessa (composta em grande parte por tecido muscular, elastina e colágeno). A camada íntima é a mais interna (constituída por uma única camada de células e responsável pelo contato direto com o fluxo sanguíneo) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; RODRIGUES, 2010).

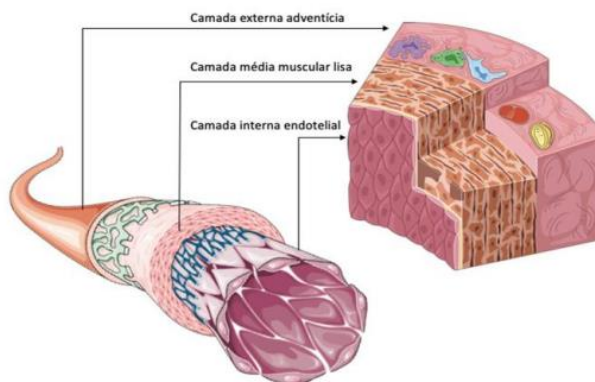


Figura 1: Detalhe da parede arterial mostrando a túnica adventícia, média e a íntima (Fonte: smart.servier.com).

Em condições fisiológicas normais, o endotélio exerce função protetora que é fundamental para a manutenção da homeostasia corporal e prevenção contra o desenvolvimento de lesões vasculares, como a atividade anticoagulante, vasodilatadora e anti-inflamatória. O controle do tônus da musculatura lisa vascular ocorre pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição (**Figura 2**). Dentre os principais fatores relaxantes (vasodilatadores) derivados do endotélio se encontram: o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂). Os principais fatores contráteis (vasoconstritores) são: a prostaglandina H₂ (PGH₂), a tromboxana A₂ (TXA₂), a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) e os ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio (ROS). A regulação do tônus vascular pelo endotélio irá ocorrer através da liberação de substâncias vasoconstritoras (FCDE) e vasodilatadoras (FRDE), e o ideal é que exista um equilíbrio preciso entre a liberação desses fatores. No entanto, em algumas doenças cardiovasculares, entre elas a HAS, esse equilíbrio é alterado através da presença da atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio, o que influi no relaxamento vascular e gera uma disfunção endotelial (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; CARVALHO et al., 2001).

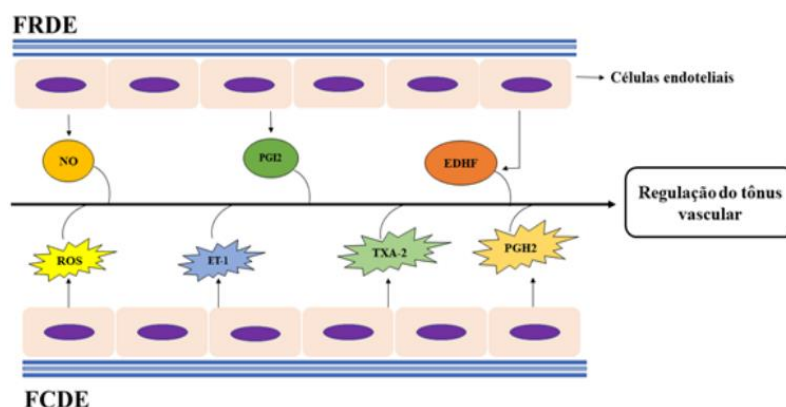


Figura 2: Liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras derivadas do endotélio. Óxido nítrico (NO); prostaciclina (PGI₂); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); espécie reativa de oxigênio (ROS); endotelina-1 (ET1); tromboxano-2 (TXA-2); prostaglandina (PGH₂) (SANTANA, 2022).

Os mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial provocada na hipertensão arterial são considerados multifatoriais, de forma que dependem do tipo de hipertensão desenvolvida, da duração e do leito vascular estudado. Entre os possíveis fatores envolvidos se encontram: aumento da liberação dos fatores contráteis derivados do endotélio, como a PGH₂ e angiotensina II; diminuição da responsividade das células musculares lisas ao NO; diminuição na expressão da atividade da guanilil ciclase solúvel e da liberação do EDHF. Assim sendo, observa-se que o endotélio possui um papel central na HAS, sendo responsável por controlar a permeabilidade vascular, adesão leucocitária, proliferação de células musculares lisas, coagulação e o equilíbrio entre os fatores endoteliais (IGNARRO, 1987; FURCHGOTT, 1988; CARVALHO et al., 2001; SANDOO et al., 2010).

O NO é uma molécula capaz de difundir livremente nas membranas celulares e responsável pela regulação de diversos processos endógenos fisiopatológicos (**Figura 2**). Inicialmente, Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram que as células endoteliais respondiam aos agentes vasodilatadores e produziam um fator relaxante derivado do endotélio, tendo como principal bioativo o NO. Foi observado que o processo de contração ocorria somente após a retirada da camada endotelial (**Figura 1**). Ao preservar essa camada e colocar em contato com acetilcolina ou carbacol ocorria um relaxamento, sugerindo assim que a acetilcolina liberava uma substância inibitória denominada endothelial-derived relaxing factor (EDRF), e

posteriormente chamada de NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; TAYLOR et al., 1988; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999; RANG et al., 2011).

A síntese do NO ocorre a partir do aminoácido L-arginina, através de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas de NOS foram identificadas (**Figura 3**): neuronal (nNOS/1NOS), encontrada no sistema nervoso e em outros tecidos; endotelial (eNOS/3NOS), produzida nas células endoteliais; e induzível (iNOS/2NOS), que pode ser encontrada em processos celulares anormais. A iNOS é considerada constitutiva, já a eNOS e a nNOS são ativadas através do aumento da concentração de cálcio dentro da célula proveniente do complexo cálcio-calmodulina. A síntese do NO ocorre em duas etapas de uma reação: 1) N-hidroxilação de um grupo guanidino da L-arginina, formando a N-hidroxi-L-arginina (L-NOHA); 2) a L-NOHA é metabolizada em L-citrulina e NO (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

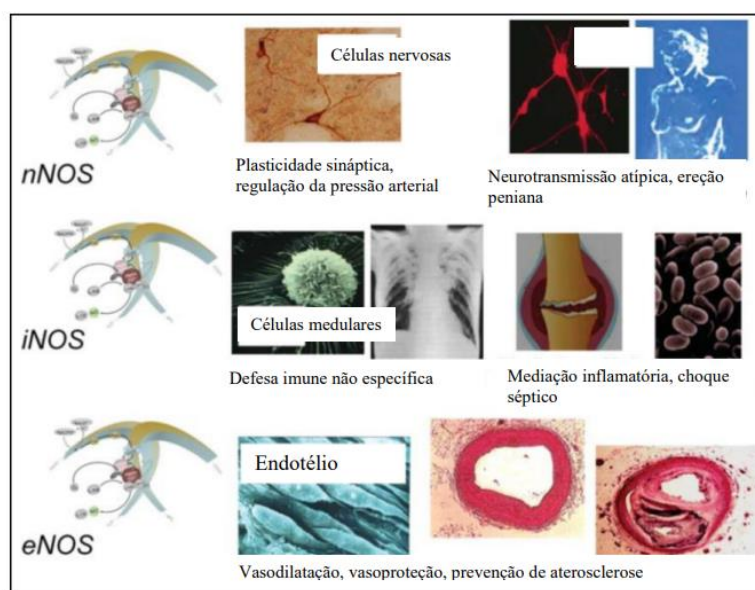


Figura 3: Isoformas de NOS (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Desta forma, o NO desempenha um papel importante na regulação do tônus vascular e da homeostasia cardiovascular (**Figura 4**), o que pode ser observado através do fato que a inibição da NO sintase (NOS) diminui a vasodilatação dependente de endotélio, principalmente nos vasos de condutância e, a administração aguda de inibidores da NOS pode produzir vasoconstrição, enquanto o tratamento crônico de ratos com esses compostos induz hipertensão arterial (PEPINE, 2009; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; BIELLI et al., 2015; SU, 2015; RAMESHRAD et al., 2016; GARCIA; SESSA, 2018).

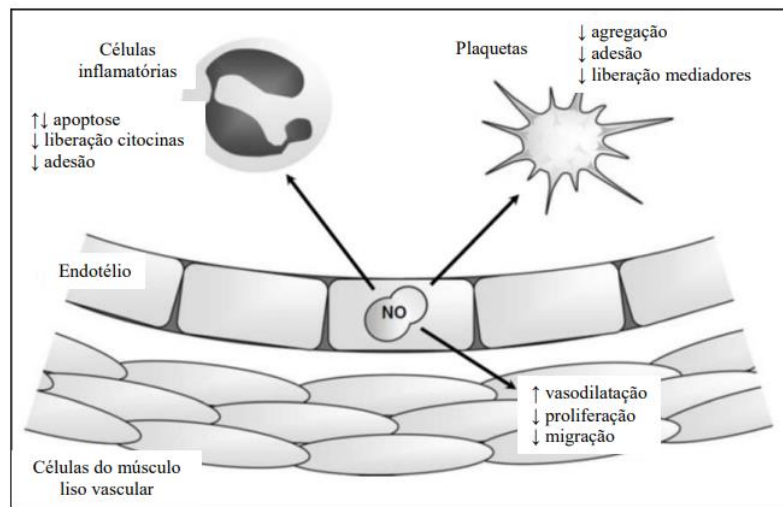


Figura 4: Efeitos cardiovasculares do óxido nítrico (NO) (MILLER; MEGSON, 2007).

O relaxamento da musculatura vascular dependente dos canais de K^+ ocorre quando os mesmos são ativados e abertos, permitindo o efluxo de íons K^+ da célula, gerando assim a hiperpolarização da membrana. Isso resulta no fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Esse fechamento provoca redução da ligação do íon Ca^{2+} à calmodulina (a formação do complexo Ca^{2+} - calmodulina) e assim ocorre o impedimento da fosforilação da miosina quinase de cadeia leve, por fim, gera uma resposta relaxante. Já o relaxamento provocado pelo NO está relacionado a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) com um consequente aumento na produção de GMP cíclico. A qual, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG) que através de diversos mecanismos, estimula o relaxamento da musculatura lisa vascular. A PKG atua ativando os canais de K^+ induzindo hiperpolarização ou estimulando a saída de Ca^{2+} do citoplasma da célula, o que leva a uma vasodilatação. Desta forma, a PKG diminui a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} , diminuindo a contração muscular (**Figura 5**) (YOSHIDA; OWENS, 2005; ZHAO et al., 2000; SATIN; SCHRODER; CRUMP, 2011; TOUSOULIS et al., 2012).

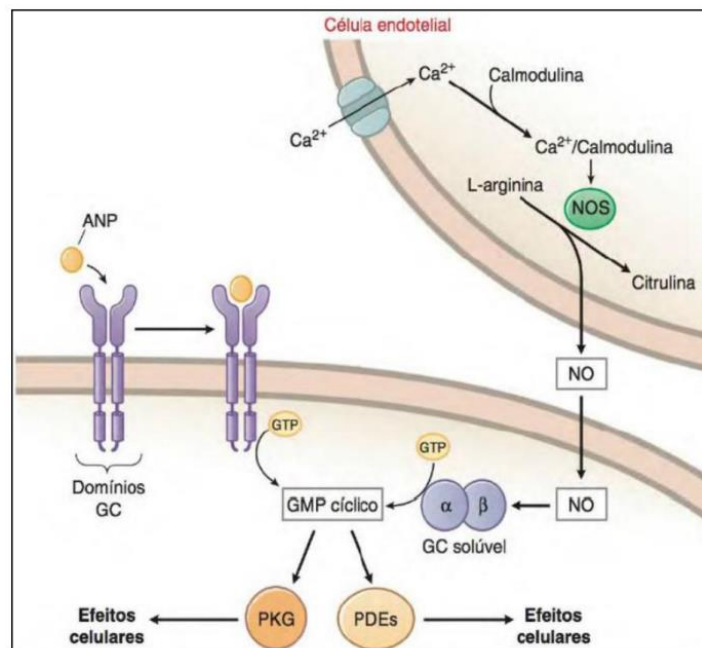


Figura 5: Síntese de óxido nítrico pela célula endotelial (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2011).

Quanto a PGI₂, é observado que sua contribuição para a vasodilatação dependente do endotélio é pequena. Sua ação é proveniente da presença de receptores específicos na parede das células musculares lisas vasculares. A estimulação desses receptores leva a uma estimulação da adenilil ciclase, produzindo assim, um aumento de AMP cíclico e estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA possui um efeito semelhante a PKG, e pode ativar canais de K⁺ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização, estimulando a saída de Ca²⁺ do citosol e inibindo a maquinaria contrátil. A prostaglandina vasodilatadora, é o principal metabólito derivado do ácido araquidônico gerado pela via da ciclooxygenase. Todavia, existe a formação de pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores como a PGH₂ e o tromboxane A₂. Além dos fatores supracitados, o sistema nervoso autônomo também é caracterizado como um importante sistema na regulação cardiovascular (PALMER et al., 1988; BOLOTINA et al., 1994; VANHOUTTE, 1999; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999).

2.4 Sistema Nervoso Autônomo

O sistema nervoso autônomo é dividido em nível estrutural e funcional através do componente periférico e central. Funcionalmente pode ser dividido em sistema nervoso

autônomo (SNA), sistema nervoso sensitivo e somático. O SNA, que se subdivide em simpático, parassimpático e entérico, regula as respostas involuntárias, sendo assim, no sistema cardiovascular controla o tônus vascular, a contratilidade e frequência cardíaca. Através de uma via de dois neurônios, as fibras nervosas autônomas interagem com os órgãos-alvo: pré-ganglionar (tronco encefálico ou da medula espinal aos gânglios) e pós-ganglionar (partem dos gânglios e inervam os órgãos periféricos). Esses gânglios possuem as terminações nervosas das fibras pré-ganglionares e os corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares. As fibras pré-ganglionares liberam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) que age nos receptores colinérgicos nicotínicos e com menor proporção, nos muscarínicos. No sistema nervoso parassimpático as fibras pós-ganglionares são colinérgicas e liberam ACh, que age nos receptores muscarínicos. No sistema nervoso simpático as fibras pós-ganglionares liberam a noradrenalina (NA), que age em receptores adrenérgicos ou adrenoceptores (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010).

Os receptores nicotínicos e muscarínicos constituem as duas principais classes de receptores colinérgicos. Os receptores nicotínicos são considerados receptores ionotrópicos (canais iônicos - regulados por ligantes) caracterizado por cinco subunidades proteicas que ao ser ativada adquire a conformação de canal aberto permeável a íons Na^+ e K^+ (**Quadro 1**). Estão localizados em sinapses excitatórias e são divididos em dois subtipos: neurais (Nn); musculares e ganglionares (Nm) (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010).

Os receptores muscarínicos correspondem à superfamília de receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G) (**Quadro 1**). As quais são consideradas proteínas de membrana formada por sete domínios transmembranares. Com cinco subtipos: (M1, M2, M3, M4 e M5) que formam dois grupos funcionais: M1, M3 e M5 (responsáveis pela estimulação da fosfolipase C através da proteína Gq. Os receptores M2 e M4 atuam através da proteína Gi na inibição da adenilil ciclase e ativação dos canais de K^+ . Os receptores supracitados são encontrados: neurônios do SNC e periféricos (M1, M2, M4 e M5); células parietais do estômago (M1); músculo cardíaco (M2); musculatura lisa visceral (M2 e M3); tecido glandular e músculo liso (M3) (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010).

Quadro 1: Receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos

RECEPTOR	LOCALIZAÇÕES TÍPICAS	RESPOSTAS	MECANISMO
Muscarínico M1 (Gq)	Gânglios autônomos	Potencial pós-sináptico excitatório tardio.	Gq → PLC → Aumento IP3 + Aumento DAG → Aumento Ca ₂₊ e Aumento PKC
	SNC	Complexas: despertar, atenção, analgesia.	
Muscarínico M2 (Gi)	Coração: nó SA	Abrandamento da despolarização espontânea; hiperpolarização.	By da proteína G → Redução AMPc → inibição da AC e abertura dos canais de K ⁺
	Coração: nó AV	↓ Velocidade de condução.	
	Coração: átrio	↓ Período refratário e da força de contração.	
	Coração: ventrículo	Ligeira ↓ da contratilidade	
Muscarínico M3 (Gq)	Músculo liso	Contração.	Igual a M1
Muscarínico M4 (Gi)	SNC		Igual a M2
Muscarínico M5 (Gq)	SNC		Igual a M1
Nicotínico Nm	Músculo esquelético na junção neuromuscular	Despolarização da placa terminal; contração do músculo	Abertura dos canais de Na ⁺ /K ⁺
Nicotínico Nn	Gânglios autônomos	Despolarização e disparo do neurônio pós-ganglionar	Abertura dos canais de Na ⁺ /K ⁺
	Medula supra-renal	Secreção de catecolaminas	
	SNC	Complexas: despertar, atenção, analgesia	

A sinalização da proteína Gq engloba os receptores ímpares (M1, M3 e M5), sendo descrito como o seguinte processo (**Figura 6**): O agonista irá se ligar promovendo a troca do GDP por GTP; o GTP se desloca pela membrana até encontrar o efetor biológico; ocorre a ativação do efetor PLC (fosfolipase C); a PLC ativa vai servir como catalisador para transformar o PIP2 em DAG (diacilglicerol), simultaneamente, a PLC também é capaz de formar o IP3; o IP3 irá até o retículo endoplasmático e isso vai culminar no aumento de Ca^{+2} para o citosol da célula; enquanto isso acontece, a DAG vai catalisar a ativação da PKC; a PKC ativa com o aumento de Ca^{+2} intracelular culmina na fosforilação de proteínas (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010; PRANDO et al., 2016).

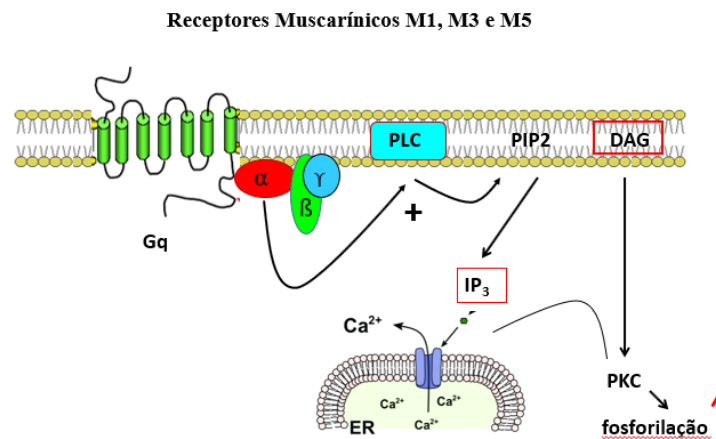


Figura 6: Sinalização da proteína Gq (receptores ímpares: M1, M3 e M5) (Adaptado de GOLAN et al., 2009).

