



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos cardiovasculares do 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno
e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno, dois derivados do 1-
nitro-2-feniletano, em ratos hipertensos anestesiados**

Thayane Rebeca Alves dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

Recife 2013

Thayane Rebeca Alves dos Santos

Efeitos cardiovasculares do 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno, dois derivados do 1-nitro-2-feniletano, em ratos hipertensos anestesiados

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Fisiologia e Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

Recife 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Thayane Rebeca Alves dos

Efeitos cardiovasculares do 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno, dois derivados do 1-nitro-2-feniletano, em ratos hipertensos anestesiados/ Thayane Rebeca Alves dos Santos– Recife: O Autor, 2013.

103 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Mohammed Saad Lahlou

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia e anexo

1. Pressão arterial 2. Hipertensão 3. Farmacologia cardiovascular I. Lahlou, Mohammed Saad (orientador) II. Título

612.14

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 178

Thayane Rebeca Alves dos Santos

“Efeitos cardiovasculares do 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno, dois derivados do 1-nitro-2-feniletano, em ratos hipertensos”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou
Presidente

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira

Data: 15 / 08 / 2013

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. É Dele as vitórias alcançadas em minha vida.

A toda minha **família** pela força e compreensão, especialmente aos meus pais **Luciane** e **Paulo Ricardo**, minha irmã **Chayane** e minha avó **Marlene**, que são meu porto seguro e razão de minha existência e sucesso profissional. Sem eles não teria força para vencer os obstáculos e desafios nessa jornada. Amo vocês.

Ao meu noivo **Anderson** pelo apoio incondicional.

Aos meus **amigos** e a **todos** que estiveram ao meu lado durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela sua presença constante em minha vida e por ter me concedido saúde, força e determinação para concluir mais esta etapa.

Aos meus orientadores **Prof. Dr. Saad Lahlou** e **Profª. Dra. Glória Isolina B. P. Duarte** pela paciência, credibilidade e incentivo dispensados no decorrer do trabalho. Pelos conhecimentos a mim fornecidos que muito contribuíram para minha formação acadêmica. Para mim, foi uma grande satisfação e orgulho ser orientada por vocês. Obrigada por tudo.

A **Profª. Dra. Cristina de Oliveira Silva** e ao **Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier** pela atenção, disponibilidade e apoio demonstrados.

Ao meu amigo **Odair Alves** pela amizade e dedicação de seu tempo, compartilhando sua experiência e me ajudando a superar os desafios encontrados no desenvolvimento deste projeto.

Aos **amigos** do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular e de Reatividade Vascular pela colaboração na execução do trabalho e pelas palavras de incentivo.

“Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para o meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.”

Augusto Branco

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas inacreditáveis.”

José de Alencar

RESUMO

Previamente, foi mostrado por nossa equipe de pesquisa que o 1-nitro-2-feniletano (NF), o principal constituinte do óleo essencial de *Aniba canellila*, uma planta nativa da Amazônia, reduz a pressão arterial e possui efeitos vasorrelaxantes. Mais recentemente, foi observado que o 1-nitro-2-feniletano (NFE), um derivado obtido de maneira sintética através de restrição conformacional da molécula do NF, possui uma potência 3 a 4 vezes maior para relaxar preparações isoladas de aorta torácica de rato em comparação ao NF (de origem natural). No presente estudo, visando melhorar a interação fármaco-receptor, nós investigamos os efeitos cardiovasculares de dois derivados do NFE, o 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno (derivado I com grupamento metoxila) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno (derivado II com grupamento dimetilamina) em ratos espontaneamente hipertensos. Sabe-se que os grupamentos metoxila e dimetilamina são elétrons-doadores e podem alterar o aspecto eletrônico da molécula do NFE. Dados preliminares mostram que injeções intravenosas em *bolus* do NFE e dos derivados I e II induziram efeito hipotensor e bradicardizante bifásicos (fase 1 rápida e fase 2 mais tardia). A fase 1 da hipotensão e bradicardia tende a ser reduzida ou abolida após a bivaotomia e o tratamento perineural dos vagos com capsaicina (250 µg/mL). A magnitude da segunda hipotensão (fase 2) tende a ser 3-4 vezes maior para os derivados I e II comparada ao NFE. Os dados dos experimentos *in vitro* mostram que derivados I e II induziram vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior, pré-contraídas com fenilefrina (1 µM) com valores de CI_{50} [(média geométrica - intervalo de confiança de 95%)] de 22,41 [27,52-15,23] e 17,13 [31,29-11,82] µM, respectivamente. Estes efeitos vasorrelaxantes não foram influenciados pela remoção do endotélio vascular, portanto foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com o ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona, 10 µM), um inibidor da guanilato ciclase. Além disso, foi mostrado que a potência dos derivados I e II (avaliada através dos valores da CI_{50}) em relaxar preparações de SMA de ratos SHR foi aumentada em comparação ao NFE (37,95 [95,83-17,74] µM). Apesar de que este aumento não atingiu nível de significância, é interessante correlacioná-lo com a aparente amplificação da resposta hipotensora da fase 2 induzida pelos os derivados I e II em relação ao NFE. Em conclusão, os derivados I e II, assim como o NFE, induziram um reflexo depressor e bradicardizante vago-vagal (fase 1). A hipotensão tardia (fase 2) parece ser resultante de um efeito vasodilatador por um mecanismo miogênico independente da integridade endotelial e parece envolver a participação da via guanilato ciclase/GMPc/PKG.

PALAVRAS-CHAVE: 1-nitro-2-feniletano, artéria mesentérica isolada, ratos espontaneamente hipertensos, reflexo vago-vagal, relação estrutura-atividade

ABSTRACT

Previously, we showed that 1-nitro-2-phenylethane (NP), the main constituent of the essential oil of the *Aniba canellila*, a plant native to the Amazon, lowers blood pressure and induces vasorelaxant effects. Recently, it was reported that 1-nitro-2-phenylethane (NPE), a structural analogue of NP obtained synthetically, was more potent than NP to relax aortic ring preparations than NP (of natural origin). Here, in order to improve drug-receptor interaction, we intended to investigate the cardiovascular effects of two derivatives of NPE, the 1-nitro-2-[(4'-methoxy)-phenyl]-ethane (derivate I) and 1-nitro-2-[(4'-dimethylamine)-phenyl]-ethane (derivate II) in spontaneously hypertensive rats. It is well-known that methoxy and dimethylamine groups are electron donors and can alter the electronic parameters of the molecule of NPE. The present preliminary results showed that intravenous injection of NPE induced two periods of hypotension and bradycardiac (phases 1 and 2). A phase 1 tended to be reduced or even abolished by bivatectomy and perineural treatment with capsaicin (250µg/mL) and magnitude of hypotensive phase 2 induced by derivatives I and II tended to be 3-4 times higher than that evoked by NPE. Derivates I and II relaxed endothelium-intact superior mesenteric artery (SMA) ring preparations pre-contracted with phenylephrine (1 µM) with IC₅₀ (geometric mean [95% confidence interval]) values of 22.41 [27.52-15.23] and 17.13 [31.29-11.82] µM, respectively). These vasorelaxant effects remained unchanged by removal of the vascular endothelium but were significantly reduced by pretreatment with ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-one, 10 µM), an inhibitor of guanylate cyclase. Furthermore, it was shown that potency of the derivatives I and II (as measured by IC₅₀ values) in relaxing preparations SMA was increased when compared to that of NPE. Although this increase did not reach significance level, it is interesting to correlate it with the apparent amplification of the hypotensive phase 2 response induced by both derivatives I and II compared to that NPE. In conclusion, NPE and its two derivatives induced a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex (phase 1). The delayed hypotension (phase 2) seems to result from a vasodilatory effect by a myogenic mechanism independent of endothelial integrity and appears to involve the participation of adenylate cyclase /cGMP/PKG pathway.

KEYWORDS: 1-nitro-2-phenylethane, mesenteric artery isolated, spontaneously hypertensive rats, vago-vagal reflex, structure-activity relationship

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura vascular.....	25
Figura 2. Organização das fibras musculares	26
Figura 3. Célula do músculo liso vascular	26
Figura 4. Contração muscular lisa induzida por um agonista	30
Figura 5. Regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular.....	31
Figura 6. Regulação da contração do músculo liso vascular.....	33
Figura 7. Mecanismos de ação do vasorrelaxamento mediado por nucleotídeos cíclicos.	34
Figura 8. Síntese do NO a partir do aminoácido L-arginina e ação do NO na célula muscular lisa dos vasos	36
Figura 9. Representação esquemática da via neural do barorreflexo na modulação da atividade simpática	40
Figura 10. Folha e flores da <i>Aniba canelilla</i>	45
Figura 11. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano.....	46
Figura 12. Estruturas conformacionais <i>anti</i> e <i>vici</i> do 1-nitro-2-feniletano.....	48
Figura 13. Estrutura dos isômeros <i>trans</i> (A) e <i>cis</i> (B) do 1-nitro-2-feniletano.....	49
Figura 14. Estrutura química dos derivados I (direita) e II (esquerda) do 1-nitro-2-feniletano a serem estudados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	3' 5' - adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Receptores adrenérgicos
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ²⁺	Cálcio
CAP	Capsaicina
CVLM	Região caudal do bulbo ventrolateral
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças cardiovasculares
EAZ	Extrato de <i>Alpinia zerumbet</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
Em	Potencial de membrana
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
EUG	Eugenol
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
GC	Guanilato ciclase
GDP	Difosfato guanosina
GEF	Guanosine nucleotide exchange factor
GMPc	3'5'-guanosina monofosfato cíclico
Gs	Proteína G estimulatória
GTP	Trifosfato de guanosina
HA	Hipertensão arterial
5-HT ₃	Receptor serotoninérgico
IC ₅₀	Concentração que reduz em 50% o efeito máximo
i.v.	Intravenosa

i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio
mAChR	Receptor muscarínico da acetilcolina
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
MLV	Músculo liso vascular
MP	Miosina fosfatase
MPCA	Bomba de cálcio da membrana plasmática
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptor nicotínico da acetilcolina
NFE	1-Nitro-2-feniletano
Nm	Receptores nicotínicos muscular e ganglionar
Nn	Receptores nicotínicos neuronal
NOS	Óxido nítrico sintetase
NTS	Núcleo do trato solitário
ODQ	1H-oxadiazolol[4,3-a] quinoxalina-1-ona
OEAC	Óleo essencial da <i>Aniba canelilla</i>
OEAZ	Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
OECN	Óleo essencial do <i>Croton nepetaefolius</i>
OECZ	Óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i>
OEMV	Óleo essencial da <i>Mentha villosa</i>
OEOG	Óleo essencial do <i>Ocimum gratissimum</i>
OEs	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
OP	Óxido de piperitenona
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PGI ₂	Prostaciclina
Pi	Fosfato inorgânico
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
RBJ	Reflexo cardiopulmonar de Bezold-Jarisch
RhoA	Pequena proteína G monomérica
Rho GEF	Fator de troca do nucleotídeo guanina da RhoA
RhoK	Rho-quinase
ROCCs	Canais para Ca ²⁺ operados por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RVLM	Região rostral do bulbo ventrolateral
RVP	Resistência vascular periférica
RyR	Receptores de rianodina
SCV	Sistema cardiovascular
SERCA	Bomba de cálcio do reticulo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
AMS	Artéria mesentérica superior
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SUS	Sistema Único de Saúde
TPN	Tratamento perineural
TRPV1	Receptores vanilóides tipo 1
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
VOCCs	Canais para Ca ²⁺ operados por voltagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1. Sistema Nervoso Autônomo.....	22
2.2. Acoplamento excitação-contração.....	24
2.3. Relaxamento do músculo liso.....	30
2.4. Regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular.....	32
2.5. Regulação da pressão arterial.....	37
2.6. Plantas aromáticas e óleos essenciais.....	41
2.6.1. <i>Aniba canelilla</i>	44
2.6.1.1 Efeitos cardiovasculares do nitrofeniletano.....	47
3. JUSTIFICATIVA.....	48
4. OBJETIVOS.....	49
4.1 Geral.....	49
4.2 Específicos.....	49
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
5.1. Animais.....	50
5.2. Soluções e Drogas.....	50
5.3. Experimentos “in vitro”.....	51
5.3.1. Estudo de reatividade vascular em anéis de mesentérica superior.....	51
5.3.2. Protocolos experimentais "in vitro".....	51
5.4. Experimentos “in vivo”.....	52
5.4.1. Cateterização dos animais.....	52

5.4.2. Sistema de registro.....	52
5.4.3. Protocolos experimentais “in vivo”.....	52
5.5. Análise estatística.....	53
6. REFERÊNCIAS	54
7. ARTIGO.....	64
8. CONCLUSÕES.....	94
ANEXO.....	95

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é um grande problema de saúde pública com alta prevalência e baixas taxas de controle, sendo um dos fatores de risco mais importante para doença cardiovascular (DCV). No Brasil, inquéritos populacionais sugerem uma prevalência de HA acima de 30% (VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão, 2010). Apesar das recomendações enfáticas de mudanças dos hábitos alimentares e estilo de vida, não há uma grande adesão por parte da população. O uso de plantas indicadas pela crença popular para o tratamento da HA, principalmente na população de baixa renda é muito comum. Tal prática, muitas vezes agrava o quadro do paciente pela conduta empírica e sem acompanhamento adequado.

O uso de plantas ao longo dos séculos para auxiliar o tratamento de várias doenças tem exercido um papel importante na preservação da saúde e faz parte da denominada medicina tradicional, que é baseada nas crenças e práticas que existiam antes do desenvolvimento da medicina moderna, fazendo parte da herança cultural de um povo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é definida como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais de seus órgãos, substâncias bioativas que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (OLIVEIRA & AKISUE, 2009). Segundo a OMS, 80% da população mundial utiliza medicamentos derivados de plantas medicinais (CORRÊA & ALVES, 2008).

No Brasil, cerca de 90% da população já utilizou alguma planta medicinal, o que é justificado pela ampla diversidade vegetal do país, que possui cerca de 23% de todas as espécies vegetais do planeta (CALIXTO, 2003; CORRÊA & ALVES, 2008). As plantas medicinais nas regiões mais pobres e também nas grandes cidades brasileiras são encontradas, em sua grande maioria, nas residências e sua comercialização é feita geralmente em feiras livres e mercados populares. Atualmente, são também comercializadas em farmácias e lojas de produtos naturais (MACIEL et al., 2002; VEIGA et al., 2005). Na medicina caseira, as plantas medicinais são utilizadas na forma de chás, xaropes ou infusões para o tratamento de várias doenças, como inflamações, distúrbios gastrointestinais, dores musculares, gripe e insônia, como também em doenças mais graves, como câncer, transtornos cardiovasculares, obesidade e diabetes (FOGLIO et al., 2006; MACEDO et al., 2007; COSTA-LOTUFO et al., 2010). No entanto, a maioria dos produtos utilizados de forma popular e tradicional como medicamentos

não é licenciada e não possui garantia de qualidade, eficácia e segurança (de SMET et al., 2002; ARGENTA et al., 2011).

Dentre os compostos bioativos mais encontrados nas plantas, incluem-se antioxidantes, vitaminas, carotenóides, ácidos graxos insaturados e açúcares redutores, que podem ser utilizados para diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares, ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (LOZIENE et al., 2007). Ainda, os grupos de compostos mais conhecidos por sua potencialidade farmacológica incluem o ácido cítrico, málico e o tartárico, que têm uma ação laxante e diurética. Os ácidos aromáticos e os seus ésteres são responsáveis por numerosos efeitos farmacológicos. Deste grupo destaca-se o ácido rosmarínico, cumárico e fumárico, que têm ação hepatoprotetora e antioxidante, antisséptica, antifúngica, diurética, analgésica e espasmolítica. Outros compostos são os alcalóides como a piridina, indol, quinolina, isoquinolina e purina, além dos taninos (compostos polifenólicos com afinidade para as proteínas) que possuem ação antibacteriana e antifúngica; os heterósídeos como antocianosídeos, antraquinonas, cardiotônicos, cumarínicos, flavonóides, iridóides, naftoquinonas, saponosídeos e sulfo-heterosídeos (CUNHA, 2006).

Nos últimos anos há uma orientação dos órgãos governamentais para implementar o uso de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fitoterápicos é definido como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefícios para o usuário. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas (Portaria n.6 de 31 de janeiro de 1995)”. Esse último conceito refere-se ao fitofármaco que corresponde à substância ativa pura, isolada de matérias-primas vegetais, ou mesmo a mistura de compostos ativos vegetais, com propriedades farmacológicas (RODRIGUES & CARLINI, 2002; VEIGA et al., 2005). Alguns fatores justificam o uso de fitoterápicos como fonte terapêutica alternativa: os efeitos prejudiciais do uso abusivo ou incorreto de medicamentos sintéticos; a falta de acesso a medicamentos industrializados por grande parte da população, além da consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

Pela diversidade de moléculas bioativas, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo que é de grande aceitação pela população e vem crescendo

junto da comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando a sua eficácia e segurança.

Na conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento (Rio-92), foi assumido pelo Brasil e os países participantes desse encontro, o compromisso de induzir políticas de desenvolvimento sustentável, sendo então criada por decreto presidencial a Agenda 21 brasileira, que é baseada nos eixos temáticos: gestão dos recursos naturais, agricultura sustentável, cidades sustentáveis, infraestrutura e integração regional, redução das desigualdades sociais, ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável. Desde então, as políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos têm sido elaboradas com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Nesse contexto, a riqueza da biodiversidade genética vegetal brasileira contribui para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica promissora para o país (PLETSCHI, 1998; KLEIN et al., 2009).

A revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica foram de grande incentivo para os produtos farmacêuticos sintéticos, devido à facilidade de obtenção de compostos puros, à possibilidade de alterações estruturais que potencializem a ação desses compostos e ao avanço tecnológico das indústrias farmacêuticas. Considera-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos sejam direta ou indiretamente derivados de plantas. Em casos como os de medicamentos utilizados para o tratamento de câncer e os antimicrobianos, aproximadamente 60% dos atualmente disponíveis no mercado e dos que estão em últimos estágios de testes clínicos são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas (CALIXTO, 2000).

A flora Brasileira, especialmente das regiões Norte-Nordeste, possui uma variedade de espécies vegetais produtoras de compostos biologicamente ativos que desperta grande interesse da biotecnologia farmacêutica. Nesta região há uma abundância de plantas aromáticas com um conteúdo relativamente rico (1 a 2% de peso seco de folhas e de ramos) em óleos essenciais (OEs), que representa o conjunto de substâncias voláteis e lipofílicas, obtido de diferentes partes destas plantas, que produzem o aroma (MATOS E FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993) e são responsáveis pela defesa da planta. Frequentemente, os OEs possuem propriedades antibacterianas, antiparasitárias, antivirais e antifúngicas e representam fonte de interesse para indústria alimentar, primariamente como flavorizante. Nesse sentido é utilizado o linalol, eugenol, carvacrol, citral e limoneno que são considerados sem riscos para

saúde do consumidor e como uma fonte natural de conservante por seus efeitos antimicrobianos (CUNHA et al., 2006).