A sinalização da proteína Gi engloba os receptores pares (M2 e M4), por se tratar de uma proteína inibitória, seu efeito final provoca a diminuição da fosforilação de proteínas devido a uma resposta biológica inibida. Resumidamente, seu processo engloba (**Figura 7**): A redução do AMPc (segundo mensageiro), da PKA, da fosforilação e consequente inibição. Sendo seu efetor a adenililciclase (AC) (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010; PRANDO et al., 2016).

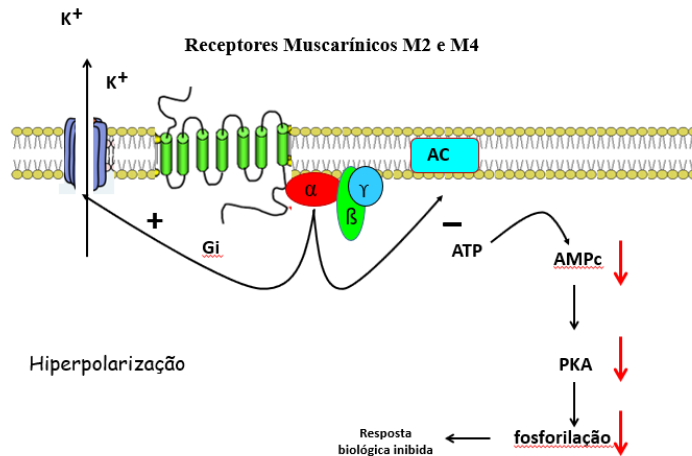


Figura 7: Sinalização da proteína Gi (receptores pares: M2 e M4) (Adaptado de GOLAN et al., 2009).

A ativação dos receptores muscarínicos (M3) do endotélio promove um aumento na concentração de Ca^{2+} no interior das células endoteliais, esse aumento influi no vasorelaxamento proveniente da liberação de fatores derivados do endotélio, a exemplo do NO e as PGI₂, isso ocorre porque quando a ACh se liga ao receptor induz a liberação de NO, a liberação do NO ativa a guanilato ciclase (enzima que catalisa o GTP em GMPc) dilatando o vaso sanguíneo (**Figura 8**). Sendo assim, essa ação só irá ocorrer nos vasos que possuem endotélio, pois só é possível encontrar o receptor M3 no endotélio (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010; PRANDO et al., 2016).

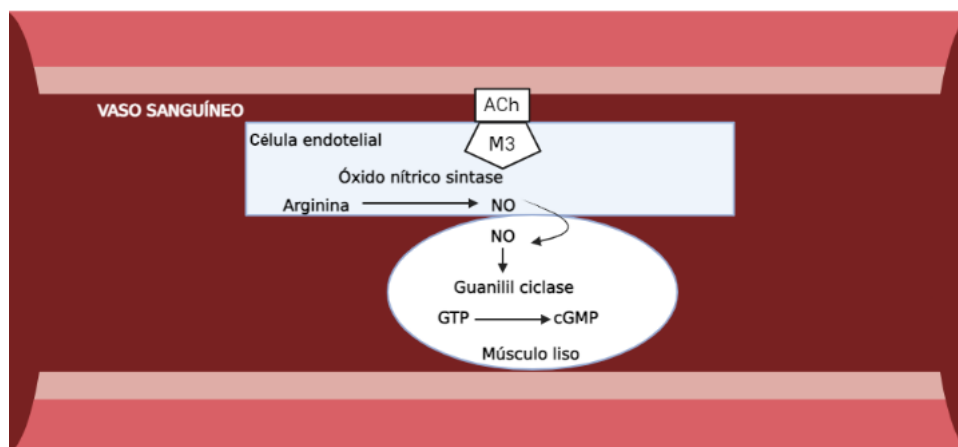


Figura 8: Ativação dos receptores muscarínicos (M3) do endotélio (Adaptado de GOLAN et al., 2009).

Resumidamente, a interação da acetilcolina (ACh) com um dos 5 tipos de receptores muscarínicos ou um dos dois tipos de nicotínicos (Nn ou Nm), gera algumas respostas colinérgicas. Além disso, a ACh possui uma ampla ação sistêmica, entre elas, nota-se a ação

direta no coração através dos receptores M2 (receptor acoplado à proteína G inibitória). Os efeitos associados ao M2 abrangem a diminuição da FC, da contratilidade e velocidade de condução (SIQUEIRA et al., 2004; GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010; PRANDO et al., 2016).

Atualmente, devido a importante ação fisiológica, patológica e farmacológica proveniente do NO, diversas pesquisas estão sendo realizadas objetivando a descoberta de fármacos que possuam a capacidade de liberar NO. E já existem no mercado diversas substâncias (orgânicas e inorgânicas) utilizadas no tratamento da HAS, todavia sua utilização é limitada pelos seus efeitos colaterais. Dentre os medicamentos utilizados para o tratamento da HAS encontra-se a nifedipina, que devido a sua ação anti-hipertensiva possui importantes repercussões sobre o sistema cardiovascular (PAULO, 2011; GOUVEIA, 2017).

A nifedipina é um fármaco que age bloqueando os canais para Ca^{+2} do tipo L nas células musculares lisas vasculares, causando assim, uma vasodilatação com consequente redução da PA e aumento reflexo da FC. Ela se caracteriza por seu rápido potencial ação e permanência prolongada no organismo. Todavia, tendo em vista os efeitos colaterais gerados pelos fármacos atuais, a exemplo da taquicardia, a busca por novos fármacos que complementem e agreguem o tratamento da HAS se fazem necessários. Nesse aspecto, as plantas medicinais se apresentam como um importante recurso para o tratamento da HAS (PONTREMOLI, 2005; BEEVERS; LIP; O'BRIEN, 2007; LAL et al., 2021).

2.5 Plantas Medicinais e Terpenos

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a medicina tradicional se refere à soma de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, que há muitos anos vem sendo utilizada na manutenção da saúde. As plantas medicinais são utilizadas terapeuticamente por milhares de anos, e os medicamentos à base de plantas desempenham nos estudos científicos um papel com grande relevância. É notável que os medicamentos tradicionais utilizam produtos naturais que são importantes para o tratamento de doenças. Tais produtos possuem uma ampla gama de estruturas químicas multidimensionais e compostos biologicamente ativos, que ao longo dos anos foram responsáveis pelo desenvolvimento de novos fármacos (RODRIGUES, 2006;

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016; CHAN et al., 2016; ALVES-SILVA et al., 2016; SOUSA; TESSER, 2017; ALVES; SILVA, 2019).

Devido à flexibilidade metabólica necessária para adaptação desses produtos a diversas situações na natureza, os mesmos apresentam-se como uma fonte renovável de metabólitos especializados. Os metabólitos secundários são responsáveis por grande parte das propriedades terapêuticas, e podem apresentar efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, anti-hipertensivos, cardioprotetores, entre outros. Dentre os principais metabólitos secundários encontram-se os terpenos (RODRIGUES, 2018; HUA et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020).

Os terpenos são encontrados em cerca de 90% dos óleos essenciais extraídos de plantas e estão relacionados a diversos processos biológicos, incluindo crescimento, desenvolvimento, reprodução e defesa das plantas. Apesar de serem considerados moléculas estruturalmente simples, diversas atividades farmacológicas são atribuídas a eles, destaca-se entre elas as atividades no sistema cardiovascular, como anti-hipertensivos e cardioprotetores (ALVES-SILVA et al., 2016; FELIPE; BICAS, 2017; TETALI, 2019; LASOÑ, 2020; GONÇALVES et al., 2020).

Eles são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (blocos de cinco carbonos- C_5) em sua estrutura, sendo: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), estesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Também podem ser classificados em termos do grau de ciclização da molécula, como: acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. (ALVES-SILVA et al., 2016; FELIPE; BICAS, 2017; TETALI, 2019; LASOÑ, 2020).

Os sesquiterpenos são substâncias aromáticas voláteis encontradas em plantas, fungos e algas. Eles são considerados agentes antimicrobianos naturais e populares. Atualmente, devido às suas propriedades biológicas importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos, estão ganhando grande popularidade e interesse científico (ALVES-SILVA et al., 2016; FELIPE; BICAS, 2017; TETALI, 2019; HE et al., 2019; LASOÑ, 2020).

Diversos estudos comprovaram as propriedades farmacológicas provenientes dos sesquiterpenos, observa-se que: os compostos sesquiterpênicos (corimbolona e mustacona) do extrato clorofórmio dos rizomas de *Cyperus articulatus* L., apresentam propriedades antiplasmódicas (RUKUNGA et al., 2008); o óleo essencial da *Cedrelopsis greveino*, apresenta um importante efeito anti-inflamatório (AFOULOUS et al., 2013); o Farnesol apresentou uma significativa atividade hipotensora e bradicárdica em ratos normotensos (SILVA et al., 2018);

o (-)- α -bisabolol, apresenta uma significativa atividade hipotensora e bradicárdica em ratos normotensos (MENEZES et al., 2010). Dentre os sesquiterpenos, destaca-se o nerolidol (NRD) que é considerado um sesquiterpeno acíclico, encontrado nas folhas de diversas plantas e diversos estudos abordam suas propriedades biológicas (ASAIKUMAR et al., 2019; GONÇALVES, 2020; LIN et al., 2021; MEERAN et al., 2021; SANTANA, 2022)

2.6 Nerolidol

O nerolidol (NRD) ou peruvicol (**Figura 9**) é um sesquiterpeno acíclico, identificado como um dos principais compostos bioativos de óleos essenciais encontrado nas folhas de diversas plantas, como: Alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), Mubafo (*Canarium schweinfurthii*), Caruru-gigante (*Amaranthus retroflexus*), Laranja amarga (*Citrus aurantium*), lavanda (*Lavandula*), gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*). Também costumam ser utilizados pela indústria de cosméticos, produtos de limpeza e alimentícia (AZZI et al., 2018; ASAIKUMAR, et al., 2019; EPHREM et al., 2019; BEZERRA et al., 2020).

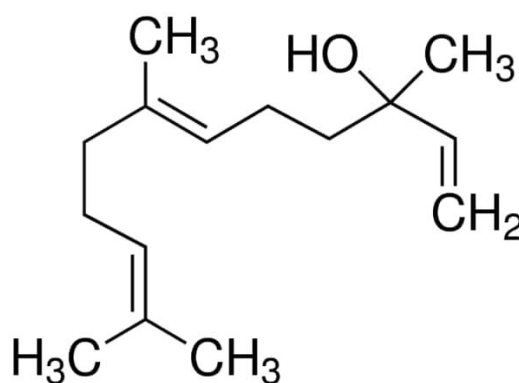


Figura 9: Estrutura química do NRD (mistura racêmica). Massa Molecular: 222.37 (SIGMA-ALDRICH, 2023).

Além disso, seus metabólitos demonstram efeitos bioativos, como: atividade antioxidante (NOGUEIRA et al., 2013), antibacteriana e anti-biofilme (MOURA et al., 2021), antifúngica (FONSECA et al., 2020), antiparasitária (SILVA et al., 2017), antinoceptiva e anti-inflamatória (FONSÊCA et al., 2016), cardioprotetora (GONÇALVES, 2020), sobre a reatividade vascular (SANTANA, 2022), entre outros. Sendo assim, possui algumas repercussões cardiovasculares documentadas em estudos (**Quadro 2**).

Quadro 2: Atividades biológicas do NRD sobre o sistema cardiovascular

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	ESPÉCIE	EFEITO
SANTANA, 2022	Rato Wistar	Vasorelaxante em anéis com endotélio funcional
LIN et al., 2021	Rato Wistar	Cardioprotetor com redução da inflamação e melhora das funções cardíacas
MEERAN et al., 2021	Rato Wistar	Proteção contra a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (DOX)
GONÇALVES, 2020	Rato Wistar	Hipotensor, bradicárdico e cardioprotetor contra o IAM
ASAIKUMAR et al., 2019	Rato Wistar	Proteção contra o IAM e redução do estresse oxidativo

Apesar de existir poucas pesquisas sobre as repercussões do NRD em doenças cardiovasculares, seus efeitos sobre os mais variados sistemas são estudados há muitos anos. Todavia, Gonçalves (2020) observou as repercussões fisiológicas do NRD no tratamento agudo do IM, sendo demonstrado que o NRD foi capaz de promover hipotensão e bradicardia quando administrado em animais normotensos e atenuar as repercussões do IAM. Santana (2022) também observou que em experimentos *in vitro* o NRD apresentou um efeito vasorelaxante principalmente em anéis com endotélio funcional. Asaikumar et al. (2019) mostrou através de estudos bioquímicos e histopatológicos que a administração oral do NRD foi eficaz na prevenção do dano tecidual no miocárdio induzido por ISO, de forma que o NRD foi importante para o manejo do IAM. Meeran et al. (2021) identificou que o NRD apresenta potencial para proteger o miocárdio da cardiotoxicidade crônica induzida por doxorrubicina (DOX) através do combate ao estresse oxidativo, a ativação de NF- κ B/MAPK, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e fibrose. Assim como, Lin e colaboradores (2021) relataram que a administração do NRD foi capaz de regular a pressão arterial em animais hipertensos, bem como, o efeito hipertrófico associado à calcineurina ao regular a cascata de sinalização Mel-18-

HSF-2-IGFIIR, o que destaca uma influência sobre o potencial do NRD contra cardiomiopatias induzidas por hipertensão.

Ainda que o NRD apresente diversas atividades farmacológicas, seu uso é restrito, isso decorre devido a sua volatilidade. Bem como, a capacidade de ser lipossolúvel e suscetível à fotodegradação, o que acaba dificultando a absorção pelo organismo e consequentemente reduz o aproveitamento de suas propriedades bioativas. Para aumentar a biodisponibilidade dos princípios ativos dos óleos essenciais, diferentes nanoestruturas têm sido utilizadas, como: nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas lipídicas, nanocápsulas lipídicas, lipossomas, micelas e dendrímeros. Esses processos de encapsulação têm por objetivo controlar o tamanho das partículas, as propriedades da superfície, a liberação do agente farmacológico no respectivo sítio de ação, aumentar a solubilidade, reduzir efeitos tóxicos e aumentar a vida útil dentro do organismo, melhorando assim a biodisponibilidade e bioeficácia do efeito terapêutico desejado pelo fármaco (AZZI et al., 2018; ASAIKUMAR et al., 2019; LASOÑ, 2020).

2.7 Complexação em lipossoma

Os lipossomas são considerados pioneiros na geração de nanocarreadores de medicamentos e foram descobertos por Bangham em 1965, cerca de três décadas depois da descoberta o primeiro medicamento lipossômico o *Ambisome*® começou a ser comercializado. Através dos efeitos pautados na literatura, pesquisas sobre fármacos lipossomais segue em crescimento. Os lipídios que compõem o lipossoma costumam ser biocompatíveis e biodegradáveis, desta forma, assemelha-se aos encontrados nas membranas biológicas. Ademais, podem diferir no que diz respeito ao seu tamanho, número de lamelas, lipídios utilizados, volume, composição da superfície e do meio aquoso interno (BANGHAM et al., 1965; DAVIDSON et al., 1994; HANN; PRENTICE, 2001; BUDAI; SZÓGYI, 2001; FRÉZARD et al., 2005; CHANG; YEH, 2012; ALLEN; CULLIS, 2013; MASSERINI, 2013; LAMICHHANE et al., 2018).

Os lipossomas são caracterizados como vesículas esféricas (**Figura 10**) de propriedade anfifílica, formadas por bicamadas lipídicas concêntricas, as quais se formam espontaneamente em solução aquosa. Devido a sua estrutura, as bicamadas lipídicas podem incorporar moléculas lipofílicas e anfifílicas, e o núcleo lipossomal permite o encapsulamento de agentes hidrofílicos. As cabeças polares dos lipídios (hidrofílicas) estão voltadas para o exterior em contato com o

meio aquoso, e as caudas hidrofóbicas estão voltadas para o interior da bicamada (AZZI et al., 2018; EPHREM et al., 2019; SILVA et al., 2019; BEZERRA et al., 2020; LASOÑ, 2020).

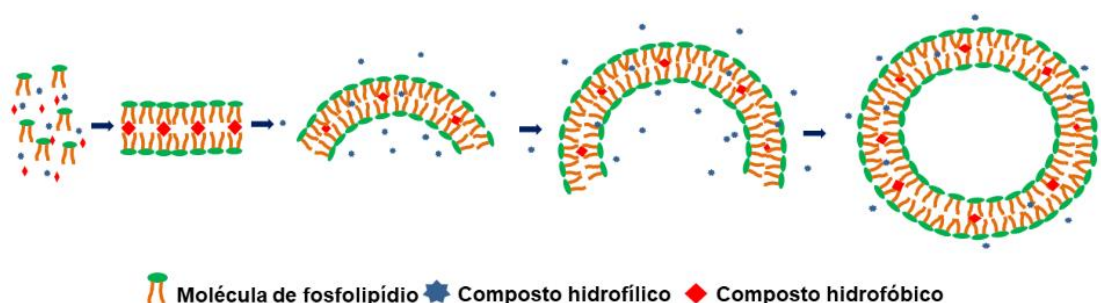


Figura 10: Formação da molécula de lipossoma (NEVES et al., 2021).

Ao encapsular um fármaco dentro do lipossoma (**Figura 11**) ele se torna protegido contra ações fisiológicas, como por exemplo, da degradação enzimática, imunológica e inativação química, o que repercute sobre sua depuração plasmática, resultando em um prolongamento de sua ação e na proteção contra possíveis instabilidades de pH. Assim como, a encapsulação em lipossomas promove a diminuição da exposição que os tecidos sofrem com determinados medicamentos, reduzindo assim, os efeitos colaterais do tratamento. A redução dos efeitos colaterais está diretamente relacionada a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações, isso ocorre tendo em vista que ao encapsular um fármaco sua liberação passa a ser progressiva e controlada (KYLE; SAHA, 2014; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; LI et al., 2017).