As plantas aromáticas nas últimas décadas vêm sendo estudadas tanto do ponto de vista químico como farmacológico, permitindo a confirmação de suas atividades e dos seus constituintes (CUNHA et al. 2007). Quimicamente, os OEs são misturas complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo caracterizados por 2 ou 3 constituintes maiores, em altas concentrações (em geral, 20 a 70%) quando comparados a outros constituintes. Geralmente esses constituintes com maior concentração determinam as propriedades biológicas de OEs e incluem dois grupos: compostos de terpenos e constituintes alifáticos.

As novas ferramentas metodológicas de isolamento são fundamentais para identificar novos constituintes das plantas. Quando estes estudos são acompanhados de testes capazes de pôr em evidência as ações farmacológicas, pode relacionar-se a sua respectiva atividade biológica. Esta tem sido a rota usada pela indústria farmacêutica quando pretende obter um constituinte ativo de uma planta já usada na terapêutica tradicional e transformá-lo em medicamento (CUNHA et al., 2006). Neste contexto, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado os efeitos cardiovasculares de alguns OEs, oriundos do *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) conhecido como marmeleiro vermelho, *Mentha x villosa* Huds. (Labiatae) chamada menta rasteira, *Alpinia zerumbet* Burt e Smith (Zingiberaceae) (sin: *Alpinia speciosa* Schum) denominada colônia, *Croton zehntneri* Pax et Hoffm (Euphorbiaceae) popularmente chamado de canela de cunhã, *Ocimum gratissimum* L (Labiatae) conhecido como alfavaca e mais recentemente da *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez (Lauraceae) [Syn. *A. Elliptica* A.C. SM., *Cryptocarya canelilla* Kunth] (casca-preciosa). Essas plantas medicinais aromáticas tem largo uso na medicina popular principalmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

A Família Lauraceae possui aproximadamente 50 gêneros e 2500 espécies, sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros e são principalmente encontradas nas florestas centro e sul-americanas (WERFF & RICHTER, 1996; YAMAGUCHI, et al., 2012). É uma das famílias botânicas de grande interesse econômico com várias espécies apreciadas pelo mercado madeireiro e outras como produtoras de OEs. As espécies aromáticas compreendem os gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Dycipellium* e *Octea*. O gênero *Aniba* compreende cerca de 40 espécies, dentre elas a *Aniba rosaeodora*, rica em linalol (de SIQUEIRA et al., 2013) e a *Aniba canellilla* da qual foi isolada o único nitroderivado 1-nitro-2-feniletano (NF) (de SIQUEIRA et al., 2013; INTERAMINENSE et al., 2013) encontrado em

um vegetal. Ele está presente em todos os órgãos dessa planta e sua concentração varia com a época do ano. No período chuvoso a concentração de NF é de 95% e na época da seca é reduzida para 39% (TAVEIRA et al., 2003).

A *Aniba canellila* apresenta ampla distribuição na região amazônica e o chá de suas folhas é utilizado como digestivo, carminativo e anti-inflamatório. Até pouco tempo atrás, pouco se conhecia acerca dos efeitos cardiovasculares do OE de *Aniba canellila* (OEAC) e do seu principal constituinte NF, porém nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a injeção intravenosa (i.v.) do NF induz uma queda da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), bifásica: o primeiro componente (fase 1) é rápido e foi caracterizado como um reflexo vago-vagal, o segundo componente (fase 2) ocorre mais tardiamente e parece ser decorrente de uma ação direta do NF na musculatura lisa vascular. A fase 1 está ausente após injeção do NF no ventrículo esquerdo, sendo abolida pela bivagotomia ou pelo tratamento perineural (TPN) com a capsaicina, mas permanece inalterada pelo pré-tratamento com capsazepina (antagonista dos receptores vanilóides TPRV₁), ou com ondansetron (antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃). Em ratos normotensos acordados, a hipotensão e a bradicardia (fase 1) induzidas pelo NF foram abolidas pelo pré-tratamento com metilatropina. Em preparações de aorta desses animais, o NF relaxou de forma dependente da concentração a contração sustentada induzida por fenilefrina (de SIQUEIRA et al., 2010). In conjunto, estes dados permitiram sugerir que o NF induziu um reflexo vago-vagal (fase 1) que parece ser iniciado nas aferências vagais pulmonares e não nas cardíacas, porém seu mecanismo de transdução deste reflexo ainda não foi esclarecido. A fase 2 da resposta hipotensora do NF parece ser mediada, pelo menos em parte, por um mecanismo vasodilatador periférico (de SIQUEIRA et al., 2010). Efeitos similares do NF sobre a PAM e a FC foram também observados em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) cujo mecanismo de ação foi idêntico ao que foi descrito em ratos normotensos (INTERAMINENSE et al., 2010). Recentemente, os mecanismos responsáveis pela mediação dos efeitos vasorrelaxantes do NF foram estudados em preparações isoladas de artéria mesentérica oriundas de ratos SHR (INTERAMINENSE et al., 2010) ou de artéria torácica oriundas de ratos normotensos (BRITO et al., 2013). Os efeitos vasodilatadores do NF são independentes da integridade da camada endotelial nos vasos sanguíneos e da liberação do óxido nítrico (ON) visto que ocorrem mesmo na vigência de inibição farmacológica da enzima ON sintetase (NOS) pelo L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (INTERAMINENSE et al., 2010; BRITO et al., 2013). Entretanto, a inibição da atividade da enzima guanilato ciclase (GC) solúvel pela oxidação do grupamento heme com ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-

quinoxalin-1-ona) reduz o efeito vasorrelaxante do NF. Em segmentos de aorta, o NF aumenta os níveis intracelulares do guanosina monofosfato cíclico (GMPc), efeito também abolido pelo ODQ. Estes dados mostram que o NF induz seu efeito vasodilatador através da estimulação da via guanilato ciclase/GMPc de forma independente da liberação de ON pelo endotélio vascular, mas dependente do grupamento heme da enzima GC (BRITO et al., 2013). Dentre todos constituintes de OEs testados até o momento pelo nosso grupo de pesquisa, a potência farmacológica do NF em relação ao seu efeito vasorrelaxante é a maior registrada, o que o torna bastante promissor.

O NF pode adotar diferentes conformações, portanto, o interesse nesta molécula deve-se as possibilidades de estudar a correlação entre sua estrutura química e atividade biológica, uma vez que modificações desse composto podem gerar outros, com uma ação mais pronunciada e de fácil obtenção. Derivados do NF e nitro-estireno foram recentemente testados como agentes anticancerígenos pró-apoptóticas e o grupamento beta-nitroestireno foi identificado como farmacóforo para esta atividade (KAAP et al., 2003). A parte nitrovinil da cadeia anexa ao anel aromático mostrou-se como sendo uma característica química essencial e uma conformação crítica padrão que confere à substância suas atividades biológicas (KAAP et al., 2003). Sendo que, o efeito pró-apoptótico, foi observado em algumas células tumorais multi-resistentes (FATHI et al., 2000). Através de modificações específicas em alguns pontos da molécula de NF, é possível promover restrição conformacional em virtude da substituição dos carbonos sp^3 por sp^2 , hipótese que pode favorecer melhor interação fármaco-receptor. O derivado sintético assim formado, trans-nitrofeniletano ou 1-nitro-2-feniletano (NFE), possui potência 3 a 4 vezes maior para relaxar preparações isoladas de aorta torácica de rato normotenso em comparação ao NF (de origem natural) (BARBOSA et al., 2012). Portanto, o aprofundamento dessas investigações visa contribuir para o conhecimento dos mecanismos de ação de OEs e seus constituintes, bem como buscar através da relação estrutura química-atividade farmacológica, novos derivados mais potentes e de interesse para indústria farmacêutica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Sistema Nervoso Autônomo

O sistema nervoso pode ser dividido em nível estrutural e funcional, em componente periférico e central. O sistema nervoso periférico inclui todos os nervos que seguem seu percurso entre o sistema nervoso central (SNC) e os locais somáticos e viscerais. Funcionalmente é dividido em sistema nervoso autônomo (SNA), sistema nervoso sensitivo e somático (voluntário). O SNA, que costuma ser subdividido em simpático, parasimpático e entérico, regula as respostas involuntárias, controlando o tônus vascular, a contratilidade e frequência cardíaca, a constrição pupilar, a secreção salivar, piloereção, contração uterina, função da bexiga e motilidade do trato gastrointestinal (GOLAN et al., 2009).

As fibras nervosas autônomas interagem com os órgãos-alvo através de uma via de dois neurônios: pré-ganglionar (que seguem do tronco encefálico ou da medula espinal aos gânglios) e pós-ganglionar (que partem dos gânglios e inervam os órgãos periféricos). Esses gânglios autônomos contêm as terminações nervosas das fibras pré-ganglionares e os corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2004; GOLAN et al., 2009). Todas as fibras pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas liberam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) que age em receptores colinérgicos nicotínicos e em menor proporção, nos muscarínicos. No sistema nervoso parassimpático (SNP), cujos neurônios estão presentes na região craniosacral, as fibras pós-ganglionares são colinérgicas e liberam ACh, que atua nos receptores muscarínicos. Com relação ao sistema nervoso simpático (SNS), cujos neurônios localizam-se na região toracolombar, as fibras pós-ganglionares liberam a noradrenalina (NA), que age em receptores adrenérgicos ou adrenoceptores. Entretanto, a inervação simpática nas glândulas sudoríparas consiste na ação da ACh nos receptores muscarínicos (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2004).

O SNA exerce influência tônica e reflexa sobre o SCV, visto que tanto a ACh quanto a NA liberadas no coração, alteram o débito cardíaco, pela modificação da força de contração das fibras miocárdicas; e a FC. A ação da NA nos vasos de resistência da circulação sistêmica, altera a contratilidade muscular lisa vascular e deste modo, a resistência vascular periférica (RVP). O SNS também pode exercer efeito trófico sobre as células musculares lisas e miocárdicas. Além disso, outros neurotransmissores pós-ganglionares simpáticos e

parassimpáticos podem potencializar ou minimizar a ação da ACh e NA, por alterarem a sensibilidade muscular cardíaca e vascular à estimulação simpática e parassimpática, aumentando o controle cardiovascular na manutenção da pressão arterial sistêmica (de ANGELIS et al., 2004).

Existem duas principais classes de receptores colinérgicos: os nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos (nAChR) pertencem à família de receptores ionotrópicos (canais iônicos regulados por ligantes) constituídos por cinco subunidades proteicas que quando ativadas adquirem a conformação de canal aberto permeável a íons Na^+ e K^+ . Esses receptores estão localizados, pós-sinapticamente, em numerosas sinapses excitatórias e são divididos em dois subtipos, os neurais (Nn) e os musculares e ganglionares (Nm), sendo expressos no SNC, na junção neuromuscular esquelética e nos gânglios autônomos. Esses receptores participam da regulação e ativação de neurotransmissores nas regiões pré e pós-sináptica, podendo controlar a eficácia da transmissão sináptica e têm importância em diversos processos, como o aprendizado, memória e desenvolvimento neuronal (GOLAN et al., 2009; VENTURA et al., 2010).

Os receptores muscarínicos (mAChR) pertencem à superfamília de receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G). Estruturalmente são proteínas de membrana formada por sete domínios transmembranares. Existem cinco subtipos de mAChR (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5) que formam dois grupos funcionais: M_1 , M_3 e M_5 , são responsáveis pela estimulação da fosfolipase C (vias fosfatos de inositol) através da proteína G_q . Os receptores M_2 e M_4 , através da proteína G_i inibitória, atuam na inibição da adenilil ciclase e ativação dos canais de K^+ . Esses receptores geralmente são expressos nos neurônios do SNC e periféricos (M_1 , M_2 , M_4 e M_5), nas células parietais do estômago (M_1), no músculo cardíaco (M_2), na musculatura lisa visceral (M_2 e M_3), no tecido glandular e músculo liso (M_3) (GOLAN et al., 2009). A ativação desses receptores no sistema nervoso periférico resulta em redução da FC e da força de contração (cronotropismo e inotropismo negativo), vasorrelaxamento periférico e constrição das vias respiratórias (brônquios e bronquíolos). No SNC, estão envolvidos em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília (VENTURA et al., 2010).

A NA liberada numa sinapse colinérgica, também age em receptores específicos, chamados de adrenoceptores ou receptores adrenérgicos (AR), do tipo α e β , que fazem parte da família de receptores metabotrópicos. Esses receptores são subdivididos em: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e β_1 , β_2 e β_3 (UETA, 2009).

Os receptores β -adrenérgicos (β AR) estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos, como na regulação hormonal (Ex. liberação de insulina pelas ilhotas de Langerhans no pâncreas), no controle metabólico (Ex. lipólise) e na modulação cardiovascular (Ex. contratilidade). No SCV, os β AR estão presentes nos vasos (β_2) e nas células musculares cardíacas ($\beta_1 > \beta_2$) e quando ativados pela ligação de catecolaminas liberadas pelas fibras autonômicas (adrenalina e noradrenalina), promove vasodilatação, inotropismo e cronotropismo positivo cardíaco, levando a um aumento da força de contração e da FC, respectivamente. E esse efeito no coração é devido ao acoplamento desses receptores à proteína Gs estimulatória, que estimula a adenilil ciclase levando ao aumento do AMPc intracelular, que por sua vez ativa a proteína kinase A, fosforilando proteínas membranares e produz um aumento de cálcio intracelular (SILVA & ZANESCO, 2010; MOURA & VIDAL, 2011). Os receptores β_1 e β_2 foram os primeiros a serem classificados, através do uso de agonistas e antagonistas seletivos. O receptor β_3 é encontrado nos adipócitos, atuando no metabolismo de lipídeos e na liberação da leptina, um hormônio relacionado à saciedade, sendo um alvo para o tratamento da obesidade (ATALA & CONSOLIM-COLOMBO, 2007; SILVA & ZANESCO, 2010).

2.2. Acoplamento excitação-contração

Os vasos sanguíneos são estruturalmente formados por três camadas: a camada íntima, mais interna, sendo constituída essencialmente por células endoteliais; a camada média, com células musculares lisas; e a camada adventícia, composta de tecido conjuntivo fibroso, revestindo externamente os vasos (Figura 1). As células musculares lisas são fusiformes e possuem dimensões que variam de 40 a 600 μ m de comprimento e 2 a 10 μ m de diâmetro (SILVA & ZANESCO, 2010; JOCA, 2012).

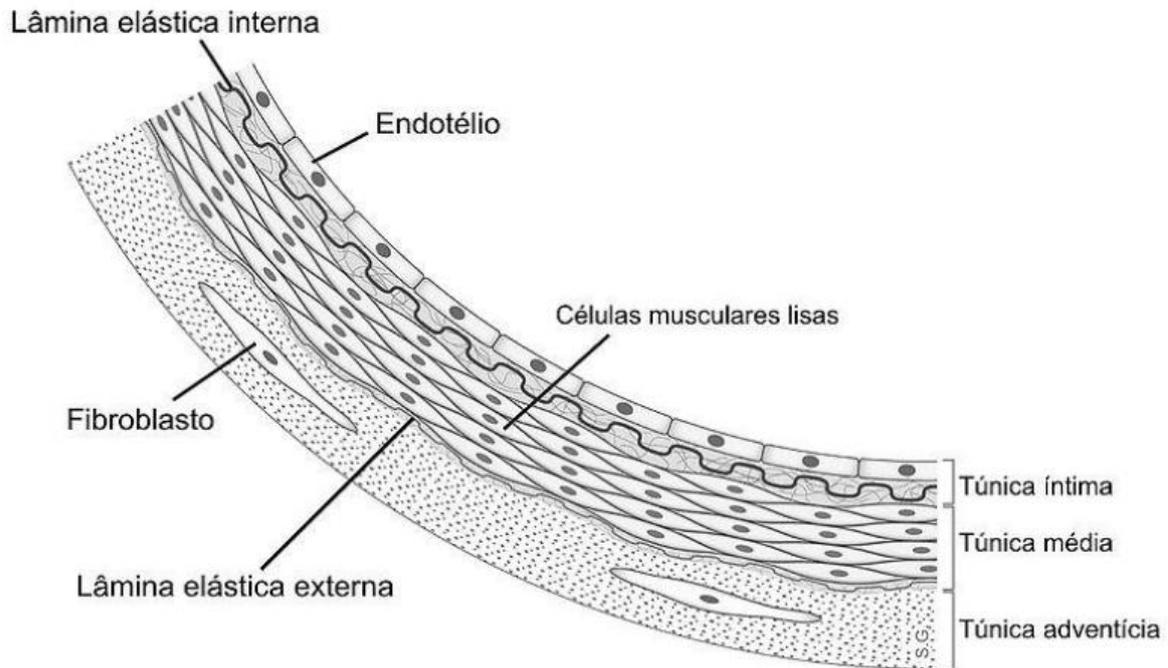


Figura 1. Estrutura vascular (Fonte: JOCA, 2012).

As fibras musculares possuem feixes de filamentos, chamados de miofibrilas que consistem num arranjo de filamentos finos (actina) e grossos (miosina) que percorrem toda a célula muscular e estão organizados em unidades contráteis análogas aos sarcômeros do músculo esquelético. Os sarcômeros são subdivididos em regiões, sendo a primeira correspondente à unidade contrátil da célula muscular e é demarcada por duas linhas escuras (linhas Z), que possui em cada lado uma linha clara (banda I) com filamentos finos de actina. Entre as bandas I (dentro do sarcômero), há filamentos grossos de miosina, sendo essa região chamada de banda A e é onde os filamentos de actina e miosina se sobrepõem. A outra região do sarcômero é representada por uma área clara em seu centro, denominada de banda H que representa uma porção da banda A que contém apenas filamentos de miosina. Por último, existe uma linha escura no centro do sarcômero, chamada de linha M e inclui proteínas essenciais envolvidas na organização e disposição dos filamentos grossos no sarcômero (Figura 2). O músculo liso possui estruturas chamadas de corpos densos (Figura 3), que conduzem força mecânica ao músculo e favorecem o acoplamento entre os miofilamentos (actina e miosina) e o estroma do tecido conjuntivo, exercendo função comparável aos discos Z do músculo estriado (BERNE & LEVY, 2004; JOCA, 2012).

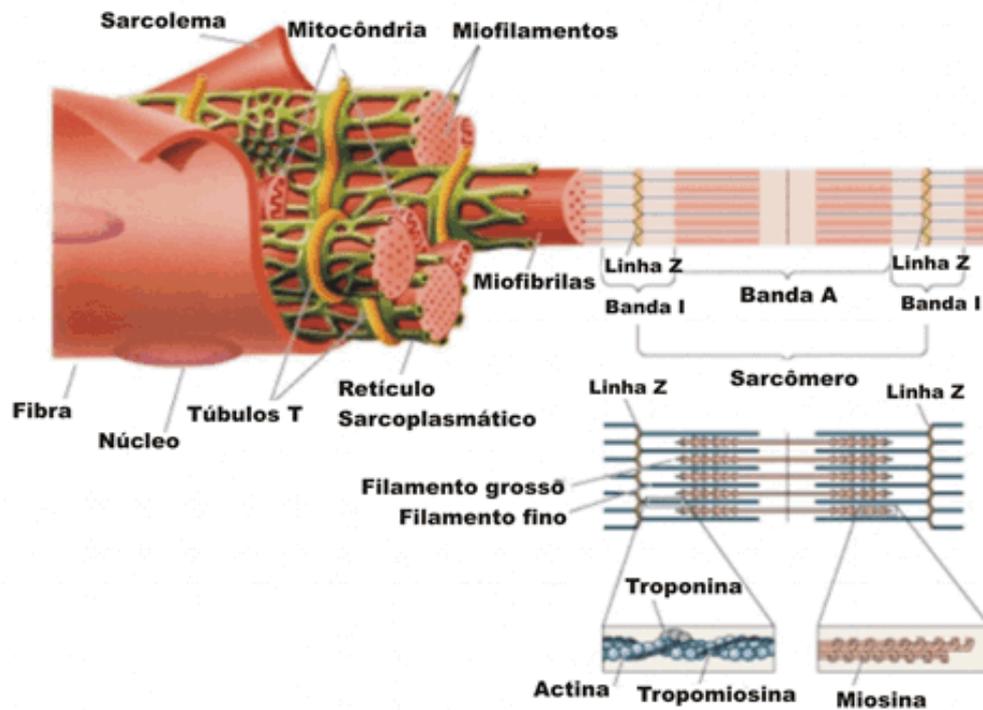


Figura 2. Organização das fibras musculares. Miofibrilas compostas por um arranjo de filamentos finos (actina) e grossos (miosina) organizados em unidades contráteis análogas aos sarcômeros do músculo esquelético. (Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio22.php>)

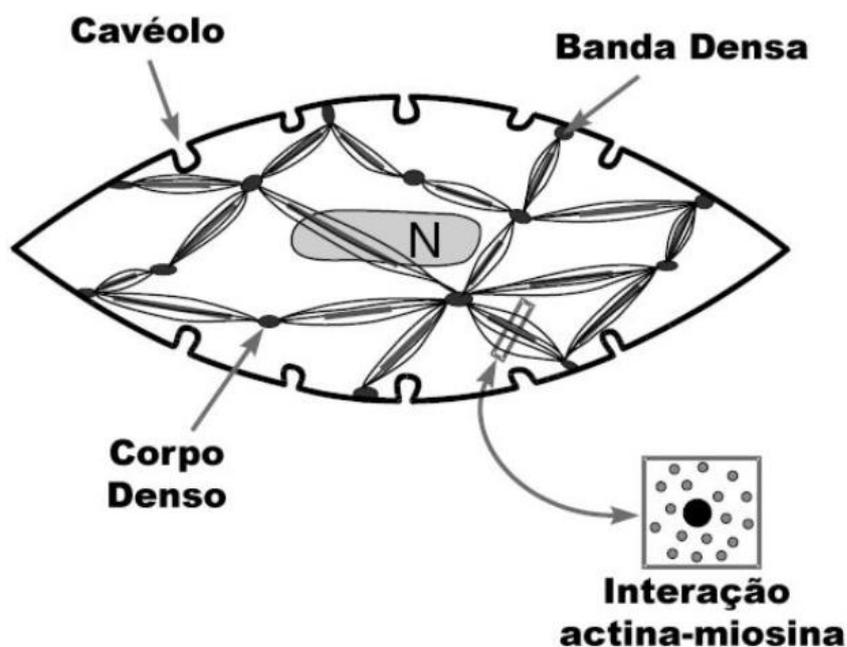


Figura 3. Célula do músculo liso vascular composta por corpos densos que favorecem a interação entre os miofilamentos (JOCA, 2012).

O retículo sarcoplasmático (RS) envolve cada miofibrila e tem papel essencial nos mecanismos de excitação-contração cardíaca, atuando tanto na liberação quanto na recaptura de Ca^{2+} intracelular que irá ativar as proteínas contráteis, ou seja, exerce influência direta na contração muscular. Além disso, invaginações do sarcolema, os túbulos T, estendem-se ao interior da fibra muscular (próximo à banda A) e estão em contato com o meio extracelular, auxiliando no processo de contratilidade, pois a ativação de canais de Ca^{2+} tipo L, presentes no fundo desses túbulos T, leva a um aumento desse íon nas regiões vizinhas das cisternas do RS, que estimula a abertura dos canais de Ca^{2+} membranares do RS (Figura 2) (MILL & VASSALLO, 2001; BERNE & LEVY, 2004).

O acoplamento excitação-contração refere-se aos mecanismos envolvidos na alteração da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, a partir de um estímulo celular (AGUIAR, 2009). O gradiente de Ca^{2+} é mantido através do RS pela Ca^{2+} -ATPase (conhecida como SERCA 2a – isoforma expressa no tecido cardíaco). No tecido cardíaco, a SERCA 2a facilita o estoque e a distribuição de íons Ca^{2+} no RS. Durante a sístole, o potencial de ação induz menor influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio tipo L, iniciando maior liberação dos estoques de Ca^{2+} através dos receptores de rianodina (RyR) que resulta na contração (FRANK et al., 2003).

Brevemente, a transmissão do sinal originado na membrana plasmática até a maquinaria contrátil do músculo liso, ou seja, a ligação entre a excitabilidade e contratilidade muscular é realizada por dois principais mecanismos: um eletromecânico, que depende do potencial transmembrana e envolve canais e fluxos iônicos; e outro farmacomecânico, mediado por substâncias químicas e independentes do potencial transmembrana. Esse acoplamento excitação-contração é regulado principalmente pelo íon Ca^{2+} , que além dessa função, desempenha um papel determinante em outros processos biológicos, incluindo regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteínas, proliferação celular, apoptose, ativação da fosforilação oxidativa e auxílio à manutenção da integridade sarcolemal (NETO & VILARTA, 2012). A principal fonte de Ca^{2+} necessário para que ocorra a contração muscular é o meio extracelular, que permite o influxo do íon para o interior da célula através de canais iônicos, presentes na membrana plasmática, como canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs) e por receptores (ROCCs), canais de cátions não-seletivos e também pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A outra fonte de Ca^{2+} envolve os estoques internos, principalmente o RS que libera este íon para o citosol, através do segundo mensageiro IP_3 ou da estimulação pelo próprio Ca^{2+} (MONTEIRO, 2009).

O acoplamento eletromecânico se inicia pela despolarização da membrana plasmática, pela entrada de íons, como Na^+ , K^+ e Cl^- , promovendo alteração do potencial de membrana e

consequente abertura dos canais VOCCs. Com isso, os íons Ca^{2+} por meio de um gradiente de concentração, se difundem do meio extracelular para o interior da célula. Existem dois tipos de canais de Ca^{2+} no músculo liso vascular, o tipo T (transient) e o tipo L (long lasting), o mais predominante, sendo ativado (aberto) pela despolarização da membrana celular e é lentamente inativado (fechado) tanto pela repolarização ou hiperpolarização celular, quanto pelo próprio Ca^{2+} intracelular, em um mecanismo regulatório (PAIVA & FARIAS, 2005).

Já o acoplamento farmacomecânico independe da despolarização celular, porém envolve a interação de agonistas com seus receptores presentes na membrana das células musculares lisas. Esses receptores são acoplados a proteína G, um heterodímero formado pelas subunidades α , β e γ , que encontram-se associadas entre si e com uma molécula de difosfato de guanosina (GDP) ligada à subunidade α , quando a proteína está no estado inativo (PAIVA & FARIAS, 2005). No momento em que o receptor é ativado pela ligação de agonistas, inicia-se uma cascata de ativação intracelular da proteína G. E esse mecanismo ocorre por meio de uma proteína auxiliar, *guanosine nucleotide exchange factor* (GEF), que promove a troca do GDP por uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP), configurando portando, seu estado ativo. Com isso, há uma dissociação do dímero $\beta\gamma$ da subunidade α -ATP, as quais dão início a cascatas de sinalização intracelular, resultando na ativação de proteínas efetoras, que podem ser enzimas (adenilato ciclase, fosfolipase C, pequenas GTPases e cinases), canais iônicos (canais para Ca^{2+} , Na^+ ou K^+) ou proteínas de transporte (trocaador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$). A subunidade α possui uma atividade GTPase intrínseca, que hidroliza o GTP a GDP, resultando na reassociação das subunidades α , β e γ e inativação da proteína G. E essa ativação temporária é suficiente para que ocorra uma considerável amplificação do sinal de transmissão trazido pela molécula sinalizadora (MONTEZANO & TOSTES, 2005; MOURA & VIDAL, 2011). Quando ativa, a enzima fosfolipase C (PLC) hidroliza o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) presente na membrana, formando os segundos mensageiros, 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) que atuam em diferentes alvos. O IP_3 , por ser hidrossolúvel, migra pelo citosol e se liga a receptores específicos na membrana do RS, causando a liberação de Ca^{2+} para o citosol. Enquanto que o DAG, por ser hidrofóbico, permanece na membrana plasmática e junto com o Ca^{2+} ativa a proteína quinase C (PKC) que além de promover a fosforilação de outras proteínas intracelulares, é responsável pelo aumento da condutância iônica dos canais transmembranares de cálcio do tipo L, pela fosforilação da cadeia leve da miosina e pela modulação da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (PAIVA & FARIAS, 2005; MOURA & VIDAL, 2011). Além disso, o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} pelos canais membranares VOCC e pela sua

saída do RS para o citosol por canais dependentes do IP_3 , ativam outros canais presentes no RS sensíveis ao Ca^{2+} . E essa ativação permite a saída adicional de Ca^{2+} pelo RS, um fenômeno conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio, favorecendo a contratilidade muscular (FRANK et al., 2003; JOCA, 2012).

Dentre as proteínas que participam da contração muscular, temos a actina, miosina, calmodulina, caldesmon e tropomiosina. A actina possui estrutura globular e é um polímero helicoidal de cadeia dupla. A miosina é um hexâmero formado por duas cadeias polipeptídicas pesadas em dupla hélice e dois pares de cadeias leves. A calmodulina é uma proteína que participa do controle de vários processos metabólicos, como a contratilidade muscular, possuindo quatro sítios de ligação ao Ca^{2+} , formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina, regulando assim a concentração intracelular desse íon em vários tecidos. O caldesmon é um dímero que, na ausência de Ca^{2+} , está associada à actina. Em presença do Ca^{2+} , o complexo Ca^{2+} -calmodulina se liga ao caldesmon deslocando-o da sua ligação com a actina, expondo assim os seus sítios de ligação com a miosina, dando início ao processo de contração muscular. A tropomiosina é uma proteína fibrosa, que associada ao caldesmon ocupa os sulcos formados pelos filamentos de actina (SALDANHA, 1989; MAGALHÃES et al., 2002; PAIVA & FARIAS, 2005).

A contração do músculo liso vascular pelas proteínas contráteis depende primariamente do aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular, através de canais iônicos membranares e do RS, que podem ser ativados pela despolarização da célula, por estímulos mecânicos ou pela ação de agonistas. Em resposta a essa elevação de Ca^{+2} , quatro moléculas desse íon se ligam à calmodulina (complexo Ca^{2+} -calmodulina) que interage com a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Essa associação promove uma alteração conformacional desse complexo e desloca a sequência auto-inibitória da MLCK, ativando esta quinase que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC). Essa fosforilação permite a exposição dos sítios de ligação da porção globular da miosina que favorece sua interação com os filamentos de actina, formando o complexo actina-miosina. Essa interação entre os filamentos, promove a ativação da miosina ATPase, que hidrolisa o ATP em ADP e Pi e a energia liberada pela quebra da ligação do grupamento fosfato é necessária para manter o complexo actina-miosina ativo. Depois de formado esse complexo, há uma mudança em seu ângulo de orientação, permitindo o deslizamento dos filamentos de miosina sobre a actina e gerando a força necessária para que ocorra a contração muscular (Figura 4) (BERNE & LEVY, 2004; PAIVA & FARIAS, 2005; AGUIAR, 2009; JOCA, 2012).

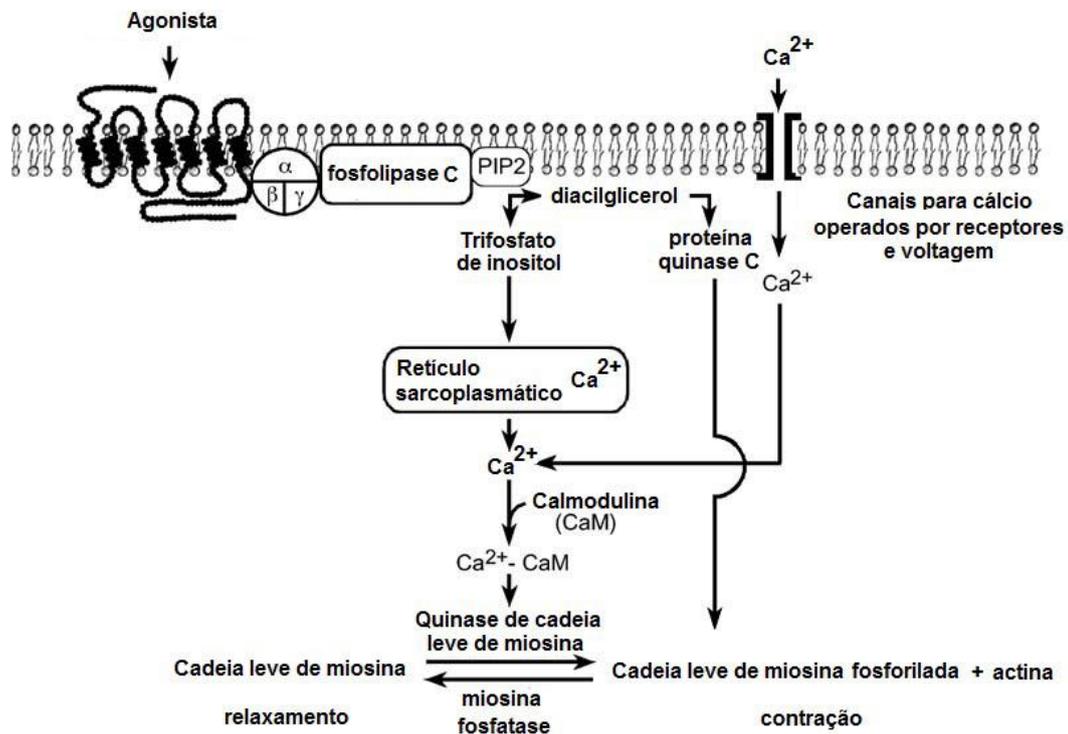


Figura 4. Contração muscular lisa induzida por um agonista. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, promove a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), para estimular a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), resultando na contração muscular. PIP_2 , fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (Fonte: AGUIAR, 2009).

No estado de repouso do músculo liso, o complexo tropomiosina-caldesmon, presente ao longo dos filamentos finos, bloqueia os sítios de ligação da actina com a miosina. Entretanto, o complexo Ca^{2+} -calmodulina induz uma mudança na conformação do caldesmon, liberando a tropomiosina e os sítios de ligação da actina, proporcionando a formação do complexo actina-miosina. Portanto, a contração muscular lisa depende tanto da fosforilação e ativação da miosina, quanto da ativação da actina devido à saída do complexo tropomiosina-caldesmon. Sendo este processo dependente da energia fornecida pelo ATP, liberado pela miosina ATPase após interação com a actina e é modulado pelo caldesmon (HOROWITZ et al., 1996).

2.3. Relaxamento do músculo liso

O relaxamento muscular é decorrente da remoção dos estímulos contráteis ou por ação direta de substâncias que inibem a contratilidade e consiste, principalmente, na diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular a níveis basais por meio de alguns mecanismos, que

envolvem o núcleo, a mitocôndria e proteínas que se ligam ao cálcio. Além disso, a mobilização deste íon para o RS e para o meio extracelular também contribui para essa redução, através do fechamento de canais de Ca^{2+} do tipo L (VOCCs), da extrusão do íon pela membrana plasmática (trocaador Na^+ - Ca^{2+}) e da recaptura do Ca^{2+} pelo RS (bomba Ca^{2+} -ATPase) (Figura 5) (MILL & VASSALLO, 2001; WEEB, 2003; AKATA, 2007a).

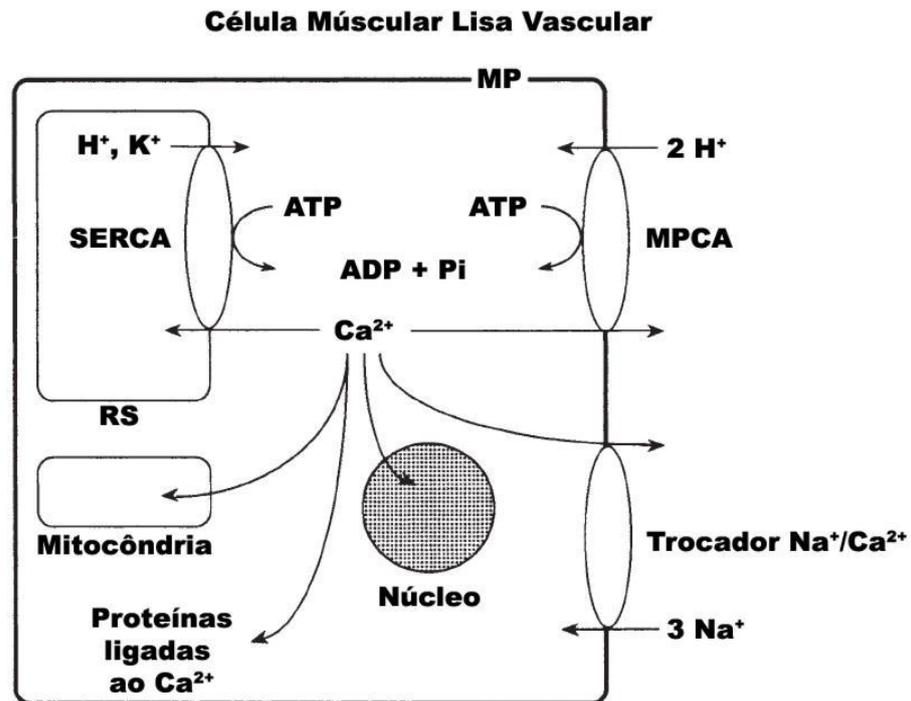


Figura 5. Regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular. SERCA, bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; MPCA, bomba de cálcio da membrana plasmática (Fonte: AKATA, 2007a).