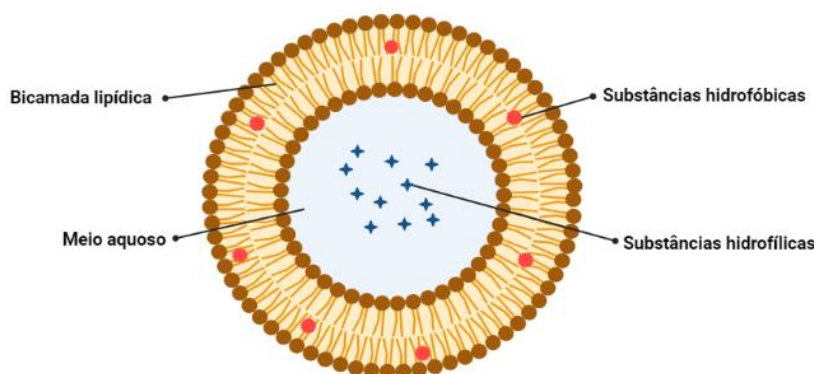


Figura 11: Estrutura da molécula de lipossoma (Adaptado de HAMMOUD et al., 2020).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho das vesículas, as quais variam de muito pequenas (25 nm) a grandes (5000 nm). Assim como, através o número de camadas (**Figura 12**): unilamelares (ULVs: uma membrana de bicamada) ou multilamelares (MLVs: múltiplas bicamadaslipídicas). As ULVs se subdividem em três categorias: unilamelares gigantes (ULV com bicamada lipídica única de 1 μm de diâmetro), unilamelares pequenas (tamanho na faixa de 20 a 200 nm) e multivesiculares (várias vesículas com menos de 1 μm de tamanho) (SHARMA; SHARMA, 1997; SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020).

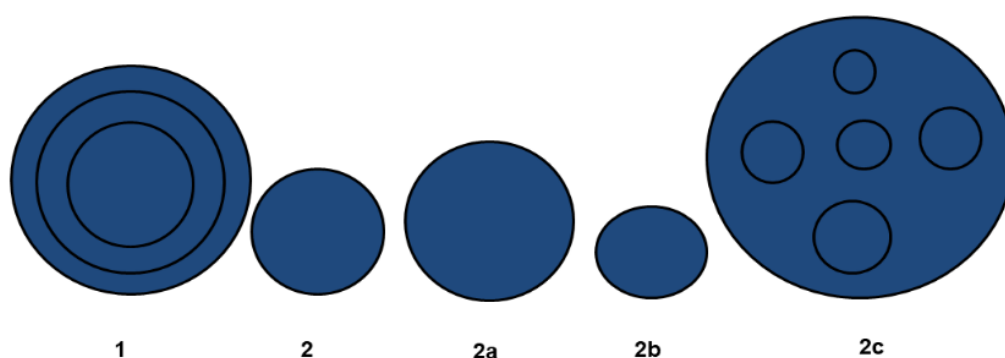


Figura 12: Classificação dos lipossomas em relação ao número de camadas: 1- Vesículas multilamelares (MLVs); 2- Vesículas unilamelares (ULVs); 2a- Vesículas unilamelares gigantes (GUV); 2b- Vesículas unilamelares pequenas; 2c- Vesículas multivesiculares (MVV) (NEVES et al., 2021).

No que se refere a administração de medicamentos, o tamanho almejado dos lipossomas deve variar entre 50 e 200 nm (HARASHIMA et al., 1994; WOODLE, 1995). À vista disso, os processos que visam a redução da lamelaridade e do tamanho dos lipossomas são frequentemente realizados, de forma que durante o processo de encapsulação os lipossomas são submetidos a homogeneização, sonicação, ciclos de extrusão ou congelamento/descongelamento, sendo esses fatores dependentes do fármaco e/ou substância que será encapsulada. Atualmente, algumas formulações com lipossomas convencionais já se encontram disponíveis para comercialização e diversos terpenos foram encapsulados para análise *in vivo* (JOHNSON et al., 1971; SCHERPHOF et al., 1985; HOPE et al., 1985; BRANDL et al., 1990; HARASHIMA et al., 1994).

Objetivando melhorar a solubilidade e a estabilidade dos terpenos, os sistemas de veiculação de fármacos em lipossomas estão sendo amplamente estudados. Hammoud e colaboradores (2021) observaram que ao encapsular o α -pineno em lipossomas convencionais

(CLs) e no sistema droga-em-ciclodextrina-em-lipossomas (DCLs), seus resultados demonstraram uma liberação gradual do monotерpeno. Também foi observado que os DCLs melhoraram o encapsulamento de componentes do eugenol (SEBAALY et al., 2016), trans-anetol (GHARIB et al., 2017), estragol (GHARIB et al., 2019), timol (HAMMOUD et al., 2020) retardando a liberação do fármaco e prolongando o efeito biológico, assim como, que os lipossomas convencionais (CLs) e DCLs apresentaram liberação gradual do nerolidol (AZZI et al., 2018). À vista disso, a incorporação do nerolidol em nanopartículas carreadoras de lipossomas pode aumentar a absorção, prolongar a meia vida, melhorar a distribuição, potencializar seus efeitos terapêuticos e reduzir possíveis efeitos colaterais (AZZI et al., 2018; EPHREM et al., 2019; SILVA et al., 2019; BEZERRA et al., 2020; LASOÑ, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares do nerolidol puro e complexado em lipossoma em ratos hipertensos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da administração intravenosa (i.v.) aguda do NRD puro sobre a pressão arterial média (PAM) e sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos hipertensos;

Investigar os possíveis mecanismos de ação do NRD através da avaliação da participação:

- Dos receptores muscarínicos;
- Dos receptores nicotínicos;
- Do óxido nítrico;
- Dos metabólitos de ciclooxigenase (COX) endoteliais.

Avaliar os efeitos da administração oral (v.o) subaguda do NRD puro e complexado em lipossoma sobre a PAM e FC em ratos hipertensos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Complexação do nerolidol em lipossoma

Para a preparação dos lipossomas foram utilizados o NRD e os fosfolipídios. Os lipossomas foram preparados por uma adaptação da metodologia descrita por Nunes et al. (2011) (**Figura 13**). Sendo assim, foi preparada uma dispersão, com concentração de 20 mg/mL. Para isso, dissolveu-se 250 mg de fosfatidilcolina, 0,8 g de NRD em 20 mL de clorofórmio em um balão. As soluções formadas foram levadas para sonificação em banho de ultrassom por 10 minutos e, após esse procedimento, foram submetidas a rotaevaporador para retirada do solvente orgânico sob temperatura de 40°C. Com a evaporação do solvente, observa-se no fundo do balão um filme fosfolipídico os quais foram ressuspensos em 40 mL de água ultrapura e submetidos a outro banho de ultrassom por 30 minutos, resultando em uma dispersão de lipossomas em meio aquoso. O material resultante foi colocado em um frasco de vidro hermeticamente fechado.

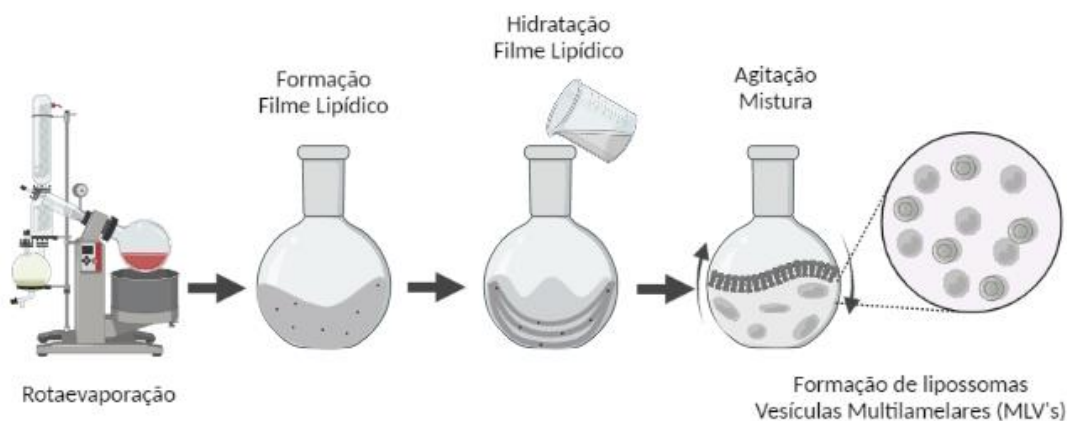


Figura 13: Esquema representativo da preparação do lipossoma (Adaptado de NUNES et al., 2011).

4.2 Caracterização físico-química das capsulas de lipossoma com NRD

Para avaliar o teor de NRD dentro da formulação (eficiência de encapsulação) foi utilizado o teste de Cromatografia Líquida de alta performance (HPLC), utilizando a metodologia de Souza et al. (2020), na qual foram utilizados: um cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com desgaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor

automático SIL-20A HT, um forno cto-20A, um detector de arranjo de diodos SPM20avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A, utilizando uma coluna de fase reversa C18 de 150 x 4,6 mm. Para o procedimento de extração dos lipossomas foram feitas uma fase móvel (FM), uma solução contendo metanol e água acidificada (0,1% ácido fórmico) na proporção 80/20, e foi realizada uma curva de calibração utilizando as concentrações de 10, 30, 50, 100 e 150 mcg/mL. O tempo de corrida do HPLC foi de 15 minutos, o volume de injeção foi de microlitros, o fluxo de 1mL por minuto em eluição isocrática.

Para as análises de tamanho da partícula, potencial Zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS), foi utilizado um equipamento Zetasizer nano ZS90, REF. ZEN3691, MALVERN. Para evitar interferências na carga elétrica dos íons em solução para análise de potencial Zeta foi adicionado nitrato de potássio. A temperatura no momento do teste foi de 20°C. Por fim, foi utilizado um pHmetro para analisar o pH da substância.

4.3 Protocolo de indução da Hipertensão

A indução da hipertensão nos animais foi feita uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos, via gavagem, através da inibição da síntese de óxido nítrico (NO) por meio da administração oral de NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (20 mg/kg) (RIBEIRO et al., 1992). Os animais foram pesados todos os dias antes da administração para o ajuste da dose do L-NAME. Em seguida, separados em grupos e no 8º dia passaram pela cirurgia de cateterização da artéria e veia femorais. Após o término do presente protocolo (**Figura 14**) os animais foram distribuídos em grupos aleatórios para a realização dos tratamentos.

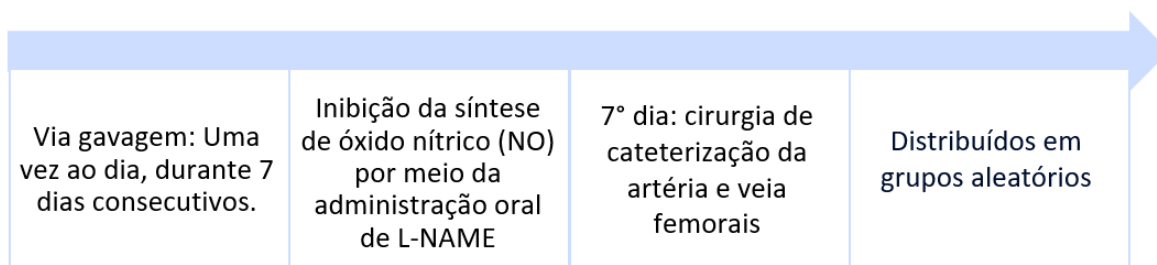


Figura 14: Protocolo experimental (Adaptado de SILVA, 2018)

4.4 Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem *Wistar*, com peso compreendido entre 250 – 300 gramas. Os animais foram obtidos do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e mantidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFAC) pertencente ao Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe que se encontra devidamente regulamentado no CIUCA/CONCEA.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com 258 cm² de base e 17,8 cm de altura, em grupos de no máximo 5 adultos por gaiola, sob as mesmas condições de temperatura ambiente (23 + 2°C), umidade e ruído. Com ciclo claro-escuro de 12:00 horas, com a fase clara iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, os animais receberam ração comercial (Nuvilab; Quimtia) e água *ad libitum*, durante todo o período de experimentação científica.

Todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e Internacional Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). E só foram iniciados após aprovação (CEPA: 7471310521/3941310521) do Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa (CEUA), da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.5 Substâncias

Durante os experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: NRD (pureza 98%), brometo de hexametônio (HEXA), sulfato de atropina (ATR), indometacina (INDO), NGnitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e clorofórmio obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA), cloreto de sódio (NaCl) (Neon), Tween 80 (Oxiten, BR), além de dipirona e cloridrato de ketamina e xilazina (SESPO, São Paulo, BR). As soluções foram mantidas em 0 °C. De acordo com alguns protocolos, as drogas foram diluídas em solução salina (0,9%) ou água destilada (veículo), nas concentrações almejadas.

4.6 Ensaios Farmacológicos in vivo

4.6.1 Categorização dos grupos

4.6.1.1 Tratamento agudo via intravenosa (i.v)

Os animais hipertensos submetidos ao tratamento agudo via intravenosa foram divididos em 2 grupos, compostos por 6 animais cada, sendo eles:

Grupo 1: NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.);

Grupo 2: Controle veículo (salina- NaCl 0,9% + Tween 80- 0,2% i.v.).

Para investigação dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do nerolidol os animais hipertensos foram divididos em 4 grupos, compostos por 6 animais cada, sendo eles:

Grupo 3: Atropina (2 mg/kg, i.v.) + NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.);

Grupo 4: Hexametônio (20 mg/kg, i.v.) + NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.);

Grupo 5: L-NAME (20 mg/kg, i.v.) + NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.);

Grupo 6: Indometacina (5mg/kg, i.v.) + NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.).

4.6.1.2 Tratamento subagudo via oral (v.o)

Os animais hipertensos submetidos ao tratamento subagudo via oral foram divididos em 4 grupos, compostos por 6 animais cada, sendo eles:

Grupo 7: Nerolidol puro (NRD) (200 mg/kg);

Grupo 8: Nerolidol complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg);

Grupo 9: Controle positivo nifedipina (CN) (10 mg/kg);

Grupo 10: Controle negativo veículo (CV) (salina- NaCl 0,9% + Tween 80).

4.6.2 Preparação dos animais para medida dos dados hemodinâmicos

Para a realização da coleta dos dados hemodinâmicos, os animais foram pesados e devidamente anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). E após verificado a eficácia do plano anestésico através da ausência de movimentação corporal, resposta ao pinçamento da região plantar da pata traseira e reflexo palpebral, os animais foram submetidos a cirurgia de cateterização da artéria e veia femorais (**Figura 15**), as quais foram cuidadosamente dissecadas através de uma incisão na região inguinal esquerda. Posteriormente foi realizada a implantação de um cateter de polietileno (PE) formado 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). Após inserção e fixação do cateter, o mesmo foi tunelizado subcutaneamente pelo dorso do animal e exteriorizado através de uma incisão cutânea entre as escápulas, e então as incisões foram suturadas. O acesso venoso foi utilizado para administração do NRD e de ferramentas farmacológicas no tratamento intravenoso (i.v.). Para minimizar o sofrimento dos animais após o fim do procedimento cirúrgico foi utilizado analgésico (Dipirona; 60 mg/kg i.p), por fim, eles foram colocados em caixas individuais e passaram por um período de recuperação pós-cirúrgica de 24 horas.

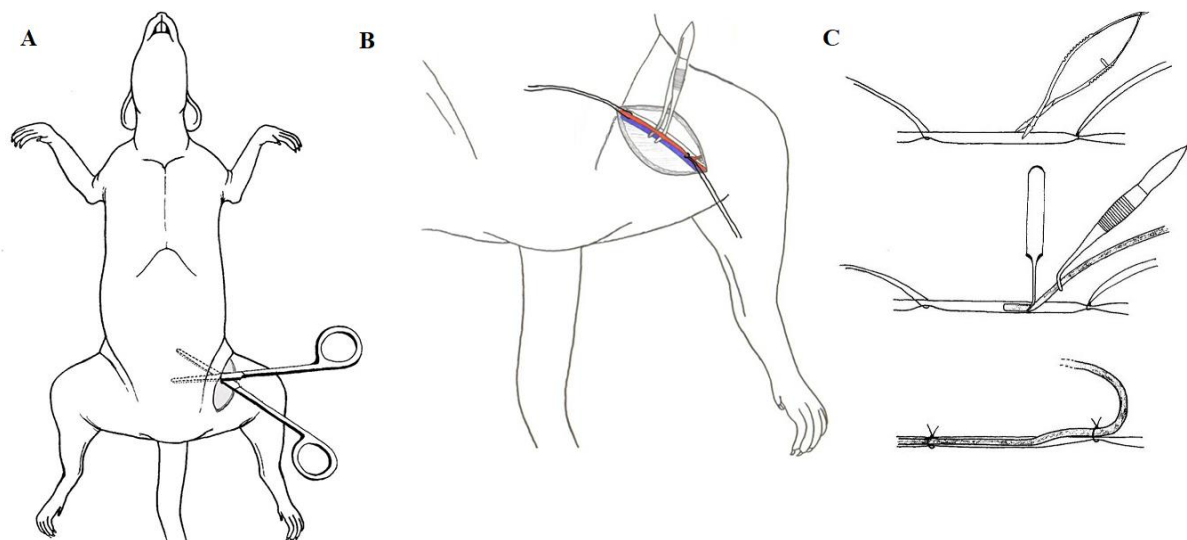


Figura 15: Ilustração do procedimento de cateterização da artéria e veia femorais em ratos (JESPERSEN; KNUPP; NORTHCOTT, 2012)

4.6.3 Coleta dos dados hemodinâmicos

Depois da recuperação no pós-operatório e a constatação do bem-estar dos animais, os que apresentaram mobilidade espontânea passaram por um período de aclimação na sala de avaliação hemodinâmica por no mínimo 30 minutos, para que assim ocorresse a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Após esse período o cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão (Edwards Lifescience, Irvine, CA, EUA) devidamente pré-calibrado e acoplado a um amplificador (Bridge Amp FE221, ADInstruments). Após a estabilização dos parâmetros, a PA foi registrada em 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 PA média (mmHg), sistólica (mmHg), diastólica (mmHg), e FC (bpm) foram obtidos e mensurados.

4.7 Protocolos para elucidação do mecanismo de ação do NRD

4.7.1 Protocolo de registro dos dados hemodinâmicos após tratamento intravenoso (i.v.) em rato hipertenso

Para o tratamento agudo, doses randomizadas do NRD foram administradas via intravenosa in bolus (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.), assim como, foram respeitados os intervalos de tempo suficiente para o retorno dos parâmetros basais entre uma dose e outra. Os valores da PAM e FC foram computados antes da administração (valores basais) e imediatamente após a administração do NRD e das ferramentas farmacológicas. Sendo inicialmente realizado o registro controle de 10 min. As variações foram expressas em % para cada dose e calculadas utilizando a fórmula:

$$\text{Resposta (\%)} = (\text{PAM final} - \text{PAM inicial}) \times 100 / \text{PAM inicial}$$

4.7.1.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos sobre o efeito induzido pelo NRD em ratos hipertensos

Na avaliação da participação dos receptores muscarínicos os animais foram tratados com atropina (ATR) (2 mg/kg, i.v.), que se trata de um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após a administração da ATR, foi dado um intervalo de 15 minutos e posteriormente foram administradas as doses randomizadas do NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) para verificação de seus efeitos sobre a PAM e FC.