A captação do Ca^{2+} pelo RS é devida a ação da bomba de cálcio, ou seja, da Ca^{2+} -ATPase. Essa bomba está associada ao RS, sendo chamada de SERCA (*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), que transporta dois íons Ca^{2+} para a luz do RS e um íon K^+ e um H^+ para o citosol, por cada molécula de ATP hidrolisada. Outra Ca^{2+} -ATPase está presente na membrana plasmática (MPCA), fazendo o transporte de um íon Ca^{2+} para o meio extracelular e dois íons H^+ para o interior da célula. Outro transportador é o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que usa o gradiente eletroquímico do sódio para mover o cálcio para o meio extracelular, sendo uma molécula de Ca^{2+} para cada três moléculas de sódio (BERNE & LEVY, 2004; JOCA, 2012).

Quando os níveis de Ca^{+2} intracelular estão reduzidos, pela diminuição ou desaparecimento do estímulo (hiperpolarização da membrana ou pela remoção de agonistas), o complexo Ca^{+2} -calmodulina é desfeito e se dissocia da MLCK, inativando-a, com consequente desfosforilação da MLC e vasorrelaxamento (PAIVA & FARIAS, 2005; AKATA, 2007a).

2.4. Regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular

Existe uma série de agentes vasoativos que interferem na contratilidade muscular, agindo pela via de sinalização de segundos mensageiros, como é o caso da NA, vasopressina, angiotensina II e endotelina I, que ativam seus receptores específicos (α_1 adrenérgico, V_1 , AT1, ET-A, respectivamente) presentes na membrana plasmática e que estão acoplados a proteína G. Resultando na ativação da PLC e formação de IP_3 e DAG, que por sua vez, atua no RS e ativa a PKC, respectivamente, como já foi descrito anteriormente (WEEB, 2003; BERNE & LEVY, 2004; JOCA, 2012).

A fosforilação da MLC também é regulada por uma enzima fosfatase da cadeia leve da miosina (miosina fosfatase - MP), formada por três subunidades: uma catalítica (37 KDa), uma variável (20 KDa) e uma de ligação à miosina (110-130 KDa). A PKC quando ativa, fosforila a subunidade de ligação à miosina da MP, inibindo sua atividade enzimática, permitindo que a MLC permaneça fosforilada favorecendo a contração muscular. Além disso, a PKC pode promover uma mudança estrutural da MP, inibindo sua interação com a MLC. O ácido araquidônico tem efeito similar sobre a estrutura da MP (AGUIAR, 2009).

Existem algumas proteínas que participam da regulação das proteínas contráteis, como a RhoA (pequena proteína G monomérica). No momento em que a PKC é ativada, um fator de troca do nucleotídeo guanina da RhoA (RhoGEF) é ativado, fazendo a troca do GDP ligado à RhoA por GTP, tornando-a ativa. A RhoA, por sua vez, ativa a Rho-quinase (RhoK), que fosforila e inibe a MP, que não desfosforila a MLC, contraindo a célula. Além disso, a RhoK pode fosforilar diretamente a MLC, independente da MLCK e da presença do Ca^{+2} , induzindo a contração. Inibidores farmacológicos da RhoK, como o fasudil e Y-27632, competem pelo sítio de ligação do ATP da enzima, bloqueando sua atividade, consequentemente, favorece o vasorrelaxamento (Figura 6) (WEBB, 2003; AKATA, 2007b).

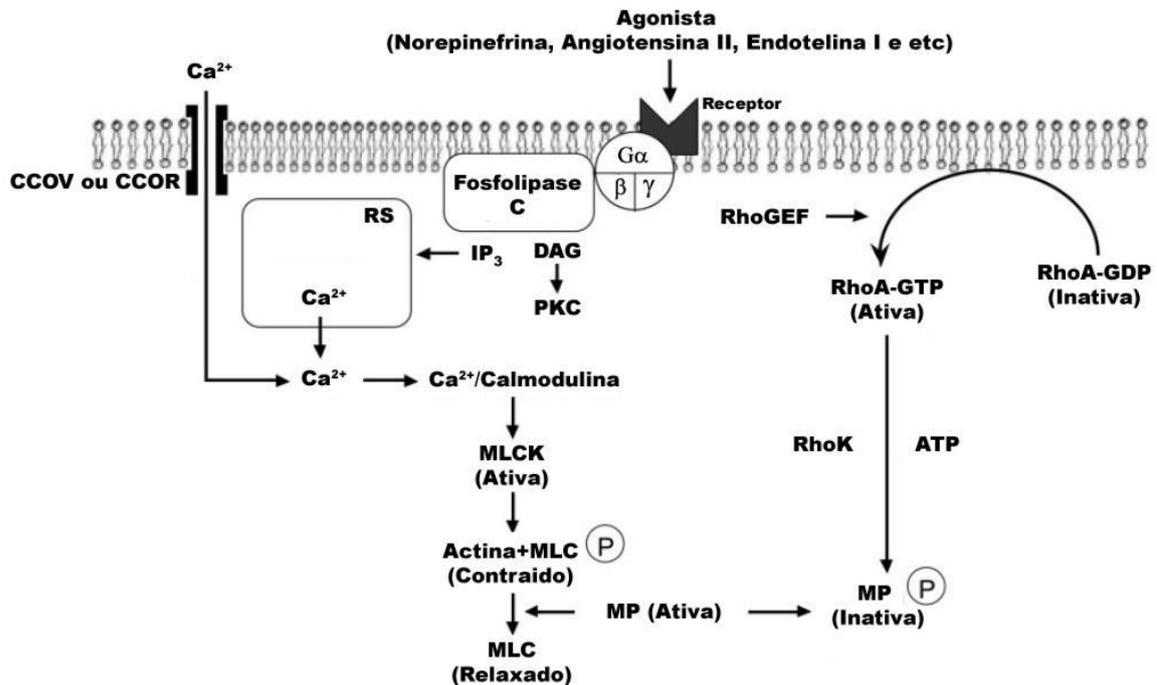


Figura 6. Regulação da contração do músculo liso vascular. Quando a PKC é ativada, a RhoA, através da ação do RhoGEF, é ativada. Esta proteína por sua vez, ativa a RhoK que inativa a MP, favorecendo na contração muscular. CCOV, canais para cálcio operados por voltagem; CCOR, canais para cálcio operados por receptor; DAG, diacilglicerol; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; PKC, proteína quinase C; MLCK, Quinase da cadeia leve de miosina; MLC, cadeia leve de miosina; MP, Miosina fosfatase; RhoGEF; Fator de troca de guanina-nucleotídeo da Rho; RhoK; Rho quinase; ATP, adenosina trifosfato; RS, retículo sarcoplasmático; P, fosfato (indicando a fosforilação) (Fonte: WEBB, 2003).

Com relação ao relaxamento muscular, alguns agentes vasodilatadores atuam ativando os receptores ligados a GC na membrana plasmática, como os peptídeos natriuréticos ou ativam a GC solúvel no citosol, como o ON. As duas vias promovem um aumento dos níveis celulares de guanina monofosfato cíclico (GMPc) que ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). Outros vasodilatadores, como a prostraciclina e a adenosina, se ligam aos seus receptores e ativam a enzima adenilato ciclase (AC), aumentando a quantidade de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), ativando a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Essas proteínas quinases também realizam uma ativação cruzada, de forma que a PKA pode ser ativada pelo GMPc, assim como a PKG, pelo AMPc (WEBB, 2003; AKATA, 2007b). Tanto a PKG quanto a PKA, além de outras funções, promovem a diminuição da concentração de Ca²⁺ intracelular devido a algumas vias: 1) Aumento da extrusão de Ca²⁺ para o meio extracelular pela ativação da Ca²⁺-ATPase; 2) Maior recaptação do Ca²⁺ pelo RS pela bomba SERCA, através da fosforilação da enzima fosfolambam, diminuindo sua ação inibitória sobre a SERCA; 3) Inibição da formação de IP₃ e ativação de seu receptor (IP₃R), diminuindo a

liberação de Ca^{2+} induzida pelo IP_3 do RS. Adicionalmente, a PKA e a PKG também reduzem a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , pela desfosforilação da MLC e pela fosforilação da MLCK que diminui sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina, respectivamente, contribuindo para o relaxamento muscular (Figura 7) (AKATA, 2007b).

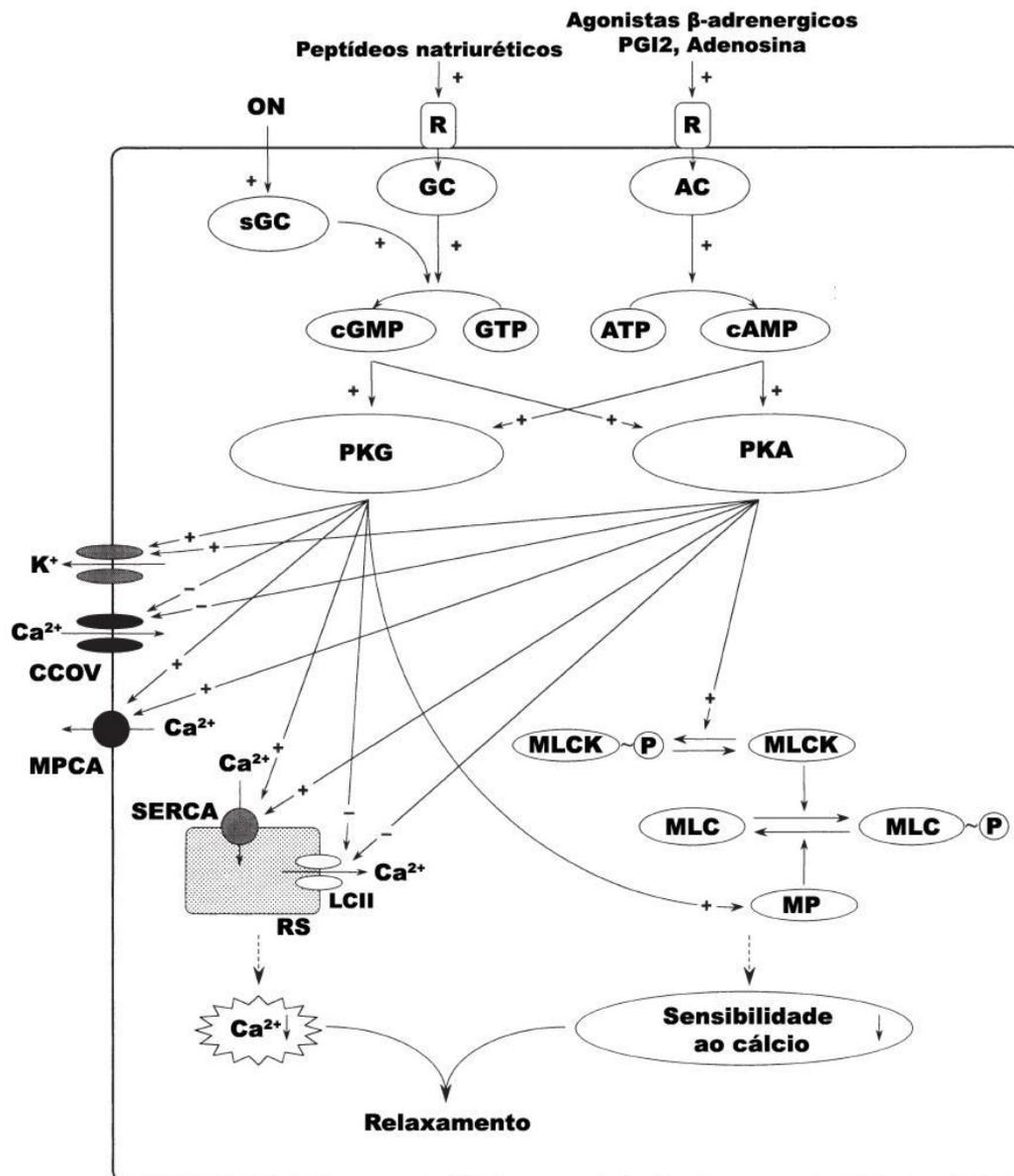


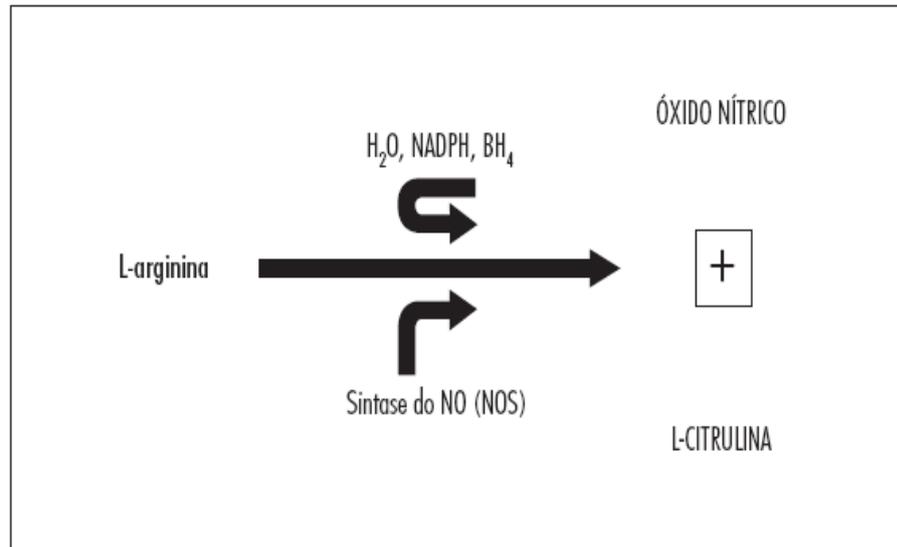
Figura 7. Mecanismos do vasorrelaxamento mediado por nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc). GMPc, guanosina monofosfato cíclico; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; PKG, proteína quinase dependente de GMPc; PKA, proteína quinase dependente de AMPc; LCII, liberação de cálcio induzida por IP_3 ; R, receptor (Fonte: AKATA, 2007b).

A bomba Na^+/K^+ -ATPase encontrada na membrana plasmática também contribui para a redução citoplasmática de Ca^{+2} . Essa bomba é estimulada pela PKG, via ON, e quando ativada, promove diminuição da concentração intracelular de Na^+ , que estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, diminuindo os níveis de Ca^{+2} intracelular, pela saída deste íon da célula em troca da entrada de Na^+ . E essa redução de Ca^{+2} mediada pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, pode envolver também a via do AMPc. Por exemplo, o isoproterenol, um agonista β -adrenérgico, quando ligado a seu receptor, ativa a proteína G, estimulando a ativação da AC e produção, pela quebra do ATP, de AMPc, que ativa a PKA e esta, estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NISHIMURA, 2006). Além disso, o AMPc também atua nos canais de K^+ ativados por Ca^{+2} ou por ATP, hiperpolarizando a membrana e reduzindo o influxo de este íon via VOCCs, com conseqüente vasodilatação. O relaxamento muscular a partir do GMPc deve-se também pela abertura dos canais de K^+ (hiperpolarização da membrana), pela ativação da bomba SERCA do RS, pelo aumento da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, como também pela inibição da PLC (REMBOLD, 1992, BERNE & LEVY, 2004).

O endotélio, como mencionado anteriormente, possui um papel essencial no relaxamento do músculo liso, pois suas células produzem além de substâncias vasoconstrictoras (endotelina, angiotensina II e tromboxano A_2), alguns agentes vasodilatadores, como a prostaciclina (PGI_2), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o ON (BATLOUNI, 2001).

Dentre os vasodilatadores endoteliais, o ON é considerado o mais potente e o controle de sua produção está associada diretamente a várias patologias, como HA, aterosclerose e doença arterial coronária. É formado a partir do aminoácido L-arginina através da enzima NO sintetase endotelial (eNOS), ativada pelo complexo Ca^{+2} -calmodulina. A eNOS promove a oxidação do grupamento guanidino da L-arginina, formando NO e L-citrulina (Figura 8a). Uma vez formado, o NO se difunde rapidamente das células endoteliais para o músculo liso vascular, onde interage com o grupamento heme da GC solúvel ativando sua atividade catalítica, formando GMPc. Este por sua vez, diminui os níveis de Ca^{+2} , inibindo o processo contrátil (Figura 8b). A resposta vasodilatadora por estimulação dos receptores β -adrenérgicos pode ser diminuída ou inibida pela retirada do endotélio ou por inibidores da síntese de eNOS, como o L-NAME. Essa resposta também pode ser eliminada pela inibição da GC solúvel ou restaurada, por exemplo, pela adição de nitroprussiato de sódio (doador de ON), mostrando o papel do ON no relaxamento via estimulação β -adrenérgica (BATLOUNI, 2001; ZANESCO & ZAROS, 2009; SILVA & ZANESCO, 2010).

(A)



(B)

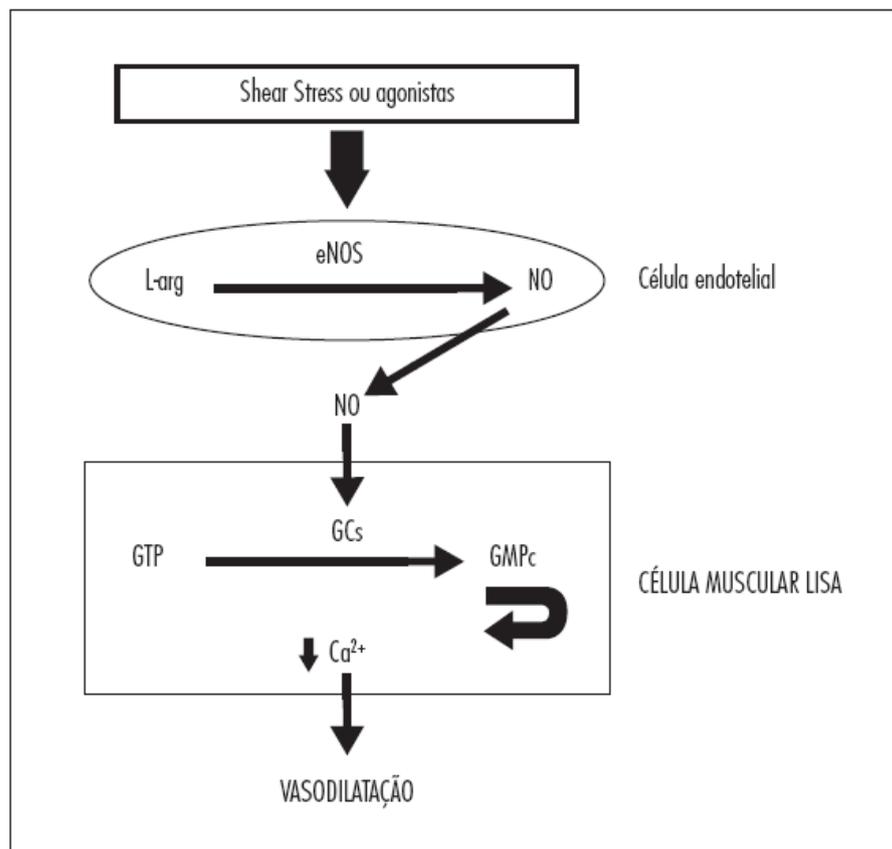


Figura 8. Síntese do óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina (A) e ação do NO na célula muscular lisa dos vasos (B). eNOS, óxido nítrico sintetase endotelial; L-arg, L-arginina; GTP, guanosina trifosfato; GMPc, guanosina monofosfato cíclico (Fonte: ZANESCO & ZAROS, 2009).

O efeito vasodilatador do EDHF é maior nos vasos de resistência e é mediado pela ativação dos canais de K^+ no músculo liso vascular, levando a hiperpolarização e diminuição de Ca^{+2} intracelular, enquanto o relaxamento pelas PGI_2 envolve a ativação da AC, formação de AMPc e ativação da PKA, e consequente hiperpolarização da membrana, efluxo de Ca^{+2} intracelular e diminuição da afinidade entre os miofilamentos actina e miosina (BATLOUNI, 2001). A disfunção endotelial está intimamente associada ao desenvolvimento da HA e envolve mecanismos como a diminuição da liberação e biodisponibilidade dos fatores vasorrelaxantes derivados do endotélio, assim como uma disfunção nas vias de transdução de sinais e redução da sensibilidade do músculo liso a esses fatores relaxantes. Além disso, há um aumento na produção dos fatores vasoconstrictores endoteliais (BATLOUNI, 2001).

2.5. Regulação da pressão arterial

Em condições normais, a PA deve ser mantida em uma faixa de normalidade para que ocorra uma perfusão tecidual adequada, nas mais diferentes condições. Esse controle envolve a participação de mecanismos neurais (curto prazo) e neuro-humorais (longo prazo) que atuam modulando tanto a atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) para o sistema cardiovascular, como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios, como a renina, vasopressina e o peptídeo natriurético. Dessa forma, alterações da PA encontradas, por exemplo, na hipertensão, são decorrentes da disfunção desses sistemas moduladores pressóricos (IRIGOYEN et al., 2001, 2005).

Existem diversos sistemas que participam da regulação neuro-humoral da PA, dentre eles destaca-se o sistema renina-angiotensina-aldosterona que atua por meio da angiotensina II, que dentre suas diversas ações, atua como um potente vasoconstritor. Este hormônio peptídico provém de uma cascata enzimática iniciada pela renina, que é secretada pelas células justaglomerulares renais, em resposta à estimulação simpática. Essa enzima quando atinge a circulação, catalisa a quebra do angiotensinogênio, produzido no fígado, em angiotensina I, que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) que lisa sua molécula e forma a angiotensina II. A angiotensina II também estimula a síntese e liberação de aldosterona, um hormônio secretado pelo córtex adrenal importante na regulação da volemia, pois aumenta a retenção renal de sódio e consequentemente, a PA. Esse sistema neuro-hormonal intensifica as respostas cardiovasculares comandadas pelos barorreceptores ou

pressorreceptores (IRIGOYEN et al., 2001; ZAGO & ZANESCO, 2006; QUADROS & RIBEIRO, 2008).

O mecanismo de controle pressórico em curto prazo envolve o controle da PA momento a momento. Várias evidências, nas últimas décadas, têm mostrado o importante papel do SNC nessa regulação e manutenção pressórica dentro de uma faixa de normalidade (GUYENET, 2006). Alterações na PA promovem ativação de receptores, gerando sinais que são conduzidos ao SNC, que por sua vez, transmite uma resposta por vias eferentes aos órgãos efetores. O núcleo do trato solitário (NTS) é o principal local de terminações das fibras aferentes cardiovasculares no SNC e atua na modulação da atividade autonômica eferente para o SCV (AMARAL, 2005). Dentre as vias aferentes cardiovasculares envolvidas nessa regulação autonômica da PA, destacam-se as aferências dos barorreceptores aórticos e carotídeos, os quimiorreceptores carotídeos e os receptores cardiopulmonares, que são projetadas ao SNC através dos nervos vagos e glossofaríngeos. Essas informações aferentes quando processadas pelo SNC, promove uma regulação das vias autonômicas eferentes, que irão atuar no sistema cardiovascular, influenciando diretamente a FC, o volume sistólico e a resistência periférica (AMARAL, 2005; VALENTI et al., 2007).

Alguns mecanismos reflexos estão envolvidos nesse controle neural da HA e são mediados pelos barorreceptores ou pressorreceptores, receptores cardiopulmonares e pelos quimiorreceptores. Os barorreceptores arteriais, localizados no seio carotídeo e no arco aórtico, são constituídos por terminações nervosas livres, densamente ramificadas, que se distribuem na camada adventícia de grandes vasos sistêmicos com propriedades altamente elásticas, como as artérias aorta e carótidas. São mecanorreceptores sensíveis ao estiramento das paredes desses vasos, normalmente provocados por ondas de pressão. A tensão gerada e consequente distensão dos vasos promovem deformações das terminações livres dos barorreceptores, que são responsáveis pela transdução dessas deformações mecânicas em potenciais de ação de forma rápida (barorreflexo). E a rapidez desse mecanismo regulatório deve-se a processos de retroalimentação pelo SNA (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 2001; IRIGOYEN et al., 2001; ZAGO & ZANESCO, 2006). Devido à associação da sua atividade com o ciclo cardíaco e a alta sensibilidade em detectar variações agudas da PA, os barorreceptores comandam o mais importante e refinado mecanismo de regulação reflexa neural de ajuste momento a momento da PA (PEREIRA, 2009).

O reflexo cardiopulmonar (reflexo Bezold-Jarisch) envolve receptores cardiopulmonares que estão divididos em três grupos: O primeiro é conectado ao SNC por fibras vagais mielinizadas e localiza-se nas junções venoatriais, cuja distensão mecânica (enchimento e

contração atrial) leva ao aumento da atividade simpática para o nodo sinoatrial sem alterar a atividade das fibras eferentes vagais para o coração ou das fibras simpáticas. Como resposta reflexa, há um aumento da FC que mantém, em condições de aumento do retorno venoso, o volume cardíaco relativamente constante. No segundo grupo, os receptores cujas aferências não-mielinizadas trafegam pelo nervo vago, estão distribuídos em todas as câmeras cardíacas e quando ativados agem como os barorreceptores carotídeos e aórticos, diminuindo a atividade simpática e aumentando a ação vagal para o coração. O último grupo refere-se aos receptores também presentes nas câmeras cardíacas e suas aferências (mielinizadas e não-mielinizadas) trafegam até a medula espinhal. Esses receptores são ativados por estimulação mecânica (mecanorreceptores) ou por substâncias químicas diretas no epicárdio (IRIGOYEN et al., 2005). O outro mecanismo reflexo do controle da PA é mediado pelos quimiorreceptores arteriais encontrados nos corpúsculos aórticos e carotídeos e são sensíveis a mudanças da PO_2 , PCO_2 e pH. Quando há elevação da PCO_2 e/ou redução da PO_2 e do pH, ocorre alteração das aferências quimiorreceptoras que se projetam ao núcleo do trato solitário (NTS), no bulbo, promovendo alteração na PA, além da elevação da frequência e amplitude respiratória para normalizar os gases sanguíneos e o pH (IRIGOYEN et al., 2005).

Quando estimulados, por um aumento da PA acima de valores basais, as informações aferentes tanto dos barorreceptores quanto dos receptores pulmonares são conduzidas através de suas projeções ao SNC, especificamente na região intermediária do NTS via nervo glossofaríngeo (inerva o seio carotídeo) e nervo vago (inerva o arco aórtico). Neurônios secundários do NTS, por sua vez, excitam neurônios pré-ganglionares do SNP, presente no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que se projetam (eferências vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais, situados no coração, levando ao aumento do tônus vagal no coração e redução da FC (IRIGOYEN et al., 2001; NEGRÃO et al., 2001). Ademais, outros neurônios do NTS estimulam a região caudal do bulbo ventrolateral (CVLM) que inibe os neurônios pré-motores simpáticos da região rostral do bulbo ventrolateral (RVLM), diminuindo o tônus simpático no coração e vasos, levando à bradicardia, diminuição da contratilidade cardíaca e da secreção de catecolaminas pela medula adrenal, queda da resistência vascular periférica (RVP) (vasodilatação) e consequente hipotensão. Logo, a ativação dessas vias neuronais resulta em inibição da descarga simpática e intensificação da resposta vagal (atividade parassimpática) (Figura 9) (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2005; ZAGO & ZANESCO, 2006; VALENTI, 2007).

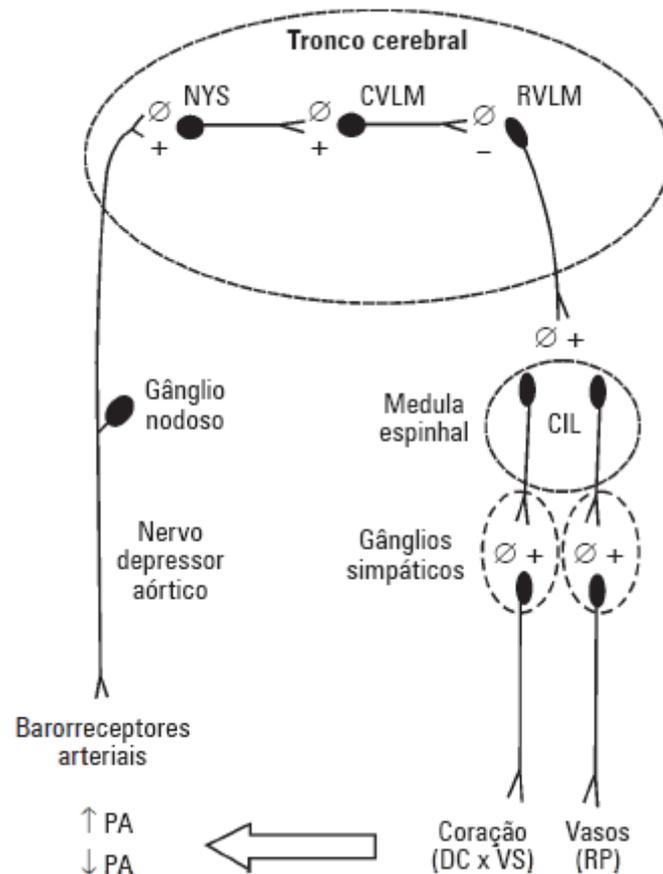


Figura 9. Representação esquemática da via neural do barorreflexo na modulação da atividade simpática (Fonte: ACCORSI-MENDONÇA et al., 2005).

Deste modo, o barorreflexo e o RBJ desempenham ajustes autonômicos cardiovasculares que atuam na manutenção da PA. E essas informações são conduzidas à periferia através de mecanismos periféricos definidos pela inervação autonômica. Quando esses ajustes não são mantidos, pode ser desencadeado um quadro de HA que envolve tanto componentes ambientais como genéticos, sendo relacionada, principalmente a alterações cardiovasculares morfo-funcionais e ao controle autonômico (IRIGOYEN et al., 2005).

A HA é uma doença crônica, considerada um problema de saúde pública devido a sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle, sendo caracterizada quando um indivíduo adulto apresenta os valores de pressão sistólica e diastólica iguais ou superiores a 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente. Sua prevalência na população brasileira está acima de 30%, sendo responsável por cerca de 40% das mortes por acidente vascular cerebral (AVC) e por 25% das mortes por doença arterial coronariana (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE

HIPERTENSÃO, 2006). Independente dos fatores genéticos e ambientais (dieta, obesidade, etilismo, tabagismo, estresse) e dos processos regulatórios da HAS, o aumento da resistência vascular periférica (RVP) é o fator determinante no estabelecimento da HAS.

O tratamento da HAS tem por objetivo reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular. Existem várias classes farmacológicas utilizadas para o tratamento da HAS, dentre elas destacam-se: 1) Diuréticos, que reduzem o volume sanguíneo; 2) Inibidores adrenérgicos, como β -bloqueadores, que diminuem a contratilidade miocárdica e a FC, sendo usados principalmente, no tratamento da HAS associada a arritmias e doença arterial coronária; e α -bloqueadores; 3) Vasodilatadores diretos, que através do vasorrelaxamento, reduzem a RVP; 4) Inibidores da ECA, diminuindo a produção de angiotensina II, sendo usados principalmente em pacientes com insuficiência cardíaca, com infarto agudo no miocárdio, com risco para aterosclerose; 5) Bloqueadores dos receptores de angiotensina II (AT_1); 6) Inibidores diretos da renina; 7) Bloqueadores dos canais de Ca^{+2} , que diminuem a contratilidade muscular lisa e a RVP, pela redução da concentração intracelular de Ca^{+2} nas células musculares lisas vasculares (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

O outro tipo de tratamento é o não-farmacológico, que se refere à adoção de hábitos de vida saudáveis para a prevenção do desenvolvimento da HAS e deve cursar com o tratamento farmacológico. Inclui: controle de peso, modificação dos hábitos alimentares (suplementação de potássio, cálcio e magnésio), redução do consumo de sal e de bebidas alcoólicas, inclusão de exercício físico à rotina (CORRÊA et al., 2005; V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

Diante da alta incidência da HA é premente a investigação de recursos terapêuticos mais eficazes com o objetivo de aperfeiçoar o tratamento da hipertensão. Nesse contexto, não só a descoberta de novos fármacos é importante, mas também a inclusão racional de fitoterápicos.

2.6. Plantas aromáticas e óleos essenciais

As plantas aromáticas são abundantes na região Norte-Nordeste do Brasil e a maioria possui um conteúdo relativamente rico (1 a 2% de peso seco de folhas e de ramos) em óleos essenciais (OEs). De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos, como cavidades

secretoras subepidérmicas foliares (Myrtaceae), tricomas glandulares (Lamiaceae), idioblastos (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae) (TOLEDO et al., 2004; DONATO & de MORRETES, 2007). Os óleos essenciais podem ser extraídos de diferentes partes da mesma planta e, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar diferentes composições químicas, características físico-químicas e odores (ROBBERS et al., 1997).

De maneira geral, os OEs representam o conjunto de substâncias voláteis e lipofílicas, obtido de diferentes partes das plantas aromáticas, que produzem o aroma destas (MATOS E FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993). Quimicamente, os OEs são uma combinação de diversos compostos químicos como terpenos, sesquiterpenos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, compostos nitrogenados e sulfurados. Esses OEs são encontrados em várias plantas, mas são abundantes especialmente nas labiadas, mirtáceas, coníferas, rutáceas, lauráceas e umbelíferas (MATOS E FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993). A maioria dos OEs é largamente utilizada na indústria, como aromatizantes, para preparação de perfumes, sabões, desinfetantes e cosméticos, na preparação de alimentos como doces caseiros, licores, bebidas aromáticas e refrescantes assim como aguardente de cana (BIZZO et al., 2009). Além disso, os OEs, devido a sua complexa composição química, apresentam uma diversidade de ações farmacológicas, sendo fontes potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (SANTOS, 1997).

Embora haja um grande incentivo ao uso de fitoterápicos, é preciso uma melhor avaliação na sua prescrição, pois ao longo dos anos foi mostrado que várias plantas possuem substâncias agressivas e apresentam riscos toxicológicos, entre os quais toxicidade renal e hepática, dermatite, atividade carcinogênica, que podem ser exemplificados: pelo confrei (*Symphytum officinale* – *Boraginaceae*) usado como cicatrizante, nos distúrbios e irritação gastrointestinal, mas que possui efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos; por plantas do gênero *Senecio*, como a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) e arnica (*Arnica montana* L.) mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a trombetaireira (*Datura suaveolens*), também do gênero *Senecio* (VEIGA et al., 2005).

Assim como as plantas medicinais aromáticas, das quais são extraídos, os OEs são empregados na medicina popular, na forma de chás e infusatos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarreicos (KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989, MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), antissifilítico (MENDONÇA, 1989) e no tratamento da asma, doenças respiratórias e rinite alérgica

(BEZERRA, 1994; SILVA et al., 2003), da cólica menstrual, da diarreia sanguinolenta, da amebíase e giardíase (BORBA et al., 1990; MATOS, 2001) além de outras aplicações. Os OEs, assim como seus constituintes, mostraram efeitos farmacológicos como atividade antibacteriana, pró-inflamatória, pró-nociceptiva, antiinflamatória, anti-nociceptiva, analgésica, antioxidante, anticonvulsivante e moduladora contráctil do músculo esquelético, cardíaco e liso (BEZERRA, 1994; ALBUQUERQUE et al., 1995; FOGAÇA et al., 1997; MAGALHÃES, 1997, 2002; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997, 1998; SANTOS et al., 1996, 1997a,b; SANTOS & RAO, 1997, 1998; para referências, ver LEAL-CARDOSO & FONTELES, 1999; BEZERRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; LEAL-CARDOSO et al., 2002, 2010a,b; MADEIRA et al., 2002; CÂMARA et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; MAGALHÃES et al., 1998a,b, 2003, 2004, 2008; BENNIS et al., 2004; HAJHASHEMI et al., 2004; AZAZ et al., 2004; JAFFARY et al., 2004; PINA-VAZ et al., 2004; VIGO et al., 2004; COELHO-DE-SOUSA et al., 2005; LIMA-ACCIOLY et al., 2006; EVANGELISTA et al., 2007; LEONHARDT et al., 2010; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; MOREIRA-LOBO et al., 2010; PINHO-DA-SILVA et al., 2010; LIMA et al., 2011). Entretanto, ao nosso conhecimento ainda são pouquíssimos os dados na literatura que comprovam suas ações cardiovasculares, particularmente no que se refere a possíveis efeitos hipotensores e menos ainda, aqueles que reportam o mecanismo de ação desses OEs nesse sistema. Portanto, estudos nessa direção podem vir a corroborar o uso destas plantas aromáticas, na medicina popular, para o tratamento da HA.

Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado os efeitos cardiovasculares dos OEs provenientes de plantas medicinais aromáticas que tem largo uso na medicina popular principalmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Dentre os quais, destacam-se os OEs oriundos do *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) conhecido como marmeleiro vermelho, *Mentha x villosa* Huds. (Labiatae) conhecida como menta rasteira, *Alpinia zerumbet* Burt e Smith (Zingiberaceae) (sin: *Alpinia speciosa* Schum) denominada colônia, *Croton zehntneri* Pax et Hoffm (Euphorbiaceae) popularmente chamada de canela de cunhã, *Ocimum gratissimum* L (Labiatae) conhecida como alfavaca e, mais recentemente, da *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez (Lauraceae) [Syn. *A. Elliptica* A.C. SM., *Cryptocarya canelilla* Kunth] chamada de casca-preciosa. Estes estudos mostraram que a administração intravenosa (i.v.) do OE de *Croton nepetaefolius* (OECN; cujos principais constituintes são o 1,8-cineol e metil-eugenol), da *Mentha x villosa* (OEMV; cujo constituinte majoritário é o óxido de piperitenona), da *Alpinia zerumbet* (OEAZ; onde o principal constituinte é o terpinen-4-ol), do *Croton zehntneri*

(OECZ; cujos constituintes principais são anetol e estragol), do *Ocimum gratissimum* (OEOG, cujo constituinte principal é o eugenol) e da *Aniba canelilla* (OEAC; cujos constituintes principais são o 1-nitro-2-feniletano e metil-eugenol) induz quedas dose-dependentes da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos (LAHLOU et al., 1996a, 1999, 2001, 2002c,d, 2004c, 2005; de SIQUEIRA et al., 2006a,b), ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (INTERAMINENSE et al., 2010) ou hipertensos, DOCA-sal (LAHLOU et al., 1996b, 2000, 2002a, 2003; INTERAMINENSE et al., 2005), acordados. Efeitos similares foram observados após o tratamento i.v. com os principais constituintes desses OEs, tais como 1,8-cineol (LAHLOU et al., 2002b), metil-eugenol (LAHLOU et al., 2004a), eugenol (LAHLOU et al., 2004b), óxido de piperitenona (LAHLOU et al., 2001, 2002a), anetol (de SIQUEIRA et al., 2006a), estragol (de SIQUEIRA et al., 2006a) e terpinen-4-ol (LAHLOU et al., 2002c, 2003), sugerindo que os efeitos cardiovasculares do OECN, OEMV, OEAZ, OEAC, OECZ e OEOG podem ser parcialmente atribuídos as ações do (s) seu (s) respectivo (s) principal (ais) constituinte (s). Um conjunto de argumentos decorrentes de experimentos realizados tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” sugere que o efeito hipotensor desses OEs, assim como de seus principais constituintes seja consequente, em grande parte, de uma ação vasodilatadora direta na musculatura lisa vascular (LAHLOU et al., 1999, 2000, 2001, 2002a,b,c,d, 2003, 2004a,b,c, 2005; INTERAMINENSE et al., 2007; PINTO et al., 2009). Entretanto, o mecanismo envolvido na mediação da hipotensão e da bradicardia induzidas pelo OECZ (i.v.) em ratos normotensos, difere daquele dos demais OEs estudados até hoje. De fato, alguns dos estudos realizados por nossa equipe, mostraram que a hipotensão induzida pelo OECZ assim como seus principais constituintes, anetol e estragol, são principalmente de origem reflexa (reflexo vago-vagal) através da estimulação dos receptores vanilóides (TPRV₁), localizados nas fibras sensoriais vagais (de SIQUEIRA et al., 2006a,b).

2.6.1. *Aniba canelilla*

A *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. é uma planta aromática, pertencente a família Lauraceae, abundante na região Amazônia do Brasil, sendo conhecida popularmente no estado do Pará como “casca-preciosa” (Figura 10). No Brasil, o gênero *Aniba* é constituído por cerca de 40 espécies que são divididas de acordo com a natureza química do principal constituinte do seu óleo essencial. Dentre elas destacam-se: *Aniba burchelli*, *Aniba canellila*, *Aniba duckei*, *Aniba firmula*, *Aniba fragans*, *Aniba gardneri*, *Aniba guianensis*, *Aniba hastmanniana*, *Aniba*

parviflora, *Aniba permolis*, *Aniba pseudocoto*, *Aniba rosaeodora*, *Aniba riparia* e *Aniba terminalis* (MARQUES, 2001).



Figura 10. Folha e flores da *Aniba canellilla*

Fonte: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Lauraceae.htm>

Várias espécies pertencentes à família Lauraceae têm frutos comestíveis, substâncias aromáticas e óleos essenciais que são empregados na fabricação de aromatizantes, perfumes e medicamentos, destacando a importância econômica dessa família (MARQUES, 2001; MARANHÃO et al., 2009).

As espécies aromáticas de Lauraceae estão compreendidas principalmente entre os gêneros *Licaria*, *Dicypellium*, *Aniba*, *Nectandra* e *Ocotea*, nos quais os três últimos apresentam o maior número de espécies de importância econômica, visto que são as mais utilizadas na culinária, marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria química e de perfumaria, como também na medicina popular (ZOGHBI et al., 2003; MARQUES, 2001).

A *A. canellilla* é uma espécie importante e historicamente interessante da floresta Amazônica, porque foi confundida com as árvores da canela (cinamomo - *Cinnamomum zeylanicum*) durante uma viagem de Pizarro e Orellana, desde os Andes até a foz do rio Amazonas, em 1540 e durante uma expedição em 1800, por Humbolt e Bonpland na América do Sul, em busca da “canela famosa” do rio Orinoco (NARANJO et al., 1981). Durante a expedição, pensaram ter encontrado árvores de canela (cinamomo), porém, eram na verdade árvores de *A. canellilla*. Em 1960, os químicos Gottlieb e Magalhães identificaram que o OE da

A. canellila possuía um nitro-derivado odorífero, conhecido como NF, sendo este o verdadeiro responsável pelo aroma de canela encontrado na *A. canellila* (PINTO, 1995).

As partes utilizadas da *A. canellila* são as cascas, caules finos, folhas e sementes, com indicações de uso como especiaria, ingredientes para pratos locais, fragrâncias, sachês e como afrodisíaco. Na medicina popular, decocções da casca da *A. canellila* são normalmente utilizadas por seus efeitos analgésicos, anticonvulsivantes, antidepressivos, antimicrobianos, antissépticos, antiespasmódicos, bactericidas e carminativos (MAIA et al., 2001; INTERAMINENSE et al., 2010). Além disso, a *A. canellila* possui uma importante atividade antioxidante devido à presença dos alcalóides benzil-tetra-hidroisoquinolona e tetra-hidroprotoberberina em sua casca (da SILVA et al., 2007).

A casca do caule da *A. canellila* contém 1% de OE do peso seco da planta e o NF (Figura 11), o constituinte majoritário do OEAC. Como mencionado anteriormente, o NF é o único nitro-derivado odorífero que se conhece, sendo responsável pelo cheiro de canela das cascas desta planta (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960). O NF é também encontrado como substância intermediária da metabolização da fenilalanina em feniletanol pela via de descarboxilação ocorrida em frutos de *Solanum lycopersicum*. O metileugenol (ME) é outro importante constituinte volátil do EOAC e a porcentagem desses dois compostos determina a composição do OEAC e varia de acordo com a estação climática. O teor percentual do NF no EOAC chega a 90-95% no período chuvoso, enquanto que o ME permanece em torno de 5-10%. Em contrapartida, em épocas secas o teor de NF atinge valores diminuídos, em torno de 39% e o ME chega a 45% (TAVEIRA et al., 2003; de SIQUEIRA et al., 2010).

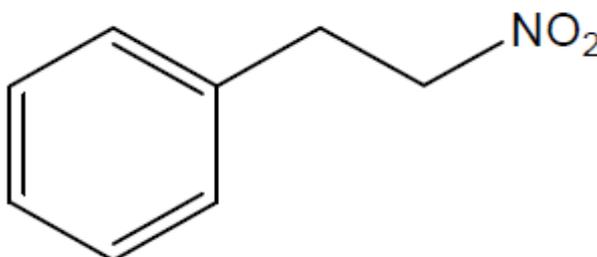


Figura 11. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (Fonte: de SIQUEIRA, 2010)

Pouco é conhecido acerca das ações farmacológicas do OEAC. Relatos sobre esse OE sugerem que ele possui propriedade fungistática (OGER et al., 1994) e que é capaz de relaxar a

musculatura lisa intestinal, o que justifica seu uso no tratamento de distúrbios gastrointestinais na medicina popular (MAIA et al., 2001). O NF mostrou possuir atividade analgésica e antiinflamatória, provavelmente de origem periférica. Embora este mecanismo ainda não esteja completamente elucidado, é provável que os receptores para opióides estejam envolvidos na sua atividade antinociceptiva (de LIMA et al., 2009). A dose letal (DL₅₀) correspondente a 712 ± 17,4 mg/kg, classificando-a como pertencente aos agentes xenobióticos de classe 4 (pouco tóxica) (de LIMA et al., 2009).

2.6.1.1 Efeitos cardiovasculares do nitrofeniletano

Recentemente os efeitos cardiovasculares do NF foram investigados através do uso de preparações *in vivo* e *in vitro*, mostrando-se que a injeção intravenosa (i.v.) deste constituinte do OEAC induziu uma queda da PAM e da FC, bifásica: o primeiro componente (fase 1) é rápido e foi caracterizado como um reflexo vago-vagal, o segundo componente (fase 2) ocorre mais tardiamente e parece ser decorrente de uma ação direta do NF na musculatura lisa vascular. A fase 1 induzida pelo NF está ausente após injeção direta no ventrículo esquerdo, sendo abolida pela bivagotomia ou pelo pré-tratamento perineural com a capsaicina, mas permanecendo inalterada pelo pré-tratamento com o antagonista dos receptores vanilóides TPRV₁, capsazepina, ou com o antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃, ondansetron. Em ratos normotensos acordados, a hipotensão e a bradicardia (fase 1) induzidas pelo NF foram abolidas pelo pré-tratamento com metilatropina. Em preparações de aorta oriundas de ratos normotensos, o NF induziu um relaxamento concentração-dependente da contração induzida por FEN (de SIQUEIRA et al., 2010). Ao contrário do OEAZ e seus constituintes, estes dados sugerem que o reflexo vago-vagal induzido pelo NF é iniciado nas aferências vagais pulmonares e não nas cardíacas. Porém, o mecanismo de transdução deste reflexo ainda não foi definido, e parece não envolver a ativação dos receptores vanilóides nem dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados nos nervos vagais sensoriais. A fase 2 da resposta hipotensora do NF parece ser mediada, pelo menos em parte, através de um mecanismo vasodilatador periférico (de SIQUEIRA et al., 2010).

Efeitos similares ao NF sobre a PAM e a FC foram também observados em SHRs, seguindo o mesmo mecanismo de ação daquele supramencionado observado em ratos normotensos (INTERAMINENSE et al., 2010). Recentemente, os mecanismos responsáveis pela mediação dos efeitos vasorrelaxantes do NF foram avaliados em preparações isoladas de

artéria mesentérica oriundas de ratos SHR. Os dados obtidos permitiram concluir que o NF (assim como o OEAC) induz seu efeito vasorrelaxante principalmente através de um mecanismo miogênico independente da integridade do endotélio, do que através de um mecanismo dependente de eventos na membrana celular, envolvendo canais de cálcio dependentes de voltagem ou de receptor (INTERAMINENSE, 2010). Este efeito vasorrelaxante, que foi preferencialmente dependente do acoplamento farmacomecânico é responsável pela fase 2 da resposta hipotensora do NF em SHR. Dentre os constituintes de OEs testados até o momento, a potência farmacológica do NF em relação ao efeito vasorrelaxante é a maior registrada.

3. JUSTIFICATIVA

O NF pode adotar diferentes conformações, principalmente pela rotação em torno da ligação dos carbonos sp^3 da cadeia lateral, responsáveis pela ocorrência dos isômeros conformacionais *anti* e *vici* (Figura 12), sendo o anel aromático coplanar em relação ao grupamento nitro (comunicação Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, UFPA)

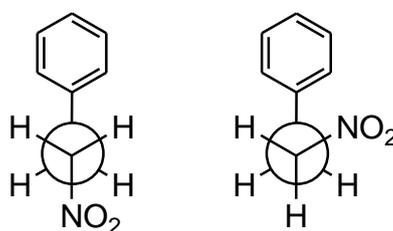


Figura 12. Estruturas conformacionais *anti* (à esquerda) e *vici* (à direita) do 1-nitro-2-feniletano

Nossa equipe de pesquisa tem interesse nesta molécula devido às possibilidades de estudar a correlação entre a estrutura química do NF *versus* sua atividade biológica, uma vez que este composto dispõe de pontos de modificação que permitem a geração de outros compostos que podem ter ação mais pronunciada e serem de fácil obtenção. Portanto, a primeira sugestão de modificação da molécula é a substituição dos carbonos sp^3 por sp^2 , promovendo uma restrição conformacional, que poderá favorecer a melhor interação fármaco-receptor. Neste sentido, é de grande interesse obter moléculas preferencialmente na conformação *trans* (E) em relação à conformação *cis* (Z), formando o *trans*-nitrofeniletano ou β -nitro-estireno (1-nitro-2-feniletano) (Figura 13).

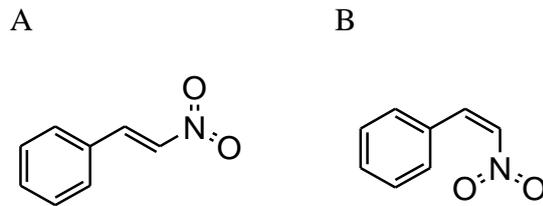


Figura 13. Estrutura dos isômeros *trans* (A) e *cis* (B) do 1-nitro-2-fenileteno.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Investigar os efeitos cardiovasculares de dois derivados do-NFE, o 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno (derivado I com grupamento metoxila) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno (derivado II com grupamento dimetilamina) (Figura 14) assim como os mecanismos envolvidos nestes efeitos, em ratos SHRs anestesiados.



Figura 14. Estrutura química do derivado I (direita) e II (esquerda) do 1-nitro-2-fenileteno a serem estudados.

4.2. Específicos

- Estudar a relação estrutura química e atividade vasorrelaxante do NFE e seus derivados (I e II) em preparações de artéria mesentérica superior, bem como a participação da enzima GC na mediação destes efeitos.
- Investigar os efeitos cardiovasculares dos derivados I e II comparando-os ao NFE;
- Determinar o papel das fibras sensoriais do tipo C sensíveis a capsaicina

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados ratos SHRs, machos, entre 12-18 meses de idade, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), mantidos à temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro padrão (12 horas claro/12 horas escuro), água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo: nº 23076.050472/2012-77).

5.2. Soluções e drogas

O NFE e os derivados I e II foram fornecidos pelo Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges (Coordenador do Laboratório de Síntese de Fármacos, Grupo de Química Farmacêutica e Medicinal da Amazônia, Universidade Federal do Pará). Os compostos foram dissolvidos em etanol e solução salina e foram administrados (i.v.) em um volume final de 100 μL , seguido por 0,2 mL de solução salina fisiológica para garantir a completa administração da dosagem.

O cloridrato de FEN (Sigma) e de ACh (Sigma) foram dissolvidos diretamente no meio de perfusão utilizado, que consiste na solução Krebs-Henseleit (KH) com tampão de bicarbonato (pH 7,4) com a seguinte composição em (mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO_3 25; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01. A capsaicina (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) foi preparada em Tween 80 a 1%, 1% de etanol e 98% de soro fisiológico. A 1H-oxadiazolol[4,3-a] quinoxalina-1-ona (ODQ) foi obtida da Tocris[®], USA.

5.3. Experimentos "*in vitro*"

5.3.1. Estudo de reatividade vascular em anéis de mesentérica superior

Os animais foram sacrificados, as artérias mesentéricas superiores foram removidas e imersas em meio de perfusão KH à temperatura ambiente. Após remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo aderido, as artérias foram cortadas em anéis medindo aproximadamente 3 mm, que foram suspensos, por meio de hastes, em cubas para órgão isolado (5 mL), contendo o meio de perfusão KH a 37 °C (pH = 7,4), aerado continuamente com a mistura de 95% O₂ e 5% CO₂. As tiras de artéria mesentérica foram contraídas com uma tensão passiva de 0,5 g, e a tensão foi registrada através de um transdutor de força isométrico acoplado a um sistema de aquisição (PowerLab 8/30, modelo ML870, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália).

5.3.2. Protocolos experimentais "*in vitro*"

Após o período de equilíbrio da preparação (cerca de 60 minutos), a contração controle foi induzida pela adição de 75 mM de KCl ao banho. Quando duas contrações controles, sucessivas, mostraram amplitudes similares, a preparação foi considerada em equilíbrio (teste de viabilidade da preparação). Cada preparação íntegra ou sem endotélio, pré-contraída, com FEN (1 μM) foi exposta no início do experimento a 10 μM de ACh. A ausência do efeito vasorrelaxante induzido pela ACh foi tomada como evidência de que a preparação foi efetivamente desnudada do endotélio. A retirada do endotélio foi realizada por raspagem cuidadosa da luz vascular. Os experimentos foram realizados de forma "pareada", ou seja, a cada sessão experimental foram montados quatro anéis em 4 cubas separadas, sendo duas experimentais e duas controles foram realizadas as seguintes séries de experimentos:

Série 1. Os efeitos vasculares de concentrações crescentes do NFE e dos derivados I e II sobre as contrações sustentadas provocadas por FEN (1 μM) foram estudados em preparações com ou sem endotélio. Experimentos similares foram realizados utilizando apenas o veículo (Etanol 40%) em concentrações equivalentes às utilizadas para dissolver os compostos.

Série 2. Foi realizada para avaliar a participação da enzima GC no efeito vasorrelaxante do NFE e dos derivados I e II. Para isto, preparações com endotélio foram pré-contraídas com FEN e pré-tratadas com ODQ (10 μ M), um inibidor da GC.

5.4. Experimentos “*in vivo*”

5.4.1. Cateterização dos animais

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e dois catéteres heparinizados (125 UI/mL em salina isotônica), foram implantados na aorta abdominal (para o registro da PA e da FC) e na veia cava inferior (para administração de drogas) e foram imediatamente registrados. No final dos experimentos, os ratos foram eutanasiados com uma "overdose" de pentobarbital sódico.

5.4.2. Sistema de registro

O catéter aórtico foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P23 DI) acoplado a um sistema de aquisição de dados Power Lab - ADInstruments™ para a medida da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC). A PAM de base foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$.

5.4.3. Protocolos experimentais “*in vivo*”

A administração i.v. dos derivados I e II foi sempre efetuada após um período de estabilização da PA e da FC. Estes parâmetros foram registrados durante 10 a 20 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. O tempo de latência para resposta foi medido a partir do fim da administração até o aparecimento da bradicardia ou da hipotensão. Injeções sucessivas de um dado derivado foram separadas por intervalo de 10 minutos para evitar possível o fenômeno de taquifilaxia.