4.7.1.2 Avaliação da participação dos receptores nicotínicos sobre o efeito induzido pelo NRD em ratos hipertensos

Para a avaliação dos receptores nicotínicos foi realizado bloqueio ganglionar através da administração prévia de 30 minutos do hexametônio (HEXA) (20 mg/kg, i.v.) (TAKAHASHI; OWYANG, 1997). Após 30 min da administração do HEXA, foi realizada a administração das doses randomizadas do NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) para verificação de seus efeitos sobre a PAM e FC.

4.7.1.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito induzido pelo NRD em ratos hipertensos

Na avaliação da participação do NO os animais foram tratados o L-NAME (20 mg/kg, i.v.), que corresponde a um inibidor da síntese de NO (RIBEIRO et al., 1992). Posteriormente, foi dado um intervalo de 30 minutos e em seguida foram administradas as doses randomizadas do NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) para verificação de seus efeitos sobre a PAM e FC.

4.7.1.4 Avaliação da participação de metabólitos da ciclooxigenase (COX) no efeito induzido pelo NRD em ratos hipertensos

Na avaliação da participação dos metabólitos da ciclooxigenase (COX) os animais foram tratados com indometacina (INDO) (5mg/kg, i.v.) que se trata de um inibidor da COX (CLARK; FUCHS, 1997). Posteriormente a administração da INDO, foi dado um intervalo de 30 minutos e em seguida foram administradas as doses randomizadas do NRD (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) para verificação de seus efeitos sobre a PAM e FC.

4.7.2 Protocolo de registro dos dados hemodinâmicos após tratamento via oral (v.o.) em rato hipertenso

Após o início do registro foi dado um intervalo de 30 minutos para a estabilização do sinal. Depois de constatada a estabilização foi realizado o registro (tempo 0) dos valores basais. Feito isso, os animais foram submetidos a seus respectivos tratamentos, como descrito no tópico 4.6.1. Posteriormente a realização dos tratamentos foram realizados os registros nos respectivos tempos: 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 24, 30 e 48 horas.

4.8 Eutanásia

Depois de concluído todos os protocolos experimentais, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.) para a eutanásia por deslocamento cervical.

4.9 Análise estatística

Inicialmente, os dados coletados foram transportados para uma planilha de dados no programa Excel for Windows 10. Todos os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). Para a comparação entre as variáveis na análise do modelo de hipertensão inicialmente foi realizado o teste de normalidade de shapiro-wilk, em seguida para avaliar as diferenças entre as médias foi utilizado o Teste t de Student não pareado ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do complexo de nerolidol em lipossoma (NLIP)

Estudos utilizando os lipossomas se mostram altamente produtivos. Nesse aspecto, os óleos essenciais encapsulados em lipossomas mostraram maior atividade dos efeitos pesquisados ou menor tempo para ativação do fármaco. Isso demonstra que os lipossomas protegem efetivamente as substâncias contidas das agressões do organismo, mantendo sua concentração e ampliando seu potencial de ação (SOUZA et al., 2019; SANTANA; BORGES; ASSIS, 2017). Quanto à formulação produzida no presente estudo, o teste de HPLC realizado foi necessário para a identificação e quantificação dos componentes da mistura. Esse teste demonstra a eficiência de encapsulação (EE), ou seja, se o NRD está envolto do lipossoma e qual a porcentagem. Sucintamente, quanto maior for a absorção de luz, mais concentrada é a substância. Sendo assim, o método realizado apresentou uma solução com concentração teórica de 20 mg/mL e um teor de 98% (**Figura 16**). Isso permite a utilização de menor dosagem do NRD, com manutenção dos efeitos e menor toxicidade.

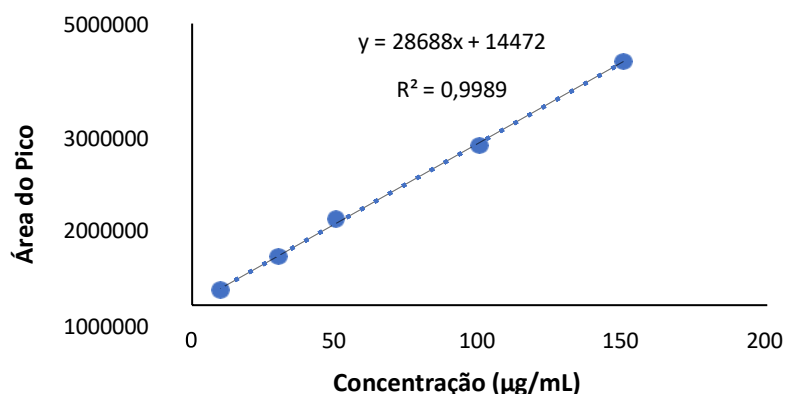


Figura 16: Curva de calibração do NRD. O gráfico em questão relaciona área do pico com as concentrações analisadas (10, 30, 50, 100 e 150). O gráfico também apresenta a equação da reta, com o valor de coeficiente angular (R^2), quanto mais próximo de 1 melhor a reta descrita, como demonstrado na figura.

Para análise por HPLC, Hammoud e colaboradores (2020) utilizou 100 µL de cada solução de α -pineno adicionadas a uma solução de p-cimeno (100 µL) e metanol (200 µL), o

método de HPLC foi validado em termos de linearidade, repetibilidade e limite de detecção, a curva de calibração foi construída e o coeficiente de correlação variou entre 0,994 e 0,999, demonstrando que o α -pineno foi eficientemente aprisionado em CLs e DCLs com valores altos de EE ($100,0 \pm 0,0$). Em consonância, Azzi e colaboradores (2018) realizaram a análise por HPLC em um modo isocrático, para determinar as concentrações de NRD, 100 μ L da amostra e 100 μ L da solução padrão de timol foram adicionados a 200 μ L de metanol. O método do HPLC foi validado quanto à linearidade, repetibilidade e limite de detecção. A eficiência de encapsulamento ($EE\% = > 97\%$) e a taxa de carregamento (LR%) de NRD em lipossomas foram determinadas, desta forma, o NRD foi encapsulado com sucesso em lipossomas e DCLs.

O teste de potencial Zeta é responsável por medir a amplitude de repulsão ou atração das cargas entre as partículas e o uso do nitrato de potássio oferece uma menor interferência na medição dessas cargas, permitindo assim, identificar a carga da substância. O equipamento utilizado para essa análise, também realiza a medição através do sistema de dispersão de luz dinâmica (DLS), que retrata a distribuição dos tamanhos de partículas. Os resultados do presente estudo demonstraram partículas com 22,7 - 64,9 nm de diâmetro e de potencial Zeta, $-23,1 - 0,3$ mV (**Figura 17**). Nossos achados (**Tabela 1**) demonstram uma estabilidade das partículas no que diz respeito a uma baixa taxa de coagulação e sedimentação, mantendo as propriedades do fluido a ser administrado. Para moléculas e partículas pequenas um alto potencial zeta confere estabilidade, e a solução ou dispersão resistem à agregação.

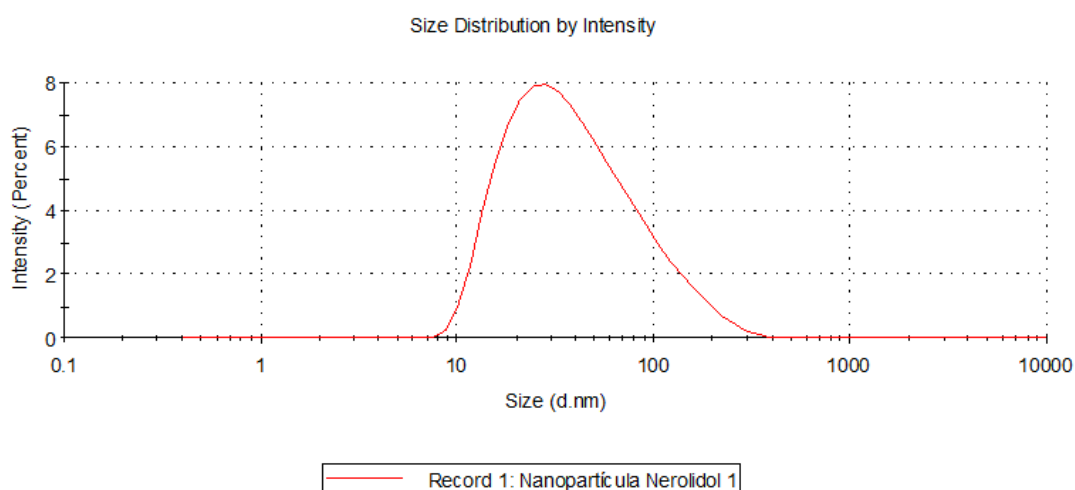


Figura 17: Gráfico da análise do potencial Zeta, demonstrando o teste de DLS. No eixo Y tem-se a intensidade de luz transmitida e no eixo X o tamanho da partícula em relação ao espalhamento da luz. Com 8% de intensidade, é atingido o pico de tamanho de partícula, entre 10-100 nm.

De acordo com estudos que utilizaram o lipossoma como sistema de veiculação de fármacos é possível observar resultados quanto a sua caracterização, a exemplo de: os CLs apresentaram duas populações distintas (uma população de tamanho nanométrico com tamanho médio de $150 \pm 0,0$ nm e uma população de tamanho micrométrico com tamanho médio de $6,2 \pm 0,9$ μ m), sendo a porcentagem da população nanométrica de $87,7 \pm 6,7\%$ (HAMMOUD et al., 2020); o tamanho dos lipossomas ao encapsular nanoemulsões de linalol (LN-NEs) e doxorrubicina (DOX) foi de $267,0 \pm 4,6$ nm, com eficiência de carga de $55,1 \pm 3,1\%$ e $27,2 \pm 0,9\%$ para linalol e DOX, respectivamente (WI et al., 2020); os lipossomas multivesiculares com o ácido oleanólico (OA-MVLs) usados para o tratamento do carcinoma hepatocelular apresentaram partículas esféricas, com um tamanho médio de partícula de $11,57$ μ m, eficiência de encapsulamento de $82,3\% \pm 0,61\%$, potencial zeta absoluto de $-13,35$ mV e o índice de polidispersão de $0,21$ (LUO et al., 2016); através do sistema de dispersão de luz dinâmica (DLS) o estudo obteve lipossomas na faixa de 200 nm, o PDI médio de cada formulação lipídica estava entre $0,22$ e $0,40$ e o potencial zeta apresentou uma variação entre $-5,5$ a $-6,9$ (JARADAT et al., 2022); As nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com nerolidol (NR-LNPs) apresentaram propriedades satisfatórias com diâmetro médio das partículas de $159 \pm 4,89$ nm, PDI de $0,32 \pm 0,01$, potencial zeta de $-10 \pm 1,97$ e porcentagem de eficiência de aprisionamento $71,3\% \pm 6,11$ (PARVEZ et al., 2022).

Tabela 1: Valores do tamanho da partícula e o índice de polidispersão.

PARÂMETRO	RESULTADO
Tamanho de partícula	34 nm
Pdl	0,318
Potencial Zeta	-22,67
pH	5,22
Teor	98%

5.2 Avaliação dos efeitos induzidos pela administração intravenosa (i.v.) aguda do nerolidol (NRD) sobre a PAM e FC em ratos hipertensos

As primeiras curvas dose-resposta do efeito do NRD em ratos hipertensos foram obtidas através da administração intravenosa em ratos acordados. O valor basal da PAM nos ratos hipertensos não anestesiados foi de $142 \pm 0,4$ mmHg e a FC foi de 341 ± 7 bpm ($n = 6$) (**Tabela 2 e Figura 18**). Nesses animais, injeções intravenosas *in bolus* de NRD (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.), $n = 7$) induziram hipotensão nas quatro doses aplicadas ($-19,8 \pm 3,87$, $-25,5 \pm 3,08$, $-36,10 \pm 4,87$, e $-45,53 \pm 4,61$ mmHg, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (**Figura 19A**). Este efeito foi associado a uma bradicardia significativa nas doses de 10 e 20 mg/kg ($-32,55 \pm 11,97$ e $-54,11 \pm 8,18$ bpm, respectivamente) (**Figura 19B**). Sendo assim, o NRD gerou uma intensa hipotensão e bradicardia quando comparado ao grupo controle.

Tabela 2: Valores basais de PAM e FC em ratos hipertensos não anestesiados antes (controle; $n = 8$) e após administração aguda (i.v.) de atropina (2 mg/kg; $n = 8$), HEXA (20 mg/kg; $n = 6$), LNAME (20 mg/kg; $n = 6$) e INDO (5 mg/kg; $n = 6$).

	Controle	Após Atropina	Após HEXA	Após L- NAME	Após INDO
PAM (mmHg)	$142 \pm 0,4$	$120 \pm 2^{***}$	$108 \pm 3^{***}$	150 ± 2	152 ± 2
FC (bpm)	341 ± 7	$490 \pm 4^{***}$	$388 \pm 7^{**}$	341 ± 18	327 ± 13

PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; HEXA: hexametônio; L-NAME: NG -nitro-L-arginina-metiléster; 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; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus controle.

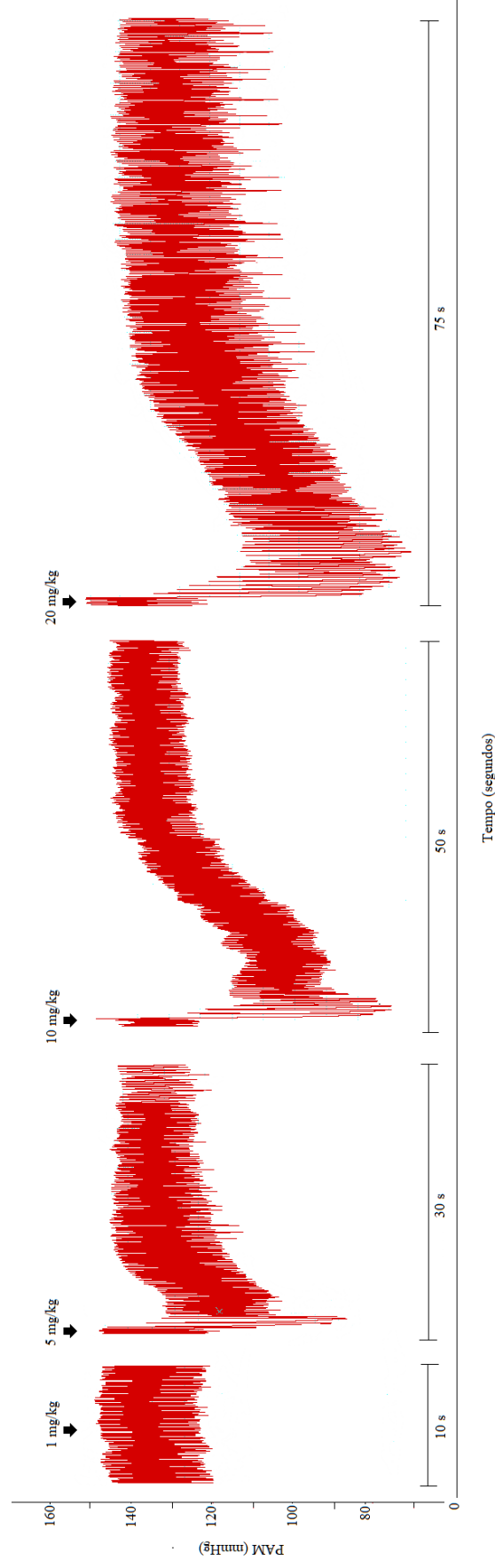


Figura 18: Registro original exibindo as variações de pressão média (mmHg) em função do tempo (segundos), após administração aguda (i.v.) de doses randomizadas do NRD (1, 5, 10 e 20 mg/kg) em um rato hipertenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração das doses.

Resultados semelhantes foram observados em estudos com o farnesol (FN) em ratos normotensos, quando administrado in bolus o FN promoveu hipotensão nas doses de 2,5; 5 e 7,5 mg/kg ($-10 \pm 2\%$, $-15 \pm 2\%$ e $-26 \pm 3\%$, $n = 8$, respectivamente), sendo esse efeito associada à bradicardia ($-25 \pm 12\%$, -34 ± 10 e $-7 \pm 10\%$, $n = 8$, respectivamente) (SILVA et al., 2018). Bem como, em estudos com o NRD para o tratamento do infarto agudo do miocárdio em animais normotensos, onde as doses foram administradas de forma randomizada in bolus nas concentrações (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.), e foi observado a redução dos níveis pressóricos em todas as doses ($-18 \pm 3\%$, $-28 \pm 5\%$, $-29 \pm 3\%$ e $-43 \pm 3\%$, respectivamente, $n=8$), sendo a redução mais significativa nas doses mais altas, e associado à bradicardia apenas na dose de 20 mg/kg ($-63 \pm 6\%$, $n=8$) (GONÇALVES, 2020).

Resultados significativos também foram encontrados na aplicação de outros representantes da classe dos terpenos, o citral foi capaz de induzir a hipotensão e bradicardia em animais normotensos, sendo sua ação relatada por uma possível ativação dos receptores muscarínicos cardíacos, redução da resistência periférica e do débito cardíaco (DC) (MOREIRA, 2013), além disso, tais respostas foram encontradas durante a aplicação do (-)- α -bisabolol (MENEZES et al., 2010), D-limoneno (ANDRADE et al., 2012), linalol (ANJOS et al., 2013; CAMARGO et al., 2018), anetol e estragol (SIQUEIRA et al., 2004) em animais normotensos. Nascimento e colaboradores (2019) observaram que o D-limoneno quando administrado de forma intravenosa induziu hipotensão e taquicardia moderada nas doses de 1 e 5 mg/kg. Assim como, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, produziu uma intensa e persistente hipotensão ($-13,9 \pm 6$; -53 ± 3 ; $-28 \pm 8\%$) associada à bradicardia (-33 ± 10 ; -57 ± 9 ; $-53 \pm 15\%$).

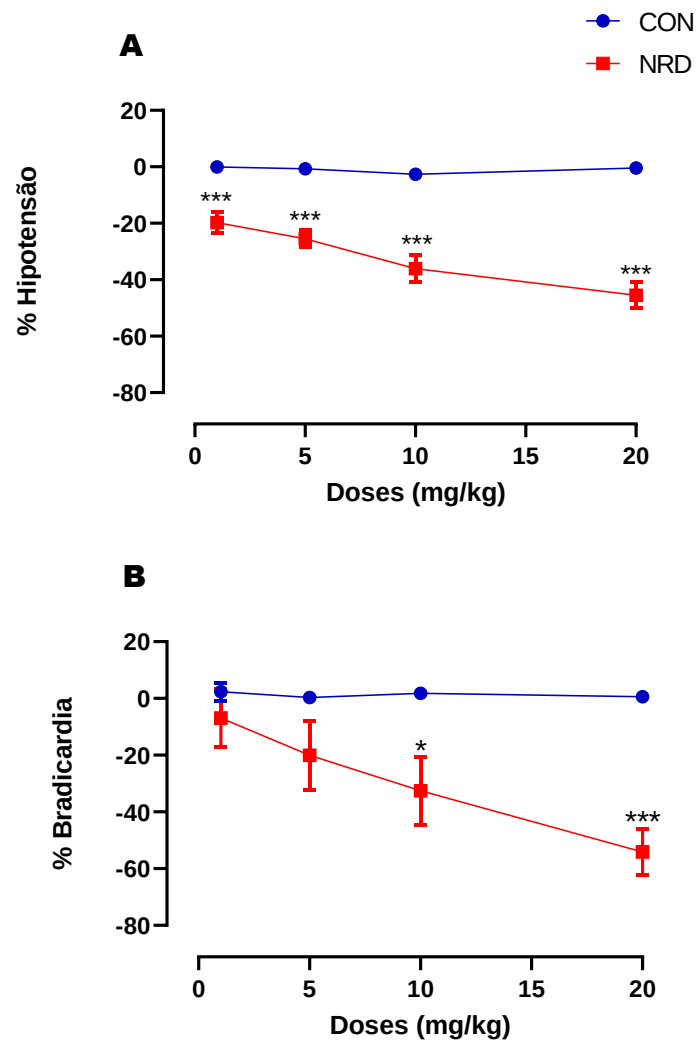


Figura 19: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos (n=7). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p = 0,05$; *** $p = 0,001$ vs controle veículo (CV).

Diante dos dados obtidos, e após observado o efeito hipotensor e bradicárdico do NRD em animais normotensos nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v. (GONÇALVES, 2020), e efeitos semelhantes no atual estudo em animais hipertensos, foram realizados experimentos a fim de complementar os resultados do estudo supracitado que abordam o mecanismo de ação do NRD.

Dentre os fatores fisiológicos que podem influenciar na hipotensão, efeito demonstrado na **figura 6**, encontra-se a vasodilatação, que pode ser estimulada pelos receptores muscarínicos endoteliais e estar relacionada a uma bradicardia (CLAGUE et al., 1985; ZUCCOLO et al.,

2017). A estimulação dos receptores muscarínicos endoteliais do subtipo M3 resulta no aumento de influxo de Ca^{2+} nas células endoteliais (PRANDO et al., 2016; SILVA et al., 2021). O aumento de Ca^{2+} promove a liberação de substâncias vasorrelaxantes do endotélio como o óxido nítrico (NO) e as prostaciclina (PGI₂) (MYSLIVECEK, 2003; REMONDINO et al., 2003; YU et al., 2014; GONÇALVES, 2020). Quando estimulados, tais receptores apresentam uma associação com a redução do débito cardíaco gerada por uma bradicardia. Quando esse estímulo atua sobre os receptores muscarínicos de células cardíacas, ele desencadeia a abertura de canais de K^+ e conseguinte bradicardia. Dessa forma, cada vez mais estudos buscam elucidar o efeito vasorelaxante dos terpenos (WOODWARD; JONES; NURUMIYA, 2011).

Dessa forma, para avaliar se o efeito induzido pelo NRD apresenta relação com os receptores supracitados, os animais foram pré-tratados com atropina (ATR) (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984; CLAGUE et al., 1985; WHALEN, 2016). A partir dos resultados obtidos, observa-se a atuação do NRD sobre esses receptores, uma vez que quando administrado junto a ATR a hipotensão foi significativamente atenuada ($1,19 \pm 1,50$, $0,24 \pm 0,52$, $-3,54 \pm 1,71$, $-9,31 \pm 6,14$, respectivamente nas doses de 1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=5) (**Figura 20A**). Estes resultados sugerem que o efeito hipotensor induzido por NRD parece ser causado, ao menos em parte, por uma ativação dos receptores muscarínicos endoteliais, o que corrobora com os resultados do trans-cariofileno nas doses de 1, 5, 10 e 15 mg.kg i.v., que induziu hipotensão significativa (7 ± 1 , 15 ± 2 , 21 ± 2 e $37 \pm 3\%$, respectivamente) (CUNHA et al., 2004), pelo citral nas doses de 1, 5, 10 e 20 mg/kg (-8 ± 2 , -21 ± 4 , -18 ± 4 e $-24 \pm 4\%$, n = 4) (MOREIRA, 2013) e pelo 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol (LQFM032) onde a atropina atenuou hipotensão (MENEGATTI, 2019). No estudo de Lahlou e colaboradores (2002) a hipotensão gerada pelo 1,8-cineol não sofreu influência da atropina.

A literatura demonstra que diversos estudos *in vitro* envolvendo terpenos apresentam importantes respostas cardíacas, dentre eles, se encontra o citral (MOREIRA, 2013), o esteviosídeo (LEE et al., 2001), trans-desidrocrotonina (SILVA et al., 2005), que apresentaram uma ação vasorelaxante pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} , e o linalol que demonstrou um efeito vasorelaxante em artéria mesentérica possivelmente decorrente do efeito direto no músculo liso vascular (ANJOS et al., 2013; CAMARGO et al., 2018).

À vista disso, o efeito vasorelaxante do nerolidol em artéria mesentérica superior e

suas principais vias foram avaliadas através do estudo *in vitro* de Santana (2022). Seus achados demonstram que a resposta vasorelaxante induzida pelo NRD foi maior em anéis com o endotélio íntegro, principalmente na última concentração (10^{-2} M) ($E_{\text{máx}} = 91,70 \pm 8,21\%$; $n=6$). Todavia, apesar da resposta ser menor nos anéis sem endotélio funcional, o NRD também foi capaz de promover efeito vasorelaxante por essa via ($E_{\text{máx}} = 62,56 \pm 8,47\%$; $n=7$). Além disso, nos anéis pré-incubados com a atropina (ATR 10^{-8} M), o relaxamento foi significativamente atenuado em comparação com o grupo sem a presença da ATR ($E_{\text{máx}} = 91,70 \pm 8,21\%$, com endotélio; $n=6$ *versus* $36,89 \pm 9,37\%$, com endotélio + ATR; $n=7$) o que demonstra que a resposta vasorelaxante induzida pelo NRD possivelmente atua através da ativação dos receptores muscarínicos presentes no endotélio (subtipo M3).

Ainda de acordo com Santana (2022), ao analisar a participação dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cav) o NRD foi capaz de promover um vasorelaxamento significativamente diferente, quando em comparação aos anéis sem endotélio funcional que foram pré-contráídos com FEN ($10\mu\text{M}$) ($E_{\text{máx}} = 111,27 \pm 3,67\%$, sem endotélio + KCl 80 mM; $n=6$ *versus* $62,56 \pm 8,47\%$, sem endotélio+FEN; $n=7$), esse resultado sugere que o efeito vasorelaxante do NRD possivelmente age por envolvimento dos Cav. Por fim, ao avaliar a participação dos canais para potássio (K^{+}) através do bloqueio inicial dos canais com tetraetilamônio (TEA - 1 mM) o resultado do estudo supracitado demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos, indicando que os canais para K^{+} não contribuem para as respostas induzidas pelo NRD.

Com relação ao efeito bradicárdico, nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg do presente estudo observou-se um efeito significativo ($-1,10 \pm 1,09$, $-0,83 \pm 0,30$ e $-1,57 \pm 1,51$, respectivamente, $n=6$) (**Figura 20B**). Isso sugere que os receptores muscarínicos cardíacos podem estar envolvidos no efeito bradicárdico induzido através do NRD pela ação direta ou indireta dos receptores via ativação vagal e liberação de acetilcolina no nó sinoatrial. Estudos anteriores demonstraram um comportamento semelhante através da administração de terpenos, na dose de 5 mg/kg do farnesol a ATR foi capaz de atenuar completamente a bradicardia ($-34 \pm 10\%$ para $1 \pm 0,9\%$, $n=8$) (SILVA et al., 2018), nas doses de 1, 5, 10 e 20 mg/kg (-1 ± 1 , -9 ± 7 , -19 ± 10 e $-11 \pm 6\%$, $n=4$) a bradicardia induzida pelo citral foi praticamente abolida (MOREIRA, 2013) e no estudo com o 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol (LQFM032) a atropina atenuou a bradicardia (MENEGATTI, 2019).

Em contrapartida, aos resultados anteriores, Gonçalves (2020) observou que o bloqueio muscarínico não inibiu o efeito hipotensor do NRD em todas as doses (1, 5, 10 e 20 mg/kg), porém, inibiu a bradicardia na dose de 20 mg/kg (-2 ± 1 , $n=6$). Ainda assim, faz-se necessário elucidar outros mecanismos (como ganglionares ou vasculares) que podem estar envolvidos no efeito hipotensor e bradicárdico.

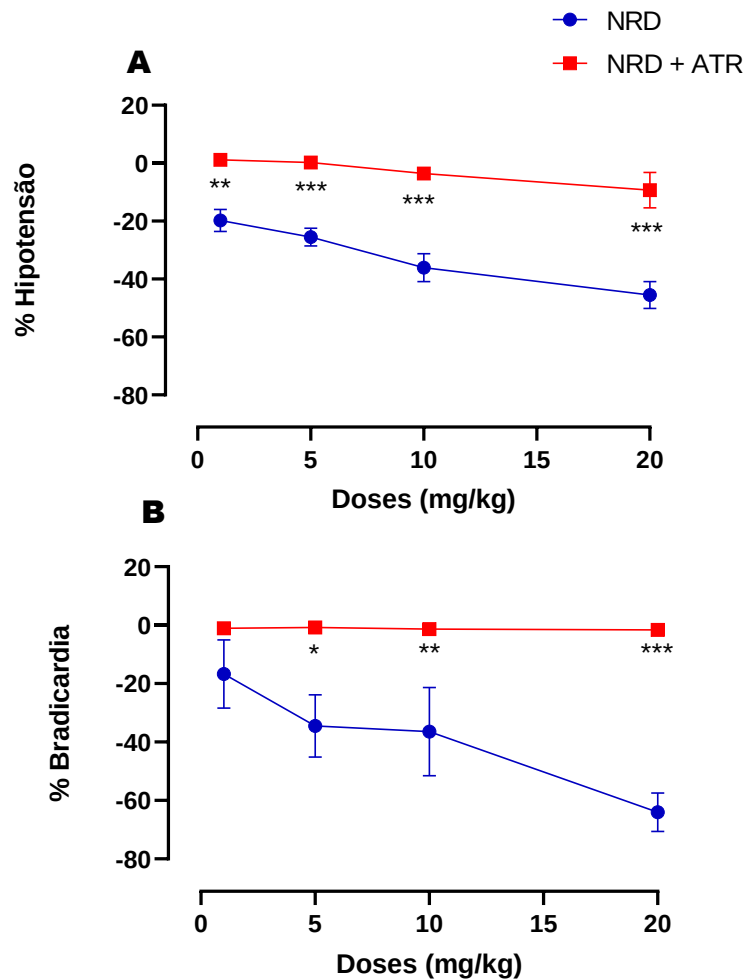


Figura 20: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD, $n=7$) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos antes e após pré-tratamento com ATR (2mg/kg, i.v., $n = 5$). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Para verificar o efeito indireto do NRD por via neuronal colinérgica, os animais foram tratados previamente com hexametônio (HEXA), um antagonista colinérgico nicotínico que pode causar vasodilatação e hipotensão (GOLAN et al., 2014; WHALEN et

al., 2016). Sua ação ocorre nas arteríolas produzindo vasodilatação seguida do aumento no fluxo sanguíneo, nas veias promovendo dilatação com consequente diminuição do retorno venoso e débito cardíaco e, no coração provocando taquicardia (GOODMAN; GILMAN, 2006). Através dos resultados obtidos, observa-se que o tratamento com HEXA não alterou significativamente a PAM (**Figura 21A**), no entanto, o efeito bradicárdico promovido pelo NRD foi abolido nas doses 5; 10 e 20 mg/kg ($-1,11 \pm 1,04$, $-1,40 \pm 2,40$ e $-6,26 \pm 2,03$, respectivamente, $n=5$) (**Figura 21B**).

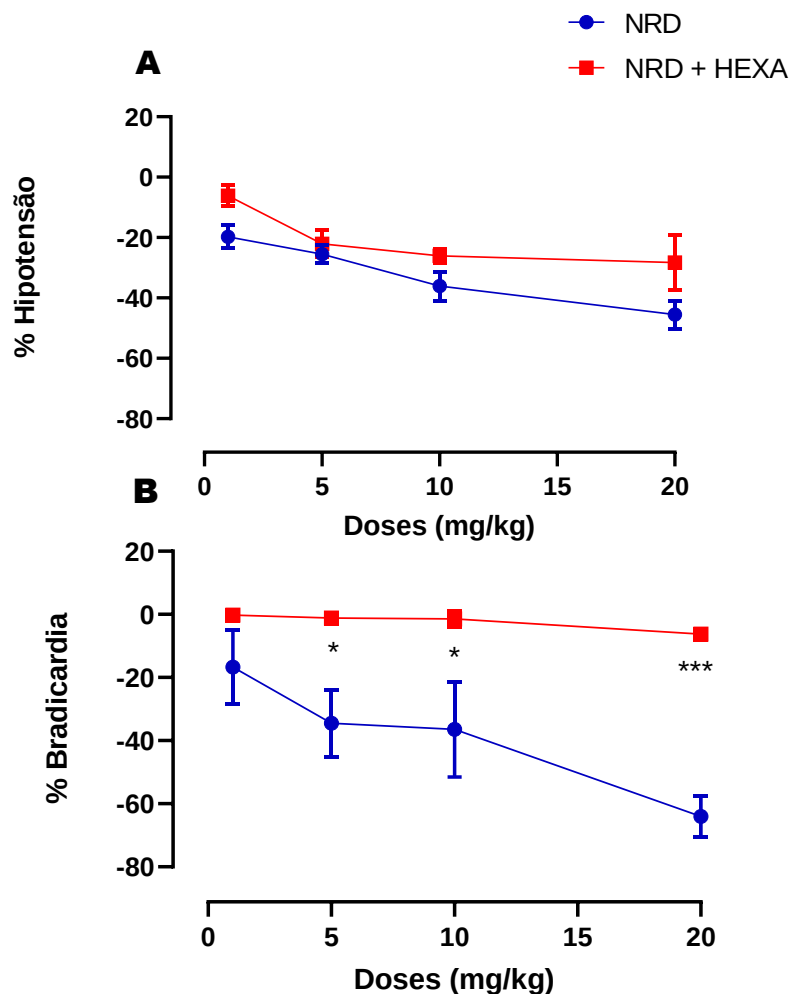


Figura 21: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (NRD, $n=7$) (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v.) em ratos hipertensos após pré-tratamento com HEXA (20 mg/kg, i.v., $n = 5$) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Estudos anteriores com o NRD apresentaram comportamento semelhante, causando

diminuição significativa da FC de animais pré-tratados com o HEXA na dose de 20 mg/kg (7 ± 4 , $n=6$) (GONÇALVES, 2020), esclarecendo uma possível atuação bradicárdica do NRD por estímulo aos receptores nicotínicos. Resultados semelhantes também foram encontrados na administração do farnesol nas doses de 2,5 e 5 mg/kg ($3 \pm 4\%$ e $4 \pm 3\%$, respectivamente, $n = 8$) (SILVA et al., 2018) e do citral nas doses de 1,5, 10 e 20 mg/kg (1 ± 1 ; -7 ± 6 ; -13 ± 13 e $-28 \pm 12\%$, $n = 5$) (MOREIRA, 2013) em animais normotensos. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que a resposta bradicárdica do NRD deve acontecer via ativação desses receptores.

A hipotensão pode ser provocada por diversos fatores, dentre eles se encontram os fatores derivados do endotélio, os quais permitem a regulação do tônus vascular através da liberação de substâncias mediadoras de relaxamento, como o óxido nítrico (NO) e produtos derivados da ativação da ciclo-oxigenase (COX) como a PGI₂. O aumento na liberação destes mediadores provoca uma intensa vasodilatação, a queda na resistência periférica total e consequente redução da PAM. Assim, para analisar sua influência foi realizado bloqueio da síntese do NO através da administração prévia do NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor competitivo da enzima NO-sintase (NOS) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA; HIGGS, 1993; WHALEN et al., 2016).

Os resultados obtidos demonstram que o L-NAME influenciou na resposta hipotensora induzida pelo NRD. Desta forma, o NO demonstra estar envolvido na hipotensão gerada pelo NRD em todas as doses ($-1,85 \pm 0,85\%$, $-8,27 \pm 4,20\%$, $-12,72 \pm 6,38\%$, e $-14,86 \pm 5,16\%$, respectivamente, $n = 7$) (**Figura 22A**). No estudo de Menegatti (2019) foi observado que o LQFM032 atenuou hipotensão. Moreira (2013) observou que o efeito hipotensor induzido pelo citral foi significativamente atenuado, sugerindo a participação de NO no efeito hipotensor do citral. Quanto a investigação do papel do NO na resposta induzida pelo NRD, foi observado no estudo de Santana (2022) que o bloqueio com L-NAME, não foi capaz de atenuar o vasorelaxamento promovido pelo NRD ($E_{\max} = 91,70 \pm 8,21\%$, com endotélio; $n=6$ versus $102,86 \pm 3,89\%$, com endotélio + L-NAME; $n=7$), assim sendo, o estudo sugere que o NO provavelmente não tem envolvimento nas respostas vasorelaxantes.