Série 1. Nesta série de experimentos uma dose (15 mg/kg), em bolus, do NFE e dos derivados I e II foi injetada por via i.v. e o curso temporal das variações da PAM e da FC foi

registrado. A temperatura retal foi mantida próxima a 37°C com o auxílio de uma mesa termostática. A ação do NFE e dos derivados I e II foi também determinada 20 minutos após bivatotomia realizada em nível cervical.

Série 2. Esta série foi realizada para avaliar o papel das fibras C aferentes vagais sensíveis a capsaicina na mediação dos eventos cardiovasculares induzidos pelo NFE e pelos derivados I e II. Para este fim, foram estudadas as variações máximas da PAM e da FC induzidas pelo NFE e derivados I e II (15 mg/kg, i.v.) antes e 20 minutos após TPN de ambos os nervos vagos com capsaicina (250 µg/mL) - que induz uma dessensibilização das fibras sensoriais do tipo C, segundo protocolo previamente descrito (SCHELEGLE et al., 2000). A abolição imediata do reflexo hipotensor e bradicardizante (reflexo vago-vagal) induzido pela capsaicina (1 µg/kg, i.v.) foi considerada como critério de validação da dessensibilização das fibras C.

5.5. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As variações máximas da PAM e da FC após cada dose de um composto (NFE, derivados I e II) foram expressas em porcentagem dos valores basais. O valor da CI_{50} (média geométrica \pm 95% intervalo de confiança), definido como a concentração de um dado composto (µg/mL) requerida para produzir 50% da redução da resposta máxima da contração induzida por FEN, foi utilizado para avaliar a sensibilidade vascular para estes compostos. A significância ($P < 0,05$) dos resultados foi determinada pelo uso de testes t de Student (pareado ou não pareado), U de Mann-Whitney e análise de variância a uma via (concentrações, doses ou grupos) ou duas vias (tratamento x doses ou tratamento x concentrações), seguida pelo teste de contraste quando apropriado.

6. REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Controle neural da circulação e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 12 (4): 235-241, 2005.
- AGUIAR, L. A. Inibição da contratilidade do músculo liso traqueal de ratos por um diterpeno caurano isolado de *Croton argyrophyloides*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.**, 21(2): 220-31, 2007a.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **J. Anesth.**, 21 (2): 232-42, 2007b.
- ALBUQUERQUE, A. A.; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **J. Ethnopharmacol.**, 49: 41-49, 1995.
- AMARAL, D. A. Avaliação bioquímica, nutricional e cardiopulmonar de ratos recuperados de uma desnutrição proteica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica estrutural e fisiológica), Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2005.
- ATALA, M. M.; CONSOLIM-COLOMBO F. M. Influência dos polimorfismos dos genes dos receptores β-adrenérgicos na regulação cardiovascular e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Hipertens.**, 14 (4) : 258-264, 2007.
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, 7 (12): 51-60, 2011.
- AZAZ, A. D. et al. Composition and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Thymus species. **Z. Naturforsch. C.**, 59: 75-80, 2004.
- BARBOSA, A. L. Estudo dos efeitos do 1-nitro-2-feniletano em músculo liso vascular de rato. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 2012.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8: 328-338, 2001.
- BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Lett. Appl. Microbiol.**, 38: 454-458. 2004.
- BERNE, R. M.; LEVY M. N. Fisiologia. 5 ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2004.
- BEZERRA, M. A. C. *Alpinia speciosa* Schum: estudo de frações fixas e óleo essencial. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 1994.
- BEZERRA, M. A. C. et al. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytother. Res.**, 14: 549-551, 2000.

- BIZZO H. R.; HOVELL A. M. C.; REZENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova.**, 32 (3): 588-594, 2009.
- BORBA, M. O. P. et al. Frações ativas da *Mentha crisper* sobre camundongos albinos Swiss infectados com *Schistosoma mansoni* cepa São Lourenço da Mata. In: XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, João Pessoa, PB, Brasil, p. 49, 1990.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33: 179-189, 2000.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cult.**, 55 (3): 37-39, 2003.
- CÂMARA, C. C. et al. Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta. Med.**, 69: 1080-1085, 2003.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M. J.; HAIBARA A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8: 30-40, 2001.
- CARVALHO, A. F. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* linn. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 98: 569-571, 2003.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother. Res.**, 11: 299-304, 1997.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparation of the guinea pig. **Phytother. Res.**, 12: 189-194, 1998.
- COELHO-DE-SOUZA, L. N. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Med.**, 71: 1173-1175, 2005.
- CORRÊA T. D. et al. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Arq. Méd. ABC.**, 31 (2): 91-101, 2005.
- CORRÊA, C. C.; ALVES, A. F. Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. In: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, 2 (1): 47-58, 2010.
- CUNHA, A. P. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.
- CUNHA, A. P.; RIBEIRO, J. A.; ROQUE, O. R. Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.
- da SILVA, J. K. et al. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of Aniba canelilla (H.B.K.) Mez. **J. Agric. Food. Chem.**, 55 : 9422-9426, 2007.
- de ANGELIS K.; SANTOS M. S. B.; IRIGOYEN M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, (3), 2004.

- de LIMA, A. B. et al. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine.**, 16: 555-559, 2009.
- de 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, 2006a.
- de SIQUEIRA, R. J. B. et al. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 33: 238-247, 2006b.
- de SIQUEIRA, R. J. B. et al. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 638: 90-98, 2010.
- de SIQUEIRA R. J. et al. Linalool-rich Rosewood Oil Induces Vago-vagal Bradycardic and Depressor Reflex in Rats. **Phytother. Res.**, 2013 Feb 27. doi: 10.1002/ptr.4953. [Epub ahead of print].
- de SMET, P. A. Herbal remedies. **N. Engl. J. Med.**, 347: 2046-2056, 2002.
- DONATO, A. M.; de MORRETES B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 17 (3): 426-443, 2007.
- EVANGELISTA, G. L. et al. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **J. Ethnopharmacol.**, 109: 515-522, 2007.
- FATHI, A. R. et al. Michael adducts of ascorbic acid as inhibitors of protein phosphatase 2A and inducers of apoptosis. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 10: 1605-1608, 2000.
- FOGAÇA, R. T. H. et al. The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. **Phytother. Res.**, 11: 552-557, 1997.
- FOGLIO, M. A. et al. Plantas Mediciniais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, 7, 2006.
- FRANK, K. F. et al. Sarcoplasmatic reticulum Ca^{+2} -ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovasc. Res.**, 57: 20-27, 2003.
- GOLAN D. E. et al. Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2. ed. Guanabara Koogan, 2009. 914p.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist Analyst.**, v. 49, p. 114, 1960.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev.**, 7: 335-346, 2006.
- HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; JAFARABADI, H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. **Phytother. Res.**, 18: 195-199, 2004.
- HOROWITZ A. et al. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. **Physiol. Rev.**, 76: 967-1003, 1996.

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.**, 71: 376-378, 2005.

INTERAMINENSE, L.F. et al. Pharmacological evidence of calcium channel blockade by the essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aorta rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 21: 497-506, 2007.

INTERAMINENSE L. de F. et al. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 25 (6): 661-669, 2010.

INTERAMINENSE L. de F. et al. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 48 (4-5): 709-716, 2013.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO F. M.; KRIEGER E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8 (1): 55-62, 2001.

IRIGOYEN, M. C. et al. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Rev. Bras. Hipertens.**, 12, (4): 229-233, 2005.

JAFFARY, F.; GHANNADI, A.; SIAHPOUSH, A. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Zataria multiflora*. **Fitoterapia.**, 75: 217-220, 2004.

JOCA R. P. M. M. Ação vasorelaxante do terpinen-4-ol em aorta torácica de ratos. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

KAAP, S. et al. Structure-activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effects of nitrostyrene adducts and related compounds. **Biochem. Pharmacol.**, 65: 603-610, 2003.

KIUSHI, F. Et al. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptenoids. **Chem. Pharm. Bull.**, 40: 387-391, 1992.

KLAYMAN, D. L. Quinghaosu (Artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science.**, 228: 1049-1055, 1985.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 30 (3): 241-248, 2009.

LAHLOU, S. et al. Papel do sistema nervoso autônomo nos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* em ratos normotensos, acordados. **In**, Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil. pp. 107, 1996a.

LAHLOU, S. et al. Avaliação dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* em ratos com hipertensão DOCA-sal, acordados. **In**: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil, pp. 107, 1996b.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, 65: 553-557, 1999.

- LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Med.**, 66: 138-143, 2000.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, 67: 638-643, 2001.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt hypertensive rats. **Phytomedicine.**, 9: 715-720, 2002a.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 80: 1125-1131, 2002b.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, 68: 1097-1092, 2002c.
- LAHLOU, S. et al. Involvement of the nitric oxide in the mediation of the hypotensive action of the essential oil of *Mentha x villosa* in normotensive conscious rats. **Planta Med.**, 68: 694-699, 2002d.
- LAHLOU, S. et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 17: 323-330, 2003.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sci.**, 74: 2401-2412, 2004a.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many essential oils, in normotensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 43: 250-257, 2004b.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 31: 219-225, 2004c.
- LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 46: 412-421, 2005.
- LAVABRE M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais, 2ª ed. Rio de Janeiro: Record, 1993.
- LEAL-CARDOSO, J. H., FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **Anais Acad. Bras. Ciênc.**, 71: 201-213, 1999.
- LEAL-CARDOSO, J. H. et al. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 80: 901-906, 2002.
- LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent beta-caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 24: 79-758, 2010.

- LIMA-ACCIOLY, P. M. et al. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 33: 1158-1163, 2006.
- LIMA, F. C. et al. Antispasmodic effects of eugenol on rat airway smooth muscle. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 25(6): 690-699, 2011.
- LOZIENE, K. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. **Food Chem.**, 103: 546-559, 2007.
- MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 28 (1): 123-128, 2007.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova.**, 25 (3): 429-438, 2002.
- MADEIRA, S. V. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. **J. Ethnopharmacol.**, 81: 1-4, 2002.
- MAGALHÃES, P. J. C. Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaio. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 1997.
- MAGALHÃES, P. J. C. et al. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.**, 12: 172-177, 1998a.
- MAGALHÃES, P. J. C. et al. Efeito do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (OECN) sobre a aorta isolada de ratos normotensos e hipertensos. **In**, XIII Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brasil. p. 109, 1998b.
- MAGALHÃES, F.; COSTA I.; FARIA L. L. Filamentos de Actina, Miosina e filamentos intermediários. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 2 (2): 2002.
- MAGALHÃES, P. J. C. et al. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Med.**, 69: 874-877, 2003.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 18: 539-546, 2004.
- MAIA, J. G.; ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. H. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém (Brazil): Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeld. 186, 2001.
- MARANHO L. T.; PREUSSLER K. H.; ROCHA L. D. Organização estrutural da casca de *Persea major* Kopp (Lauraceae). **Acta Bot. Bras.**, 23(2): 509-515, 2009.

- MARQUES, C. A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente.**, 8: 195-206, 2001.
- MATOS, F. J. A.; FERNANDES, A. Relatórios de Excursões do Programa Estudo Químico de Óleos Essenciais de Plantas Nativas e Cultivadas no Nordeste. Convênio BNB-CNPq-UFC, 1978.
- MATOS, F. J. A. Farmácias vivas, Fortaleza, Edições UFC, 2001.
- MENDONÇA, V. L. M. Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 1989.
- MENDONÇA, V. L. M. et al. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 86: 93-97, 1991.
- MILL J. G.; VASSALLO D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8: 63-75, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- MONTEIRO F. S. Participação de receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric: (Solanaceae). Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- MONTEZANO A. C. I.; TOSTES R. C. A. Receptores nucleares, receptores de membrana e mensageiros secundários. **Rev. Bras. Hipertens.**, 12 (2): 84-88, 2005.
- MOREIRA-LOBO, D. C. et al. Eugenol modifies the excitability of rat sciatic nerve and superior cervical ganglion neurons. **Neurosci. Lett.**, 472: 220-224, 2010.
- MOURA P. R.; VIDAL F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Sci. Med**, 21 (1): 31-36, 2011.
- NARANJO, P. et al. *Ocotea quixos*, American cinnamon. **J. Ethnopharmacol.**, 4, 233-236, 1981.
- NEGRÃO C. E.; RONDON M. U. P. B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8: 89-95, 2001.
- NETO J. M. F. A.; VILARTA R. O papel do cálcio nos eventos de contração e desencadeamento de lesões musculares. **EFDeportes.com, Revista Digital**. 169: 2012. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/>>
- NISHIMURA, J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. **J. Pharmacol. Sci.**, 102 (1): 27-31, 2006.
- NOVAES, W. (Coord.); RIBAS, O.; NOVAES, P. da C. Agenda 21 Brasileira-Bases para discussão. Brasília: MMA/PNUD, 196 p., 2000.

- OGER, J. M. et al. Aniba canelilla (H.B.K.) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **J. Essential. Oil. Res.**, 6 (5): 493-497, 1994.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Antinoceptive effects of essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 1471-1474, 2001.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 228 p.
- PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev. Bras. Hipertens.**, 12 (2): 89-92, 2005.
- PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 24: 341-350, 2010.
- PEREIRA R. G. A. exercícios físicos na melhora da sensibilidade barorreflexa arterial: uma revisão. **Estudos**, 36 (9-10): 1091-1101, 2009.
- PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, 18: 73-78, 2004.
- PINHO-DA-SILVA, L. et al. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine.**, 17: 721-725, 2010.
- PINTO, A. C. O. Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Quim. Nova.**, 18 (6): 608-615, 1995.
- PINTO A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova.**, 25 (1): 45-61, 2002.
- PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 4: 12-15, 1998.
- QUADROS, F. F.; RIBEIRO J. L. Exercício físico: prevenção da síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Educação Física, Esporte, Lazer e Dança**, 3(3): 102-115, 2008.
- RATES S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 11 (2): 57-69, 2001.
- REMBOLD, C. M. Regulations of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension.**, 20: 129-137, 1992.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiotechnologia. São Paulo: Premier, 1997. 327p.
- RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Racine**, 70: 30-35, 2002.
- SALDANHA C. Calmodulina e ATP-ase do cálcio. **Actas Bioq.**, 1: 15-25, 1989.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA E. R. Studies on the neuropharmacological effects of *Psidium guayanensis* and *Psidium pohlianeum* essential oils. **Phytother. Res.**, 10: 655-658, 1996.

- SANTOS, F. A. Atividade antibacteriana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* PERS. e *Psidium pohlianum* BERG. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. The leaf essential oil of *Psidium guyanensis* offers protection against pentylenetetrazole-induced seizures. **Planta Med.**, 63: 133-135, 1997a.
- SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of essential oil from *Psidium and Pilocarpus* species of plants. **Phytother. Res.**, 11: 67-69, 1997b.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Mast cell involvement in the paw edema oedema response to 1,8 cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. **Eur. J. Pharmacol.**, 331: 253-258, 1997.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Inflammatory edema induced by 1,8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine.**, 5: 115-119, 1998.
- SILVA A. S.; ZANESCO A. Exercício físico e resposta vascular. **J. Vasc. Bras.**, 9 (2): 47-56, 2010.
- SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **J. Ethnopharmacol.**, 89: 277-283, 2003.
- SIQUEIRA-BATISTA R. et al. O Sistema nervoso autônomo. **Rev. Bras. Clín. Ter.**, 30 (5): 206-212, 2004.
- TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. **Biochem. System. Ecol.**, 31: 69-75, 2003.
- TOLEDO M. G. T.; ALQUINI Y.; NAKASHIMA T. Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, 40 (4): 2004.
- UETA C. B. Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa. Dissertação (Mestrado em Anatomia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH. **Arq. Bras. Cardiol.**, p. 1-48, 2006.
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH. **Rev. Bras. Hipertens.**, 17 (1): 5-6, 2010.
- VALENTI V. E. et al. Regulação neural do sistema cardiovascular: centros bulbares. **Rev. Neurociênc.**, 15 (4): 317–320, 2007.
- VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova.**, 28 (3), 2005.
- 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.**, 37. (2): 66-72, 2010.
- VIGO, E. et al. In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. **J. Pharm. Pharmacol.**, 56: (2):257-63.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advan. Physiol. Educ.**, 27: 201-206, 2003.

WERFF H.; RICHTER H. G. Toward an Improved Classification of Lauraceae. **Missouri Botanical Garden**, 83 (3): 409-418, 1996.

YAMAGUCHI, K. K.; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amaz.**, 42: 541-546, 2012.

ZAGO A. S.; ZANESCO A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. **Arq. Bras. Cardiol.**, 87 (6): 264-270, 2006.

ZANESCO A.; ZAROS P. R. Exercício físico e menopausa. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 31 (5): 254-261, 2009.

ZOGHBI M. G. B. Constituintes voláteis de espécies de Lauraceae com ocorrência na Floresta Nacional de Caxiuanã – Melgaço – PA. CBO_014 - ESTAÇÃO CIENTÍFICA FERREIRA PENNA - DEZ ANOS DE PESQUISA NA AMAZÔNIA.

7. Artigo

Artigo 1 a ser submetido a revista "Acta Amazonica"

1 **Efeitos cardiovasculares do 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno e 1-nitro-2-**
 2 **[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno, dois derivados do 1-nitro-2-feniletano, em**
 3 **ratos hipertensos anestesiados**

4
 5 Thayane Rebeca Alves dos SANTOS ^a, Odair Alves da SILVA ^a, Rosivaldo dos Santos
 6 BORGES ^b, Glória Isolina Boente Pinto DUARTE ^a, Saad LAHLOU ^{c*}

7
 8 ^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
 9 Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

10 ^b Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belem, PA, Brasil.

11 ^c Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará,
 12 Fortaleza, CE, Brasil.