A modulação da resistência vascular e consequentemente da pressão arterial, ocorre em parte por conta da via endotelial do NO, que proporciona uma ação vasodilatadora fisiológica (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FÖRSTERMANN ; MÜNZEL, 2006; RATTMANN et al., 2009). Estudos demonstram que o NO também é capaz de gerar

vasorelaxamentos através de uma via independente de GMPc, abrangendo a ativação direta de canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} com grande condutância (BOLOTINA et al., 1994; MISTRY; GARLAND, 1998). Assim sendo, nota-se que o efeito hipotensor induzido pelo nerolidol pode estar em parte relacionado a um possível vasorelaxamento provocado pela liberação do NO. Todavia, mais experimentos são necessários para confirmar esta via de ação.

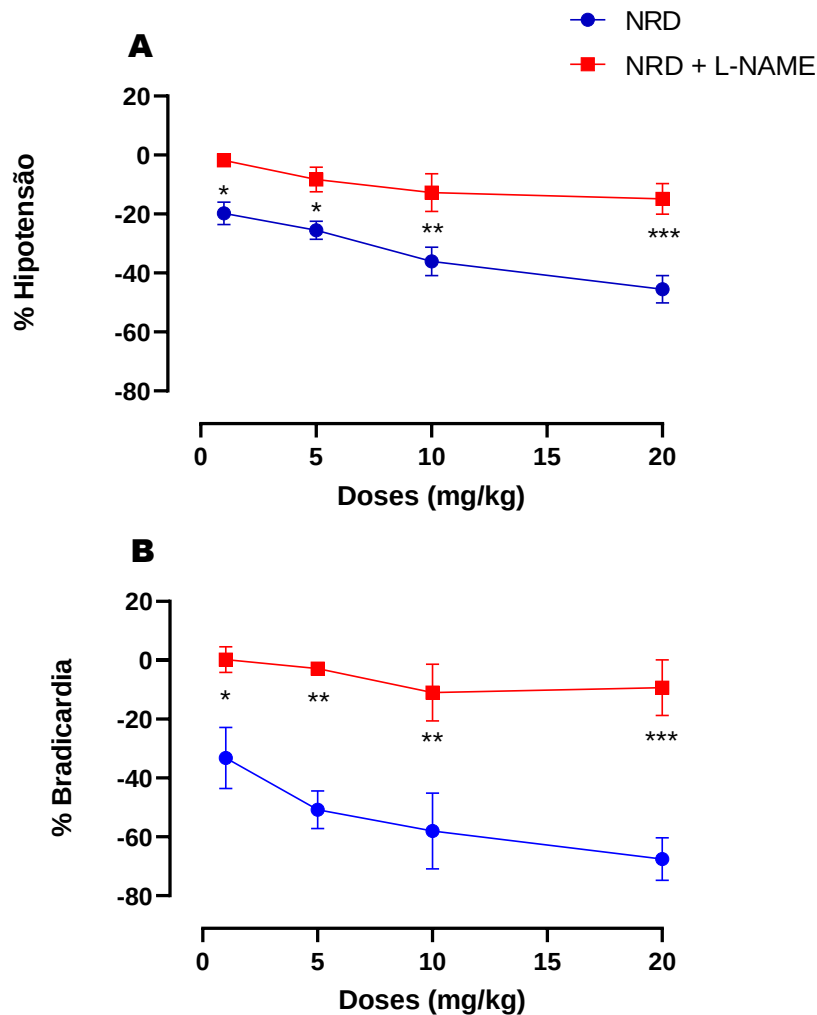


Figura 22: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=7) em ratos hipertensos após pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.v., n = 6) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle

O L-NAME também influenciou a resposta bradicárdica induzida pelo NRD ($0,26 \pm 4,35\%$, $-2,80 \pm 1,93\%$, $-10,96 \pm 9,67\%$, e $-9,33 \pm 9,48\%$, respectivamente nas doses de 1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=6) (**Figura 22B**). Estudos observaram que farnesol foi capaz de atenuar

significativamente o efeito bradicárdico nas doses de 5 e 7,5 mg/kg (7 ± 4 e $28 \pm 13\%$, respectivamente, $n = 6$) (SILVA et al., 2018), o NRD aboliu a bradicardia na dose de 20 mg/kg (9 ± 6 , $n=6$) (GONÇALVES et al., 2020) e o LQFM032 (MENEGATTI, 2019) demonstrou resultados semelhantes onde ocorreu uma redução da bradicardia. Já Moreira (2013) observou que a bradicardia não foi alterada com o citral. Dessa maneira, a atenuação do efeito bradicárdico gerado pelo NRD através do pré-tratamento com o L-NAME, nas doses de 1, 5, 10 e 20 mg/kg, sugere uma possível participação do NO na bradicardia.

Dentre os mediadores importantes para o tônus vascular, assim como o NO, encontram-se os metabólitos da ciclooxigenase (COX), principalmente no que se refere a prostaciclina (PGI₂) (CLARK; FUCHS, 1997; MONCADA; HIGGS, 1991). Dessa maneira, para investigar a participação da COX nos efeitos do NRD os animais foram pré-tratados com indometacina (INDO) (5 mg/kg, i.v., $n = 5$), um potente inibidor não-seletivo da COX. Como observado na **Figura 23A**, o pré-tratamento com a INDO promoveu uma atenuação no efeito hipotensor nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg ($-8,57 \pm 3,97\%$, $-19,36 \pm 4,56\%$ e $-20,43 \pm 6,11\%$, respectivamente, $n = 6$), indicando uma possível participação da PGI₂ nessa resposta.

A INDO não foi capaz de atenuar o efeito bradicárdico (**Figura 23B**), indicando que a PGI₂ possivelmente não está envolvida nesse efeito. Esse resultado corrobora com o estudo do citrionelol onde ocorreu uma hipotensão associada a bradicardia não dependente da dose (BASTOS, 2010) e do citral onde o efeito hipotensor e bradicárdico foi atenuado na dose de 5 mg/kg. Esses resultados sugerem que a PGI₂ parece, em parte, estar envolvida nestes efeitos. Em contrapartida, no estudo de Gonçalves (2020) a INDO não alterou o efeito hipotensor e o bradicárdico do NRD, sugerindo que a PGI₂ não participa dessa ação. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Silva (2018) com o farnesol. Sendo assim, mais experimentos são necessários para confirmar os resultados.

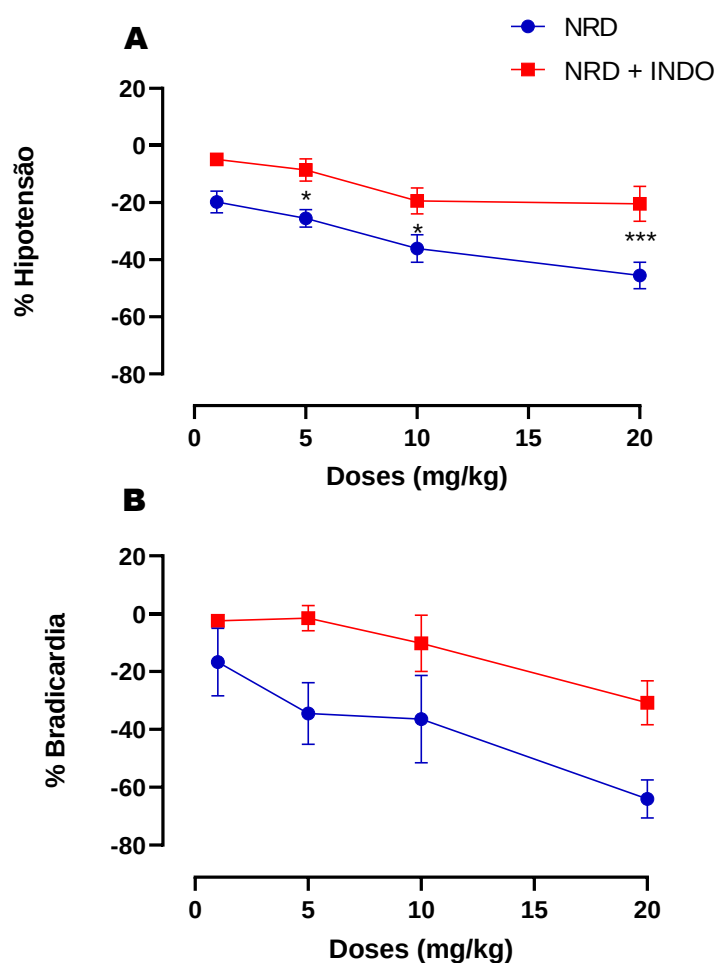


Figura 23: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses randomizadas do nerolidol (1; 5; 10 e 20 mg/kg i.v. n=7) em ratos hipertensos após pré-tratamento com INDO (5 mg/kg, i.v., n = 6) em ratos hipertensos. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.3 Avaliação dos efeitos induzidos pela administração oral (v.o) do nerolidol puro e complexado em Lipossoma sobre a PAM e FC em ratos hipertensos

Após constatado o efeito hipotensor e bradicárdico do NRD pela via intravenosa, foram realizados experimentos através administração oral do NRD puro e seu complexo em lipossoma (NLIP) em animais hipertensos. Como se sabe, a via oral é uma das formas mais antigas e a mais utilizada para tratamento farmacológico de doenças devido ao baixo custo e

comodidade (GOLAN et al., 2014). Estudos anteriores com outros terpenos, a exemplo do farnesol (SILVA et al., 2018), demonstraram efeitos anti-hipertensivos promissores através da administração via oral.

Ao ser administrado via oral nos animais hipertensos, o NRD induziu respostas anti-hipertensivas em diversos tempos (**Figura 24A e 25A**), sendo as respostas significativas encontradas nos tempos de 0,5h, 1h, 8h, 24h, 30h e 48h ($137 \pm 4,47$, $138 \pm 4,82$, $137 \pm 6,79$, $137 \pm 7,80$, $124 \pm 4,15$ e $117 \pm 5,06$ mmHg, respectivamente) quando comparado ao CV ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Já o NLIP (**Figura 24A e 25A**), induziu respostas anti-hipertensivas significativas nos tempos de 24h e 48h ($137 \pm 1,08$ e $112 \pm 5,04$ mmHg, respectivamente) quando comparado ao CV ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Assim como, apresentou resultados significativos nos tempos de 0,5h, 1h, 2h, 3h e 48h ($154 \pm 2,01$, $151 \pm 3,18$, $147 \pm 3,07$, $143 \pm 3,23$ e $112 \pm 5,04$ mmHg, respectivamente) quando comparado ao CN ($p < 0,05$) (**Figura 24A e 25A**). Dessa forma, nota-se que a resposta induzida pelo NRD e NLIP na PAM ocorreu a partir de 0,5h e se mostrou duradoura até 48h (**Figura 24A e 25A**).

Em nossos resultados, o grupo tratado com nifedipina (CN) (**Figura 24A e 25A**), um fármaco de ação anti-hipertensiva que age bloqueando os canais para Ca^{+2} (PONTREMOLI, 2005; COHAN; CHECCIO, 1985) caracterizada por seu rápido início de ação (BEEVERS; LIP; O'BRIEN, 2007; ISHII et al., 1980), apresentou uma redução significativa na PAM nos tempos de 0,5h, 1h, 2h e 3h ($137 \pm 5,41$, $133 \pm 6,13$, $130 \pm 5,73$ e $133 \pm 5,13$ mmHg, respectivamente) quando comparado ao grupo veículo (CV) ($p < 0,01$ e $p < 0,001$). Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstraram uma expressiva redução da PAM após a administração da nifedipina (SILVA et al., 2018; FRAGA, 2013; MOREIRA et al., 2016).

Quando comparados entre si, o NRD ($137 \pm 4,47$) e o NLIP ($154 \pm 2,01$) apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) apenas no tempo de 0,5h, nos posteriores tempos ambos apresentaram respostas parecidas (**Figura 24A e 25A**).

Como pode ser observado na **Figura 24B e 25B** o NLIP foi capaz de causar uma redução significativa na FC nos tempos de 2h, 3h, 4h, 8h, 24h, 30h e 48h ($337 \pm 3,67$, $329 \pm 9,75$, $319 \pm 3,60$, $313 \pm 1,38$, $304 \pm 3,78$, $301 \pm 4,49$ e $303 \pm 2,42$ bpm, respectivamente) quando comparado ao CV ($p < 0,001$). Assim como, apresentou resultados significativos nos tempos de 30h e 48h ($301 \pm 4,49$ e $303 \pm 2,42$ bpm, respectivamente) quando comparado ao CN ($p < 0,05$). O NRD (**Figura 24B e 25B**) também apresentou resultados significativos nos tempos de 2h, 3h, 4h, 8h, 24h, 30h e 48h ($346 \pm 8,70$, $328 \pm 8,68$, $341 \pm 11,09$, $333 \pm 5,62$, $342 \pm 8,58$, $328 \pm 4,14$ e $341 \pm 16,62$ bpm, respectivamente) quando comparado ao CV ($p <$

0,05, $p < 0,01$ e $p < 0,001$).

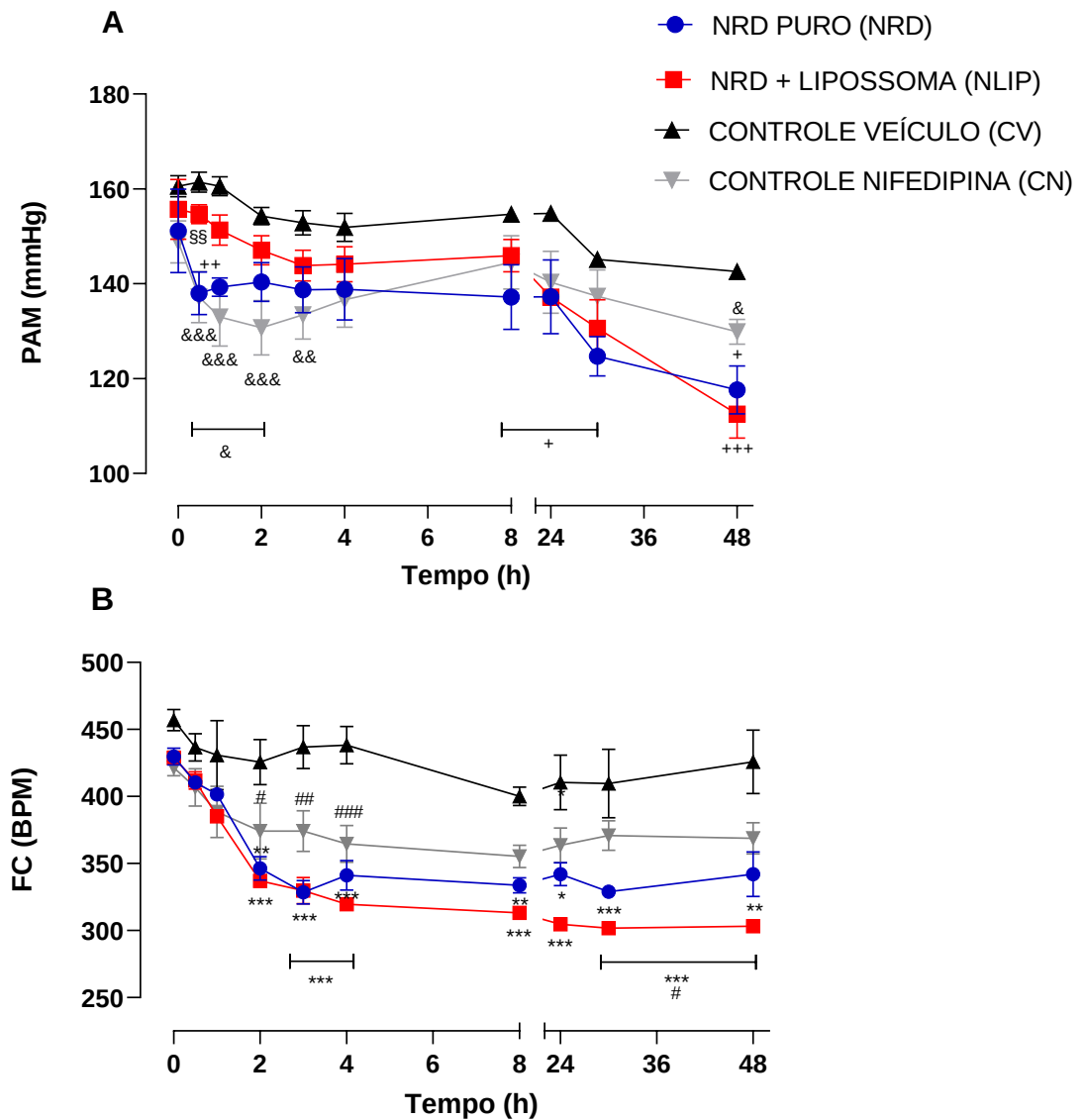


Figura 24: Efeito do tratamento oral (via gavagem) do nerolidol puro (NRD) (200 mg/kg), nerolidol complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg), controle nifedipina (CN) (10 mg/kg) e controle veículo (CV) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos hipertensos (L-NAME) ($n = 6$) antes (tempo 0) e 0,5; 1; 2; 3; 4;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

A redução da FC é um importante fator do tratamento anti-hipertensivo, alguns fármacos indicados para o tratamento de doenças cardiovasculares, como o atenolol (antagonista beta-adrenérgico) que possui uma ação direta sobre a FC ao bloquear a atividade simpática cardíaca, apresenta-se como um importante fator no controle dos efeitos deletérios do aumento da pressão arterial (BUUSE ET AL., 2001; BUUSE, 2002). Todavia, alguns fármacos apresentam como reação adversa a taquicardia, isso aumenta a necessidade de estudos voltados para administração de fármacos que diminuam a FC (ALVES et al., 2016).

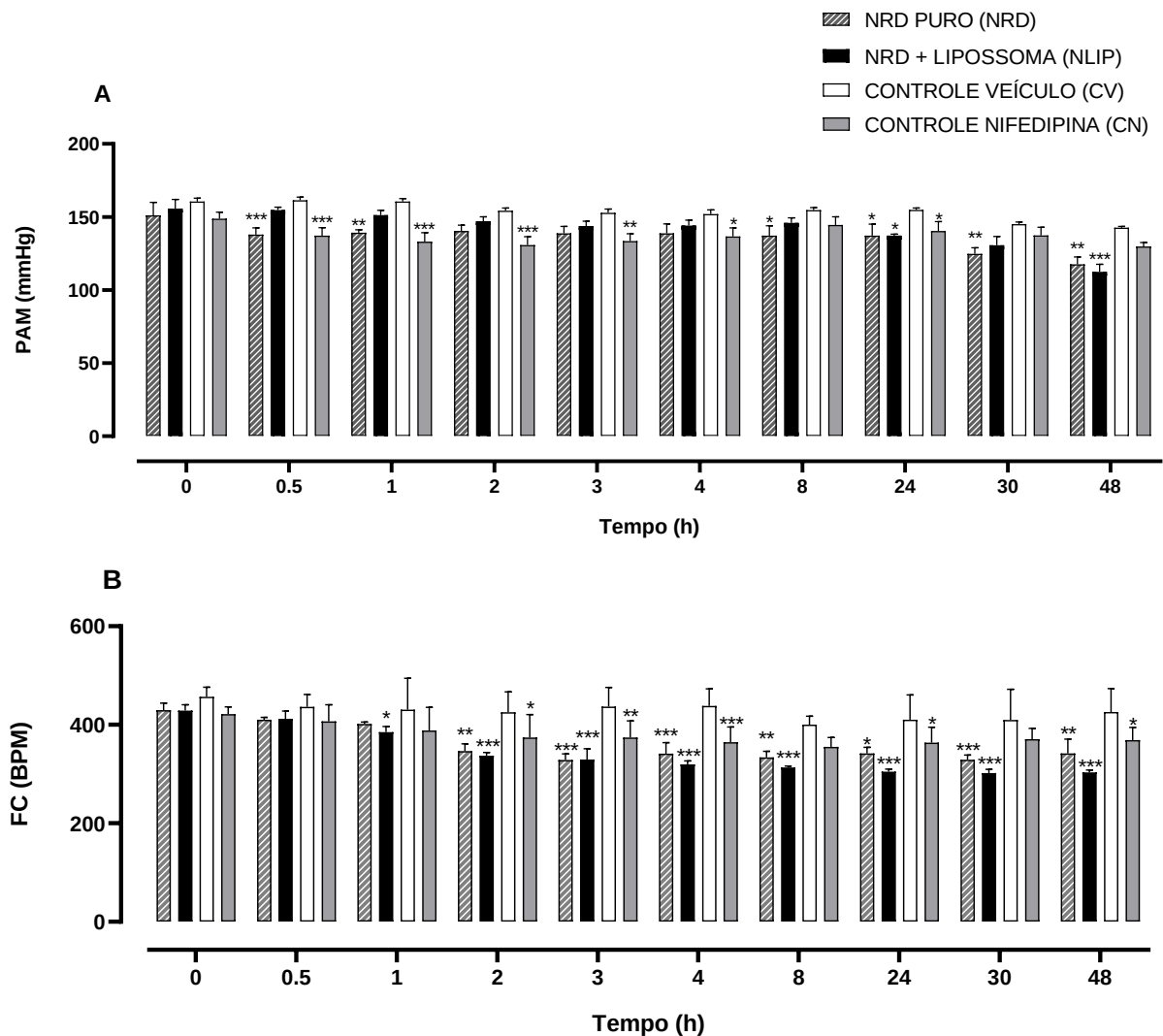


Figura 25: Efeito do tratamento oral (via gavagem) do nerolidol puro (NRD) (200 mg/kg), nerolidol complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg), controle nifedipina (CN) (10 mg/kg) vs controle veículo (CV) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos hipertensos (L-NAME) (n = 6) antes (tempo 0) e 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 24; 30 e 48 h após os tratamentos. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ CN, NRD, NLIP vs CV.

No grupo tratado com a droga nifedipina (CN) (**Figura 24B e 25B**), foi possível observar resultados significativos na redução da FC somente nos tempos de 2h, 3h, 4h e 48h ($374 \pm 20,75$, $374 \pm 15,08$, $364 \pm 13,77$ e $368 \pm 11,60$ bpm, respectivamente) quando comparado ao CV ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$). Quando comparados entre si, o NRD e NLIP não apresentaram diferenças significativas.

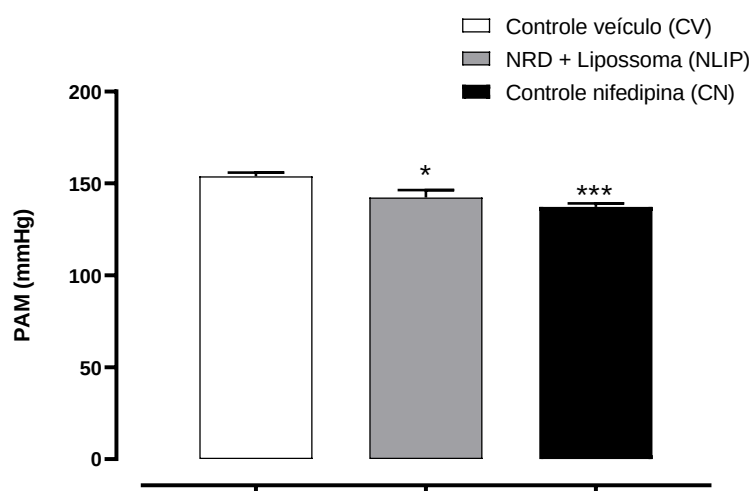


Figura 26: Efeito do tratamento oral com NRD complexado em lipossoma (NLIP) (200 mg/kg, $n = 5$), controle veículo (CV) e controle nifedipina (CN) (10 mg/kg, $n = 5$) sobre a PAM de ratos hipertensos (L-NAME) após 48 h. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ NLIP, CN vs CV.

Nesse sentido, estudos têm mostrado melhorias significativas nas propriedades farmacológicas dos terpenos quando encapsulados em lipossomas, inclusive em relação à duração dos efeitos. Um estudo com lipossoma observou que a incorporação do NRD em ciclodextrina e lipossoma protegeu o nerolidol da fotodegradação e estendeu a liberação de forma eficaz (AZZI et al., 2018). Hammoud et al (2021) observou que o α -pineno, ao ser encapsulado em lipossomas convencionais (CLs) e no sistema droga-em-ciclodextrina-em-lipossomas (DCLs), apresentou resultados positivos quanto a liberação gradual do monoterpeno. Os DCLs também melhoraram o encapsulamento de componentes do eugenol (SEBAALY et al., 2016), trans-anetol (GHARIB et al., 2017), estragol (GHARIB et al., 2019) e timol (HAMMOUD et al., 2020) retardando a liberação do fármaco e prolongando o efeito biológico.

Na terapia do câncer, o estudo Jaradat et al. (2022) objetivou encapsular o quimioterápico paclitaxel (PXT) e direcionar a entrega de drogas na quimioterapia através do uso de nanopartículas lipídicas (LNPs), assim sendo, os NPs apresentaram baixos valores de

índice de polidispersão (PDI), alta homogeneidade e boa estabilidade. Em consonância, Kunstfeld e colaboradores (2003) demonstraram que o paclitaxel encapsulado em lipossomas preveniu o crescimento e a invasão do melanoma influenciando na melhora e sobrevivência de camundongos. Wi e colaboradores (2020) observaram que ao utilizar lipossomas para encapsular nanoemulsões de linalol (LN-NEs) e a doxorubicina (DOX) os resultados foram positivos, quanto ao crescimento do tumor no câncer epitelial de ovário (EOC). Assim como, LUO et al. (2016) observou que ao utilizar lipossomas multivesiculares para o ácido oleanólico (OA-MVLs) foi possível superar sua baixa solubilidade, prolongar os níveis terapêuticos e aumentar o efeito antitumoral no carcinoma hepatocelular.

Por fim, tendo em vista que um tratamento farmacológico objetiva a administração de um fármaco com grande eficácia na menor dosagem possível, reduzindo assim, possíveis efeitos adversos (GOLAN et al., 2014; RANG et al., 2015; SILVA et al., 2018). E que atualmente alguns fármacos comumente utilizados apresentam como reação adversa a taquicardia, a redução da FC mostra-se como um importante fator do tratamento anti-hipertensivo, que deve ser levado em conta ao pesquisar novas substâncias farmacológicas (ALVES et al., 2016). Sendo assim, os resultados relatados no estudo (**Figura 24 e 25**) demonstram as primeiras ações do nerolidol complexado em lipossoma em um modelo animal de hipertensão. Observa-se que a ação do complexo NLIP foi mais efetiva e duradoura quando comparada com o controle nifedipina, sendo seu efeito anti-hipertensivo prolongado até 48h (**Figura 26**). Todavia, o NRD e NLIP apresentaram efeitos semelhantes (**Figura 24 e 25**).

Diante dos resultados expostos, observa-se a importância da presente pesquisa para o estudo dos efeitos cardiovasculares do nerolidol e seu complexo em lipossoma no que se refere ao avanço do tratamento da HAS.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, mais estudos são necessários para investigar os efeitos do nerolidol sobre o sistema cardiovascular, por exemplo, como perspectivas, pode ser realizada a análise farmacocinética do nerolidol puro e complexado em lipossoma, a análise da reatividade vascular, análise do barorreflexo e modulação autonômica. Bem como, a complexação do nerolidol em outros sistemas de veiculação de fármacos buscando a melhora de seu perfil farmacológico.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a ação hipotensora e bradicárdica do nerolidol em animais hipertensos. No tratamento intravenoso, a hipotensão gerada pelo NRD indica a possível participação dos receptores muscarínicos, receptores nicotínicos e dos metabólitos da ciclooxigenase nesse efeito. No que diz respeito à bradicardia induzida pelo NRD houve uma possível participação dos receptores muscarínicos, dos receptores nicotínicos e do NO nessa resposta.

Quando comparado ao grupo controle o tratamento oral com nerolidol puro apresentou uma redução da pressão arterial nos tempos iniciais, com uma estabilização nos tempos médios e queda nos tempos finais. No tratamento com o nerolidol complexado em lipossoma houve uma redução da pressão arterial nos tempos finais. O grupo tratado com nifedipina apresentou uma redução significativa na pressão arterial nos tempos iniciais. Ademais, o nerolidol puro e o nerolidol complexado em lipossoma promoveram uma redução na FC em 2h após a administração do tratamento que perdurou até as 48h, contrastando com outros fármacos da literatura, a exemplo da nifedipina. Quando comparado ao grupo nifedipina o tratamento oral com nerolidol complexado em lipossoma apresentou uma redução da pressão arterial nos tempos iniciais, com uma estabilização nos tempos médios e queda em 48h. Assim como, houve uma redução da FC nos tempos finais. Sendo demonstrado dessa maneira que o presente estudo corroborou para um promissor tratamento da hipertensão arterial.

Diante do exposto, é notório a importância da pesquisa para a análise dos efeitos cardiovasculares do nerolidol e seu complexo em lipossoma no que se refere ao avanço no tratamento da hipertensão arterial, desta forma, o presente estudo abre caminho para novas pesquisas que comprovem os efeitos resultantes dos produtos naturais pertencentes à classe dos terpenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, W. B. Pathophysiology of hypertension in older persons. The American **Journal of the Medical Sciences**. Vol. 85, p 7-12. 1988.

AFOULOUS, S. et al. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food Chem Toxicol**, v. 56, p. 352-62, 2013.

AHA. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A report From the American Heart Association. **Circulation**. v.147, ed. 8.

AHUJA, Y. R.; SHARMA, S.; MOHAN, V. Cardiovascular diseases: Interplay of epigenetics. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2017.

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

AL-MALLAH, M. H.; SAKR, S.; AL-QUNAIBET, A. Cardiorespiratory Fitness and Cardiovascular Disease Prevention: an Update. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 20, n. 1, 2018.

ALVES, Q. L.; SILVA, D. F. D-limonene: A promising molecule with bradycardic and antiarrhythmic potential. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 5, p. 933–934, 2019.

ALVES-SILVA, J. M. et al. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 40, p. 4559–4600, 2016.

ANDRADE, F.C., et al. Antihypertensive therapeutic potential of citronellal. **Lat. Am. J. Pharm.** v.31, 767–771, 2012.

ANJOS, P.J.C., et al. **Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. Zeitschrift für Naturforschung C.** v.68, p.181–190, 2013.

ARAUJO, T. L.; ACURI, E. A. M. Influência de fatores anátomo-fisiológicos na medida indireta da pressão arterial: identificação do conhecimento dos enfermeiros. **Revista Latino-Americana Enfermagem**. Vol.6, n.4. Ribeirão Preto/SP, 1998.

ASAIKUMAR, L. et al. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. **Drug Development Research**, v. 80, n. 6, p. 814–823, 2019.

AZZI, J. et al. First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol. **Food Chemistry**, v. 255, p. 399–404, 2018.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1965.

BARROSO, W. K. S. et al. Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.

BASTOS J.F, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v.106, n.4, p.331-7, 2010.

BEEVERS, D. G.; LIP, G. Y. H.; O'BRIEN, E. **ABC of Hypertension**. Editora: Blackwell Pub., Malden, Mass. 5º edição, v. 4, n.12, 2007.

BEZERRA, C. F. et al. Antifungal properties of nerolidol-containing liposomes in association with fluconazole. **Membranes**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2020.

BIELLI, A.; SCIOLI, M. G.; MAZZAGLIA, D.; DOLDO, E.; ORLANDI, A. Antioxidants and vascular health. **Life Sciences**, v. 143, p. 209–216, 2015.

BOLOTINA, B.M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368: 850-3, 1994.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 975, 2015.

BRANDL, M. et al. Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 14, p. 2167-2191, 1990.

BRUNTON, L.; CHABNER, B. e KNOLLMAN, B. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. **McGraw-Hill Education**, 2011.

BUDAI, M.; SZOGYI, M. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v. 71, n. 1, p. 114- 118, 2001.

BURNIER, M. Controversies in the management of patients with arterial hypertension. **Kardiologia Polska**, v. 77, n. 10, p. 902–907, 2019.

BUUSE, M.V. Effect of Atropine or Atenolol on Cardiovascular Responses to Novelty. **Stress**. v.5, n.3, p. 227-231, 2002.

BUUSE, M.V. et al. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological novelty stress in freely moving rats. **Psychophysiology**, v. 38, p. 490–499, 2001.

ÇAKMAK, H. A.; DEMIR, M. Microrna and cardiovascular diseases. **Balkan Medical Journal**, v. 37, n. 2, p. 60–71, 2020.

CAMARGO, S.B. et al. Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochem. Pharmacol.** v.151, p.38–46, 2018.

CAREY, R. M. et al. Prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: Synopsis of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 168, n. 5, p. 351–358, 2018.

CARVALHO, M. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Fortes ZB. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, 2001.

CHAN, W. K. et al. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**. v. 21, n.5, p. 529, 2016.

CHANG, Hsin-I.; YEH, Ming-Kung. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 49, 2012.

CHOY, K.W.; MURUGAN, D.; MUSTAFA, M. R. Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**, v. 132, p. 119–129, 2018.

CLAGUE R.U, et al. Action of agonists and antagonists at muscarinic receptors present on ileum and atria in vitro. **Br J Pharmacol**. v. 86, n.1, p.163-70, 1985.

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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473–1479, 1997.

COHAN, J.A., CHECCIO, L.M. Nifedipine in the management of hypertensive emergencies: report of two cases and review of the literature. **Am. J. Emerg. Med.** v.3, p.524–530, 1985.

CUNHA, P.S. **Efeito vasorelaxante dos isômeros (+) e (-)- linalol em artéria mesentérica de rato**. Tese de mestrado, Universidade federal de Sergipe-Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa em ciências fisiológicas, p. 75, 2013.

CUNHA, R. M. D.A et al. Cardiovascular Effects Induced in Rats by the Essential Oil of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p. 12–18, 2004.

DANTAS, R.C.O.; RONCALLI, A.G. Protocolo para indivíduos hipertensos assistidos na Atenção Básica em Saúde. **Ciênc. saúde colet.**, v. 24, n. 1, p. 295 – 306, 2019.

DAVIDSON, R. N. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 87, n. 2, p. 75-81, 1994.

DIAS, K. L. et al. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 328–333, 2004.

EL-HAMMADI, M.M; ARIAS, J.L. An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 29, n. 11, p. 891-907, 2019.

EPHREM, E. et al. Use of free and encapsulated nerolidol to inhibit the survival of *Lactobacillus fermentum* in fresh orange juice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 1107-95, 2019.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e Sociedade**. v. 39, n.2, p. 120–130, 2017.

FONSECA, B.C. et al. Antifungal Properties of Nerolidol-Containing Liposomes in Association with Fluconazole. **Membranes**, v. 10, 2020.

FONSÊCA, D. V. et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 14–22, 1 fev. 2016.

FÖRSTERMANN U, MÜNZEL T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*.; v. 113, n.13, p.1708-14, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRAGA, B. P. **Obtenção e avaliação farmacológica de complexos de inclusão (geraniol em beta-ciclodextrina) sobre o sistema cardiovascular de ratos**. Tese (doutorado em Biotecnologia) -Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2013.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis factor is inorganic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed.). **Vasodilation**. New Yor, Raven, v.401, n.4, 1988.

GALVÃO, R. R. S.; SOARES, D. A. Prevalência De Hipertensão Arterial E Fatores Associados Em Adultos: Uma Revisão Na Literatura Brasileira. **Rev. APS**. v. 19, n. 1, p. 139–149, 2016.

GARCIA, V.; SESSA, W.C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **British Journal Of Pharmacology**, v. 176, n. 2, p.189-196, 2018.

GEWEHR, D. M. et al. Adesão ao tratamento farmacológico da hipertensão arterial na Atenção Primária à Saúde. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 116, p. 179–190, 2018.

GHARIB, R. et al. Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes as a Carrier System for Volatile Essential Oil Components: Application to Anethole. **Food Chem.** 218, 365–371, 2017.

GHARIB, R. et al. First Study on the Release of a Natural Antimicrobial Agent, Estragole, from Freeze-Dried Delivery Systems Based on Cyclodextrins and Liposomes. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** 52, 794–802, 2019.

GIROTTI, S.M.; SILVA, D.T.; CARAMASCHI, S. Arterial Hypertension and Health Care: Conceptions of Men and Woman. **Psicologia, Saúde & Doenças**, v. 19, n. 2, p. 435–452, 2018.

GOLAN D. E. et al. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. Guanabara Koogan, 2009.

GONÇALVES, M. S. S. **Ação do Nerolidol Sobre o Sistema Cardiovascular e Efeito Cardioprotetor no Tratamento Agudo do Infarto do Miocárdio**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Sergipe - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia p. 0–64, 2020.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. ed. **United States of America: McGraw Hill**, 2006.

GOUVEIA, F.S.J. **Novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos: síntese, caracterização e avaliação do potencial terapêutico**. Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

HAMMOUD, Z. et al. Drug-in-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-in-Lipoid S100/Cholesterol Liposomes: Effect of the Characteristics of Essential Oil Components on Their Encapsulation and Release. **Int. J. Pharm.** 579, 119151, 2020.

HAMMOUD, Z. et al. Encapsulation of α -Pinene in Delivery Systems Based on Liposomes and Cyclodextrins. **Molecules**. V.26, p.6840, 2021.

HANN, I.M.; PRENTICE, H.G. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 3, p. 161-169, 2001.

HARASHIMA, H. et al. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 3, p. 402- 406, 1994.

HARVEY, R.D. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. In: Fryer, A.D., Christopoulos, A., Nathanson, N.M. (Eds.), *Muscarinic Receptors*. **Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg**, p. 299–316, 2012.

HE, X. et al. Correlation between Chemical Composition and Antifungal Activity of Clausena lansium Essential Oil against *Candida* spp. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1394, 2019.

HERING, D.; TRZEBSKI, A.; NARKIEWICZ, K. Recent advances in the pathophysiology of arterial hypertension: Potential implications for clinical practice. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 127, n.3, p. 195–204, 2017.

HONG, D.; SHAN, W. Improvement in Hypertension Management with Pharmacological and Non- Pharmacological Approaches: Current Perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 4, p. 548–555, 2020.

HOOVER, D.B., BAISDEN, R.H., XI-MOY, S.X. Localization of muscarinic receptor mRNAs in rat heart and intrinsic cardiac ganglia by in situ hybridization. **Circ. Res.** v.75, p.813–820, 1994.

HOPE, M. J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 812, n. 1, p. 55-65, 1985.

HUA, F. et al. **Immune Signaling and Autophagy Regulation**. *Adv Exp Med Biol*. v. 1206, p.551-593, 2019.

IGNARRO L.J. et al. Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad**, 1987.

INTERAMINENSE, L.F. et al. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Planta Med.** v.71, p.376–378, 2005.

IQUBAL, Ashif et al. Nerolidol attenuates cyclophosphamide-induced cardiac inflammation, apoptosis and fibrosis in Swiss Albino mice. **European Journal of PHARMACOLOGY**, V. 863, P. 1726-66, 2019.

IRISAWA, H., BROWN, H.F., GILES, W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. **Physiol. Rev.** v.73, p.197–227, 1993.

ISHII, H., ITOH, K., NOSE, T. Different antihypertensive effects of nifedipine in conscious experimental hypertensive and normotensive rats. **Eur. J. Pharmacol.** 64, 21–29, 1980.

JACKSON, W.F. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173–178, 2000.

JARADAT, E. et al. Microfluidic paclitaxel-loaded lipid nanoparticle formulations for chemotherapy. **International Journal of Pharmaceutics.** v.628, 2022.

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 Visualized Experiments**, n. 59, p. 1–8, 2012.

JOHNSON, S. M. et al. Single bilayer liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 233, n. 3, p. 820-826, 1971.

JORDAN, J.; KURSCHAT, C.; REUTER, H. Arterial hypertension-diagnosis and treatment. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 115, n. 33–34, p. 557–558, 2018.

KANETO, C. M. et al. Circulating miRNAs as biomarkers in cardiovascular diseases. **European Review for medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2234–2243, 2019.

KARUNATHILAKE, S. P.; GANEGODA, G. U. Secondary Prevention of Cardiovascular Diseases and Application of Technology for Early Diagnosis. **BioMed Research International.** v.2, p. 1-9, 2018.

KIYAMA, RYOITI. Estrogenic terpenes and terpenoids: pathways, functions and applications, *European Journal of Pharmacology*. **European Journal of Pharmacology.** v.815, n.15, p. 405-415, 2017.

KRASI, G. et al. Genetics and pharmacogenetics in the diagnosis and therapy of cardiovascular diseases. **Acta Biomedica**, v. 90, n.4, p. 7–19, 2019.

KRIEGER, E.M; IRIGOYEN, M.C; KRIEGER, J.E. Fisiopatologia da Hipertensão. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 1999.

KYLE, S.; SAHA, Sikha. Nanotechnology for the detection and therapy of stroke. **Advanced healthcare materials**. v. 3, n. 11, p. 1703-1720, 2014.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1125–1131, 2002.

LAI, W.F., WONG W.T., ROGACH A.L. Molecular Design of Layer-by-Layer Functionalized Liposomes for Oral Drug Delivery. **ACS Appl Mater Interfaces**. v.12, n.39, p.43341-43351, 2020.

LAL C., GARG R., GUPTA G.D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Nifedipine Loaded Microspheres for the Treatment of Hypertension. **Curr Drug Deliv**. v.18, n.1, p.65-70, 2021.

LAMICHHANE, Narottam et al. Liposomes: clinical applications and potential for imageguided drug delivery. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 288, 2018.

LASON, E. Topical administration of terpenes encapsulated in nanostructured lipid-based systems. **Molecules**, v. 25, n. 23, 2020.

LEE C.N., et al. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. **Planta Med**. v. 67, n.9, p. 796–9, 2001.

LI, Xinming et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of drug targeting**, v. 25, n. 1, p. 17-28, 2017.

LIA, C.; BRANDELLI, C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação**. Editora: Artmed. Páginas: 172. ISBN; 9788582714409, 2017.

LILA, A.S.A.; ISHIDA T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biol. Pharm. Bull**. v.40, 1–10, 2017.

LIN, Y. M. et al. Nerolidol improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats by inhibiting cardiac inflammation and remodelling associated TLR4/ NF- κ B signalling cascade. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 147, 2021.

LIU, M.; LI, Z.; WANG, H.; DU, S. Increased cutaneous wound healing effect of biodegradable liposomes containing madecassoside: Preparation optimization, in vitro dermal permeation, and in vivo bioevaluation. *Int. J. Nanomed.* 11, 2995–3007, 2016.

LOBO, L. A. C. et al. Tendência temporal da prevalência de hipertensão arterial sistêmica no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 33, n. 6, 2017.

LOGANATHAN, L. et al. Computational and Pharmacogenomic Insights on Hypertension Treatment: Rational Drug Design and Optimization Strategies. *Current Drug Targets*, v. 21, n. 1, p. 18–33, 2019.

LUCENA, J. A.S.; GUEDES, J. P.M. Uso de fitoterápicos na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, p. 15–22, 2020.

LUO, Y. et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*. V.11, 2016.

MAESTRELLI, F. et al. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. v.312, p. 53-60, 2006.

MASSERINI, Massimo. Nanoparticles for brain drug delivery. *International Scholarly Research Notices*, v. 2013, 2013.

McARDLE, W. D; KATCH, F. I; KATCH, V. L. **Consumo de energia humana durante o repouso e a atividade física.** In: *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. 8ª ed., Ed. Guanabara Koogan, RJ/RJ. 2016.

MEERAN, M. F. N. et al. Nerolidol, a Sesquiterpene from the Essential Oils of Aromatic Plants, Attenuates Doxorubicin-Induced Chronic Cardiotoxicity in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 26, p. 7334–7343, 2021.

MENEGATTI R, et al. Novel choline analog 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol produces sympathoinhibition, hypotension, and antihypertensive effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v.392, n.9, p.1071-1083, 2019.

MENEZES, I.A.C. et al. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C **Journal of Biosciences**, v. 65 C, n. 9– 10, p. 562–566, 2010.

MENGUE, S. S. et al. Access to and use of high blood pressure medications in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n.2, p. 1–9, 2016.

MENSAH, G. A.; ROTH, G. A.; FUSTER, V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 20, p. 2529–2532, 2019.

MILLER, M.R; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal Of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p.305-321, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE, “**Usar o coração para cada coração**”. 2022. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/usar-o-coracao-para-cada-coracao-29-9-dia-mundial-do-coracao/>. Acesso: dia 22 de junho de 2023, às 23:00 horas.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. Trends in **Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 12–16, 1984.

MOMBOULI, J.M, VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol.** v.31, p.61-74, 1999.

MOMBOULI, J.M; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol Sci** v.18, p.252-6, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of medicine.** v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, n. 4, p. 361–374, 1991.

MOREIRA, F. V. **Efeitos cardiovasculares do citral, monoterpene majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, em ratos.** Tese de doutorado em Ciências da Saúde. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2013.

MOREIRA, F.V., BASTOS, J.F.A., BLANK, A.F., ALVES, P.B., SANTOS, M.R.V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, p.904–909, 2010.

MOREIRA, I. J. A. 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, 2016.

MOURA, D. F. et al. Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antibiofilm activity of the sesquiterpene nerolidol. **Archives of microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4303–4311, 1 set. 2021.

MYSLIVECEK J, TROJAN S. Regulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in the heart. **Gen Physiol Biophys**. v.22, n.1, p. 3-14, 2003.

NEVES, M.T. et al. Uso da tecnologia de lipossomas no encapsulamento de compostos bioativos - Revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC**, vol. 07, n.04, 2021.

NOGUEIRA NETO, J. D. et al. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. **Neurochemical research**, v. 38, n. 9, p. 1861–1870, set. 2013.

NOONE, C. et al. Comparative effectiveness of physical activity interventions and anti-hypertensive pharmacological interventions in reducing blood pressure in people with hypertension: Protocol for a systematic review and network meta-analysis. **Systematic Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

NUNES, P. S. et al. Collagen-Based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **J Biomed Biotechnol**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

OHN, H. C. Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. **Experiental Physiology**. No 92, p 3-18. 2007.

OMBONI, S.; VOLPE, M. Management of arterial hypertension with angiotensin receptor blockers: Current evidence and the role of olmesartan. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 1–12, 2018.

PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. **Nature**. v.333, p.664-6, 1988.

PANENI, F. et al. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 15, p. 1952–1967, 2017.

PAULINO, E.T. **Efeito cardioprotetor do apha-terpineol em ratos infartados**. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

PAULO, M. **Efeito vasodilatador do óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq) NO]⁺3 em veia cava e artéria basilar de ratos normotensos e hipertensos renais 2R1C**. 2011. Tese de Doutorado na Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, São Paulo, 2011.

PEPINE, C. J.; The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. **J Med.**, v. 122, p. 10-5, 2009.

PEREIRA, A.S. et al. Factors associated with non-adherence to treatment of hypertension: an integrative review. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, v. 8, n. 1, p. 4047–4055, 2016.

PETERSON, G.L. et al. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.81, p.4993–4997, 1984.

PONTREMOLI R., LEONCINI G., PARODI A. Use of nifedipine in the treatment of hypertension. **Expert Rev Cardiovasc Ther.** v.3, n.1, p. 43-50, 2005.

PRANDO, T. B. L. et al. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249–1258, 2016.

RAMESHRAD, M.; BABAEI, H.; AZARMI, Y.; FOULADIA, D. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivostudies. **Life Sciences**, v. 145, p. 190–204, 2016.

RANG, H.P. et al. Farmacologia. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 7ed., 2011.

REMONDINO, A. et al. β -Adrenergic Receptor–Stimulated Apoptosis in Cardiac Myocytes Is Mediated by Reactive Oxygen Species/c-Jun NH₂-Terminal Kinase–Dependent Activation of the Mitochondrial Pathway. **Circulation Research**, v. 92, n. 2, p. 136–138, 2003.

RIBEIRO, M. O. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, n. 3, p. 298–303, 1992.

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**. Tese de mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. p. 49, 2018.

RODRIGUES, Karilane Maria Silvino. **Ação do Linalol sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos**. 2010. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Campus Fortaleza, Fortaleza, 2010.

RODRIGUES, R. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ISBN 85-334-1092-1. Textos Básicos de Saúde, 2006.

RUKUNGA, G. M. et al. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 188-90, Abr 2008.

SAKAI, K. et al. Overexpression of eNOS in NTS Causes Hypotension and Bradycardia In Vivo. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1023–1028, 2000.

SANDOO, A. et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 302, 26 fev. 2010.

SANTANA, B.S.; RODRIGUES, B.S.; STIVAL, M.M.; VOLPE, C.R.G. Hipertensão arterial em idosos acompanhados na atenção primária: perfil e fatores associados. **Esc Anna Nery.**, v. 23, n. 2, p. 1- 8, 2019.

SANTANA, I. R. **Efeito Vasorelaxante do nerolidol em artéria mesentérica superior de ratos**. Universidade Federal de Sergipe. Trabalho de conclusão de curso, centro de ciências biológicas e da saúde, 2022.

SANTANA, L. M. B; BORGES, J. C; ASSIS, K. M. A. Incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) em novos sistemas de liberação. **II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**. 2017.

SANTOS, M.E.P., et al. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **J. Ethnopharmacol.** v.164, p.120–128, 2015.

SATIN, J.; SCHRODER, E.A.; CRUMP, S.M. L-type calcium channel auto-regulation of transcription. **Cell Calcium**, v. 49, n. 5, p. 306-13, 2011.

SCHER, A. Textbook of physiology, circulation, respiration, body fluids, metabolism, and endocrinology. **W. B. Saunders Company (Philadelphia)**. p 972-990. 1989.

SCHERPHOF, G.L. et al. Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat kupffer cells in vivo and in vitro a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 446, n. 1, p. 368-384, 1985.

SCHULZ, R., TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacol. Sci.** v.15, p.255–259, 1994.

SEBAALY, C. et al. Clove Essential Oil-in-Cyclodextrin-in-Liposomes in the Aqueous and Lyophilized States: From Laboratory to Large Scale Using a Membrane Contactor. **Carbohydr. Polym.** 138, 75–85, 2016.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, 154, 123–140, 1997 .

SILVA, E.A.P. **Efeito hipotensor do farnesol complexado em β -ciclodextrina em modelo animal de hipertensão arterial**. Tese de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe. p. 61, 2018.

SILVA, E.A.P. et al. Cardiovascular effects of farnesol and its β -cyclodextrin complex in normotensive and hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 901, n.32, 2021.

SILVA, E.A.P. et al. The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: a patent review (2008–2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 1, p. 43–53, 2019.

SILVA, M.P. et al. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 3, p. 467–472, 2017.

SIQUEIRA, P.S.L. et al. β -Cyclodextrin Complex Containing Lippia grata Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice – Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 188–196, 2014.

SIQUEIRA, R. J. B. et al. Cardiovascular effects of essential oil of Croton zehntneri leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci.**, 78: 2365-2372, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. I–III, 2010.

SOUSA, A. C. **Hipertensos diabéticos e o risco de doenças cardiovasculares: uma coorte histórica**. Tese de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, 2016.

SOUSA, I. M. C.; TESSER, C. D. Traditional and complementary medicine in brazil: Inclusion in the Brazilian unified national health system and integration with primary care. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 1–15, 2017.

SOUZA, J. B. P. et al. Interações planta medicinal x medicamento convencional no tratamento da hipertensão arterial. **Infarma Ciências farmacêuticas**, v. 29, n. e2, p. 90–99, 2017.

SOUZA, J.B. et al. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais encapsulados em lipossomas. **I congresso internacional das ciências da saúde**. 2019.

STEVENS, B. et al. The economic burden of heart conditions in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 1, p. 29–36, 2018.

SU, J.B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World J Cardiol.**, v. 7, n. 11, p. 719-41, 2015.

SUBONGKOT, T.; WONGLERTNIRANT, N.; SONGPRAKHON, P.; ROJANARATA, T.; OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T. Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. **Int. J. Pharm**, v.441, p.151–161, 2013.

SUBRAMANI, T.; GANAPATHYSWAMY, H. An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. **Journal of food Science and technology**, v.57, n.10, p.3545–3555, 2020.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. **Journal of Physiology**. v. 504, n. 2, p. 479–488, 15 out. 1997.

TAYLOR, S.G. et al. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalin. **Br J Pharmacol**. v.94, p.853- 63, 1988.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

TOUSOULIS et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current Vascular Pharmacology**, v. 10, n. 1, p.4-18, jan. 2012.

TSIOUFIS, C.; THOMOPOULOS, C. Combination drug treatment in hypertension. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 266–271, 2017.

UCCOLO, E. et al. Acetylcholine induces intracellular Ca²⁺ oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. **Cell Calcium**. v. 66, p. 33–47, 2017.

USACH, I. et al. Comparison between Citral and Pompia Essential Oil Loaded in Phospholipid Vesicles for the Treatment of Skin and Mucosal Infections. **Nanomaterials**. v.10, p. 286, 2020.

VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. The Netherlands, **Harwood Academic Publishers**, p.1-305, 1999.

VÁZQUEZ, K.G.N; ULIBARRI, M.V. The patient with hypertension and new guidelines for therapy. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 32, n. 3, p. 421–426, 2019.

VENTURA A. L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Rev. Psiq. Clín.** V.37, n.2, p. 66-72, 2010.

WERMELT, J. A.; SCHUNKERT, H. Management of arterial hypertension. **Herz**, v. 42, n. 5, p. 515–526, 2017.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T.A. **Farmacologia ilustrada**. 6. ed. p.680, Porto Alegre: Artmed, 2016.

WOODLE, Martin C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 249-265, 1995.

WOODWARD, D. F.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 3, p. 471–538, 2011.

YOSHIDA, T.; Owens, G.K. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. **Circ. Res.** v. 96, n. 3, p. 280-291, 2005.

YU, L. et al. Time course change of COX2-PGI2/TXA2 following global cerebral ischemia reperfusion injury in rat hippocampus. **Behavioral and Brain Functions**, v. 10, n. 1, p. 42, 2014.

YUAN, H. et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZHANG, Y. et al. The Influence of Sex on Cardiac Physiology and Cardiovascular Diseases. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 13, n. 1, p. 3–13, 2020.

ZHAO, Y. et al. Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p.10848-10854, 2000.

ANEXOS



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DO NEROLIDOL EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL", protocolada sob o CEUA nº 3941310521 (ID 000339), sob a responsabilidade de **André Sales Barreto** - 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 16/06/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ACUTE EFFECT OF NEROLIDOL IN ANIMAL MODEL OF ARTERIAL HYPERTENSION", utilizing 42 Heterogenics rats (42 males), protocol number CEUA 3941310521 (ID 000339), under the responsibility of **André Sales Barreto** - 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 06/16/2021.

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

Vigência da Proposta: de [08/2021](#) a [07/2022](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - LAFAC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [42](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 310 g](#)

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

São Cristóvão, 03 de novembro de 2021

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

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador 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 HIPOTENSOR DO NEROLIDOL PURO E COMPLEXADO EM LIPOSSOMA EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO", protocolada sob o CEUA nº 7471310521 (ID 000374), sob a responsabilidade de **André Sales Barreto** - 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 02/09/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE HYPOTENSIVE EFFECT OF PURE AND COMPLEXED NEROLIDOL IN LIPOSSOME IN ANIMAL HYPERTENSION MODEL", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 7471310521 (ID 000374), under the responsibility of **André Sales Barreto** - 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 09/02/2021.

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

Vigência da Proposta: de [08/2021](#) a [07/2022](#)

Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - LAFAC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [24](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 310 g](#)

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

São Cristóvão, 05 de novembro de 2021

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