13 *Autor correspondente. Prof. Saad Lahlou, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal
 14 do Ceará. R. Coronel Nunes de Melo, 1127 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, 60430-270, Brasil. E-
 15 mail:lahlou562@gmail.com

16
 17 **RESUMO**

18 Previamente, foi mostrado por nossa equipe de pesquisa que o 1-nitro-2-feniletano (NF), o
 19 principal constituinte do óleo essencial de *Aniba canellila*, uma planta nativa da Amazônia,
 20 reduz a pressão arterial e possui efeitos vasorrelaxantes. Mais recentemente, foi observado
 21 que o 1-nitro-2-feniletano (NFE), um derivado obtido de maneira sintética através de restrição
 22 conformacional da molécula do NF, possui uma potência 3 a 4 vezes maior para relaxar
 23 preparações isoladas de aorta torácica de rato em comparação ao NF (de origem natural). No
 24 presente estudo, visando melhorar a interação fármaco-receptor, nós investigamos os efeitos
 25 cardiovasculares de dois derivados do NFE, o 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno (derivado I
 26 com grupamento metoxila) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno (derivado II com
 27 grupamento dimetilamina) em ratos espontaneamente hipertensos. Sabe-se que os
 28 grupamentos metoxila e dimetilamina são elétron-doadores e podem alterar o aspecto
 29 eletrônico da molécula do NFE. Dados preliminares mostram que injeções intravenosas em
 30 *bolus* do NFE e dos derivados I e II induziram efeito hipotensor e bradicardizante bifásicos
 31 (fase 1 rápida e fase 2 mais tardia). A fase 1 da hipotensão e bradicardia tende a ser reduzida
 32 ou abolida após a bivotomia e o tratamento perineural dos vagos com capsaicina (250
 33 µg/mL). A magnitude da segunda hipotensão (fase 2) tende a ser 3-4 vezes maior para os
 34 derivados I e II comparada ao NFE. Os dados dos experimentos *in vitro* mostram que
 35 derivados I e II induziram vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior, pré-
 36 contraídas com fenilefrina (1 µM) com valores de CI₅₀ [(média geométrica - intervalo de
 37 confiança de 95%)] de 22,41 [27,52-15,23] e 17,13 [31,29-11,82] µM, respectivamente. Estes
 38 efeitos vasorrelaxantes não foram influenciados pela remoção do endotélio vascular, portanto
 39 foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com o ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-
 40 [4,3-a]-quinoxalin-1-ona, 10 µM), um inibidor da guanilato ciclase. Além disso, foi mostrado
 41 que a potência dos derivados I e II (avaliada através dos valores da CI₅₀) em relaxar
 42 preparações de SMA de ratos SHR foi aumentada em comparação ao NFE (37,95 [95,83-
 43 17,74] µM). Apesar de que este aumento não atingiu nível de significância, é interessante
 44 correlacioná-lo com a aparente amplificação da resposta hipotensora da fase 2 induzida pelos
 45 os derivados I e II em relação ao NFE. Em conclusão, os derivados I e II, assim como o NFE,
 46 induziram um reflexo depressor e bradicardizante vago-vagal (fase 1). A hipotensão tardia
 47 (fase 2) parece ser resultante de um efeito vasodilatador por um mecanismo miogênico

48 independente da integridade endotelial e parece envolver a participação da via guanilato
49 ciclase/GMPc/PKG.

50 **PALAVRAS-CHAVE:** 1-nitro-2-feniletano, artéria mesentérica isolada, reflexo vago-vagal
51 ratos espontaneamente hipertensos, relação estrutura-atividade

52

53 **ABSTRACT:**

54 Previously, we showed that 1-nitro-2-phenylethane (NP), the main constituent of the essential
55 oil of the *Aniba canellila*, a plant native to the Amazon, lowers blood pressure and induces
56 vasorelaxant effects. Recently, it was reported that 1-nitro-2-phenylethane (NPE), a structural
57 analogue of NP obtained synthetically, was more potent than NP to relax aortic ring
58 preparations than NP (of natural origin). Here, in order to improve drug-receptor interaction,
59 we intended to investigate the cardiovascular effects of two derivatives of NPE, the 1-nitro-2-
60 [(4'-methoxy)-phenyl]-ethane (derivate I) and 1-nitro-2-[(4'-dimethylamine)-phenyl]-ethane
61 (derivate II) in spontaneously hypertensive rats. It is well-known that methoxy and
62 dimethylamine groups are electron donors and can alter the electronic parameters of the
63 molecule of NPE. The present preliminary results showed that intravenous injection of NPE
64 induced two periods of hypotension and bradycardiac (phases 1 and 2). A phase 1 tended to
65 be reduced or even abolished by bivatotomy and perineural treatment with capsaicin
66 (250µg/mL) and magnitude of hypotensive phase 2 induced by derivatives I and II tended to be
67 3-4 times higher than that evoked by NPE. Derivates I and II relaxed endothelium-intact
68 superior mesenteric artery (SMA) ring preparations pre-contracted with phenylephrine (1 µM)
69 with IC₅₀ (geometric mean [95% confidence interval]) values of 22.41 [27.52-15.23] and
70 17.13 [31.29-11.82] µM, respectively). These vasorelaxant effects remained unchanged by
71 removal of the vascular endothelium but were significantly reduced by pretreatment with
72 ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-one, 10 µM), an inhibitor of guanylate
73 cyclase. Furthermore, it was shown that potency of the derivatives I and II (as measured by
74 IC₅₀ values) in relaxing preparations SMA was increased when compared to that of NPE.
75 Although this increase did not reach significance level, it is interesting to correlate it with the
76 apparent amplification of the hypotensive phase 2 response induced by both derivatives I and
77 II compared to that NPE. In conclusion, NPE and its two derivatives induced a vago-vagal
78 bradycardiac and depressor reflex (phase 1). The delayed hypotension (phase 2) seems to
79 result from a vasodilatory effect by a miogenic mechanism independent of endothelial
80 integrity and appears to involve the participation of adenylate cyclase /cGMP/PKG pathway.

81 **KEYWORDS:** 1-nitro-2-phenylethane, mesenteric artery isolated, spontaneously hypertensive
82 rats, vago-vagal reflex, structure-activity relationship

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96 INTRODUÇÃO

97 1-Nitro-2-feniletano (NF) é um derivado nitro, que é raramente encontrado em plantas
98 superiores e ao qual se atribui o odor de canela da *Aniba canellila* (PINTO 1995), uma planta
99 abundante na Amazônia. O chá das folhas dessa planta é utilizado como antiespasmódico,
100 carminativo e digestivo. Em estudos anteriores nossa equipe mostrou que o óleo essencial da
101 *Aniba canellila* (OEAC), bem como seu maior constituinte, o NF, induziu queda da pressão
102 arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) bifásica, tanto em ratos normotensos (de
103 SIQUEIRA *et al.* 2010), quanto em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)
104 (INTERAMINENSE *et al.* 2010). A primeira fase rápida é de origem reflexa vago-vagal e a
105 segunda fase tardia resulta do efeito vasodilatador do NF através da estimulação da via
106 guanilato ciclase/GMPc.

107 Recentemente, os mecanismos responsáveis pela mediação dos efeitos vasorrelaxantes do
108 NF foram estudados em preparações isoladas de artéria mesentérica oriundas de ratos SHR
109 (INTERAMINENSE *et al.*, 2010) ou de artéria torácica oriundas de ratos normotensos
110 (BRITO *et al.*, 2013). Os efeitos vasodilatadores do NF são independentes da integridade da
111 camada endotelial nos vasos sanguíneos e da liberação do óxido nítrico (ON) visto que
112 ocorrem mesmo na vigência de inibição farmacológica da enzima ON sintetase (NOS) pelo L-
113 NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (INTERAMINENSE *et al.*, 2010;
114 BRITO *et al.*, 2013). Entretanto, a inibição da atividade da enzima guanilato ciclase (GC)
115 solúvel pela oxidação do grupamento heme com ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-
116 quinoxalin-1-ona) reduz o efeito vasorrelaxante do NF. Em segmentos de aorta, o NF aumenta
117 os níveis intracelulares do guanosina monofosfato cíclico (GMPc), efeito também abolido
118 pelo ODQ. Estes dados mostram que o NF induz seu efeito vasodilatador através da
119 estimulação da via guanilato ciclase/GMPc de forma independente da liberação de ON pelo
120 endotélio vascular, mas dependente do grupamento heme da enzima GC (BRITO *et al.*, 2013).

121 Considerando que a molécula do NF pode adotar diferentes conformações, a correlação
122 entre a estrutura química do NF versus atividade biológica passa a ser de especial interesse
123 (VALE *et al.* 2013). Recentemente, foi mostrado que o 1-nitro-2-feniletano (NFE), um
124 derivado sintético formado após restrição conformacional em virtude da substituição dos
125 carbonos sp^3 por sp^2 , possui uma maior potência vasorrelaxante em comparação ao NF
126 (BARBOSA 2012).

127 Nesse trabalho, investigou-se os efeitos cardiovasculares de dois derivados do
128 nitrofeniletano (NFE), o 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-etano (derivado I com grupamento
129 metoxila) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-etano (derivado II com grupamento
130 dimetilamina), assim como os mecanismos envolvidos nestes efeitos, em ratos
131 espontaneamente hipertensos anestesiados.

132

133 **MATERIAIS E MÉTODOS**

134 **Animais:** Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos, machos, entre 12-18 meses de
135 idade, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
136 Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), mantidos à temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$,
137 ciclo claro/escuro padrão (12 horas claro/12 horas escuro), água e ração *ad libitum*. Os
138 protocolos foram realizados obedecendo as normas preconizadas “*Guide for the Care and Use*
139 *of Laboratory Animals*, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-
140 23, revisado em 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da
141 Universidade Federal de Pernambuco (Processo: nº 23076.050472/2012-77).

142 **Soluções e drogas:** Para experimentos *in vivo*, o NFE e os derivados 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-
143 fenil]-etano (I) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-etano (II), foram dissolvidos em etanol e
144 água destilada. Para injeções i.v., os compostos foram administrados em um volume final de
145 100 μL , seguido por 0,2 mL de solução salina fisiológica para garantir a completa

146 administração da dosagem. O cloridrato de FEN (Sigma) e de ACh (Sigma) foram dissolvidos
147 diretamente no meio de perfusão utilizado, que consiste na solução Krebs-Henseleit com
148 tampão de bicarbonato (pH 7,4) com a seguinte composição em (mM): NaCl 118; KCl 4,7;
149 NaHCO₃ 25; CaCl₂. 2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01. A
150 capsaicina (Sigma®, St. Louis, MO, USA) foi preparada em Tween 80 a 1%, 1% de etanol e
151 98% de soro fisiológico. A 1H-oxadiazolol[4,3-a] quinoxalina-1-ona (ODQ) foi obtida da
152 Tocris®, USA.

153

154 **EXPERIMENTOS "IN VITRO"**

155 **Estudo de reatividade vascular em anéis de mesentérica superior:** Os animais foram
156 sacrificados, as artérias mesentéricas superiores foram removidas e imersas em meio de
157 perfusão à temperatura ambiente. Após remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo
158 aderido, as artérias foram cortadas em anéis medindo aproximadamente 3 mm, que foram
159 suspensos, por meio de hastes, em cubas para órgão isolado (5 mL), contendo o meio de
160 perfusão (solução Krebs-Henseleit) a 37 °C (pH = 7,4), aerado continuamente com a mistura
161 de 95% O₂ e 5% CO₂. Os anéis de artéria mesentérica foram contraídos com uma tensão
162 passiva de 0,5 g, e a tensão foi registrada através de um transdutor de força isométrico
163 acoplado a um sistema de aquisição (PowerLab 8/30, modelo ML870, ADInstruments, Bella
164 Vista, NSW, Austrália).

165 **Protocolos experimentais "in vitro":** Após o período de equilíbrio da preparação (cerca de
166 60 minutos), a contração controle foi induzida pela adição de 75 mM de KCl ao banho.
167 Quando duas contrações controles, sucessivas, mostraram amplitudes similares, a preparação
168 foi considerada em equilíbrio (teste de viabilidade da preparação). Cada preparação íntegra ou
169 sem endotélio, pré-contraída, com fenilefrina (FEN, 1 μM) foi exposta no início do
170 experimento a 10 μM de acetilcolina (ACh). A ausência do efeito vasorrelaxante induzido pela

171 ACh foi tomada como evidência de que a preparação foi efetivamente desnudada do endotélio.
172 A retirada do endotélio foi realizada por raspagem cuidadosa da luz vascular. Foram avaliados
173 os efeitos vasculares de concentrações crescentes do NFE e dos derivados I e II sobre a
174 contração sustentada induzida por FEN (1 μ M) em preparações com ou sem endotélio.
175 Experimentos similares foram realizados utilizando apenas o veículo (etanol 40%) em
176 concentrações equivalentes às utilizadas para dissolver os compostos (Série 1). Além disso, os
177 efeitos vasculares do NFE e seus derivados foram também estudados em preparações com
178 endotélio intacto pré-contraídas com FEN (1 μ M) e pré-tratadas com ODQ (10 μ M) (Série 2).

179

180 **EXPERIMENTOS “*IN VIVO*”**

181 **Cateterização dos animais:** Ratos SHR foram anestesiados com pentobarbital sódico (50
182 mg/kg, i.p.) e dois catéteres heparinizados (125 UI/mL em salina isotônica), foram
183 implantados na aorta abdominal (para o registro da PA e da FC) e na veia cava inferior (para
184 administração de drogas). Imediatamente após a cirurgia, os animais foram submetidos aos
185 experimentos e no final, os ratos foram sacrificados com uma "overdose" de pentobarbital
186 sódico.

187 **Sistema de registro:** No momento do experimento, o catéter arterial foi conectado a um
188 transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados Power Lab -
189 ADInstruments™ para a medida da frequência cardíaca, das pressões arteriais sistólica (PAS) e
190 diastólica (PAD). A PAM de base foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$.

191 **Protocolos experimentais "in vivo":** A administração i.v. dos derivados I e II foi sempre
192 efetuada após um período de estabilização da PA e da FC. Estes parâmetros foram registrados
193 durante 10 a 20 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. O tempo de latência para uma
194 dada resposta foi medido a partir do fim da administração até o aparecimento da bradicardia ou
195 da hipotensão. Injeções sucessivas de um dado derivado foram separadas por intervalo de 10

196 minutos para evitar possível fenômeno de taquifilaxia. Foram realizadas algumas séries
197 experimentais. Na primeira série, animais receberam um injeção i.v. em bolus de uma dose (15
198 mg/kg) do NFE e seus derivados I e II e o curso temporal das variações da PAM e da FC foi
199 registrado. A variações máximas de PAM e FC induzidas pelo NFE e dos derivados I e II
200 foram também determinadas antes e 20 minutos após bivagotomia cervical (Série 1), e antes e
201 20 minutos após um tratamento perineural bilateral com capsaicina (250 µg/mL) (Série 2).

202

203 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

204 Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As variações
205 máximas da PAM e da FC após cada dose de um composto (NFE, derivados I e II) foram
206 expressas em porcentagem dos valores basais. O valor da CI_{50} (média geométrica ± 95%
207 intervalo de confiança), definido como a concentração de um dado composto requerida para
208 produzir 50% da redução da resposta máxima da contração induzida por FEN, foi utilizado
209 para avaliar a sensibilidade vascular para estes compostos. A significância ($P < 0,05$) dos
210 resultados foi determinada pelo uso de testes t de Student (pareado ou não pareado), U de
211 Mann-Whitney e análise de variância a uma via (concentrações, doses ou grupos) ou duas vias
212 (tratamento x doses ou tratamento x concentrações), seguida pelo teste de contraste quando
213 apropriado.

214

215 **RESULTADOS**

216 **EXPERIMENTOS *IN VITRO***

217 **Efeito vasorrelaxante de 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno (Derivado I) e 1-nitro-2-[(4'- 218 dimetilamina)-fenil]-eteno (Derivado II): Influência do endotélio**

219 Em preparações de anéis de SMA com endotélio intacto, concentrações crescentes e
220 cumulativas dos derivados I (11-5600 µM) e II (10,5-5200 µM) relaxaram a contração

221 sustentada induzida por FEN (10 μ M) de maneira dependente da concentração ($P < 0,001$,
222 ANOVA). Este efeito se tornou significativo ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) na concentração
223 de 11 e 10,5 μ M, respectivamente e seu máximo foi alcançado nas concentrações de 110 e
224 2600 μ M, respectivamente (Figs. 1C e 1D). Entretanto, o efeito relaxante concentração-
225 dependente do NFE se tornou significativo ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) apenas na
226 concentração de 33 μ M e atingiu seu máximo na concentração de 1300 μ M (Fig. 1B). Os
227 valores da CI_{50} (μ M) para o efeito relaxante dos ambos derivados I (22,41 [27,52-15,23]) e II
228 (17,13 [31,29-11,82]) foram reduzidos em relação aquele para o efeito relaxante do NFE
229 (37,95 [95,83-17,74]). Entretanto, esta redução não atingiu um nível de significância ($P >$
230 0,05, Teste U de Mann-Whitney). O tratamento de preparações pré-contraídas com FEN
231 apenas com o veículo (etanol) nos mesmos volumes dos derivados não induziu resposta
232 vascular significativa quando comparado à contração máxima da FEN (Fig. 1).

233 A remoção do endotélio não alterou de maneira significativa o efeito relaxante induzido pelos
234 derivados I (Fig. 2A) e II (Fig. 2B) uma vez que o efeito relaxante foi alcançado e os valores
235 da CI_{50} (22,21 [58,76-16,12] e 30,72 [52,16-14,25] μ M, respectivamente) não foram
236 significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferentes quando comparados aos
237 valores correspondentes nas preparações com endotélio funcional. Além disso, o efeito
238 vasorrelaxante para os derivados I (Fig. 2A) e II (Fig. 2B) em preparações sem endotélio
239 funcional pré-contraídas com FEN também se tornou significativo ($P < 0,05$, teste de
240 Bonferroni) nas concentrações de 11 e 10,5 μ M, respectivamente.

241 **Influência do ODQ no efeito vasorrelaxante do NFE e dos derivados I e II**

242 O tratamento dos anéis de SMA com endotélio intacto com o ODQ (10 μ M) diminuiu
243 significativamente ($P < 0,05$, ANOVA a duas vias) a resposta vasodilatadora induzida pelo
244 NFE (Fig. 3B) e seus derivados I (Fig. 3C) e II (Fig. 3D). Os valores da CI_{50} para o efeito

245 vasorrelaxante do NFE assim como dos derivados I e II foram significativamente ($P < 0,05$,
246 teste de Mann-Whitney) aumentados para 103,2 [114,9-92,83], 43,34 [45,40-32,78] e 487,5
247 [958,9-62,99] μM , respectivamente (vide tabela 1). Na presença de ODQ, o primeiro efeito
248 significativo dos derivados I e II também foi observado nas concentrações de 11 e 10,5 μM ,
249 respectivamente (Figs. 3C e 3D, respectivamente).

250

251 **EXPERIMENTOS *IN VIVO***

252 **Estudo dos efeitos cardiovasculares do NFE e seus derivados em ratos SHR** 253 **anestesiados: Influência da bivagotomia (Série 1)**

254 Os efeitos da bivagotomia e do tratamento perineural com capsaicina sobre os valores basais
255 da PAM e FC são resumidos na tabela 2. A injeção i,v, de uma dose de 15 mg/kg do NFE e
256 seus derivados I e II induziu hipotensão e bradicardia bifásicas (Fig.4). O primeiro
257 componente (fase 1) é rápido com um tempo de latência em torno de 1 segundo, já o segundo
258 componente (fase 2) ocorre mais tardiamente com um tempo de latência oscilando entre de 7-
259 10 segundos. Vale salientar que em ratos intactos, o tempo de latência da fase 2 para
260 hipotensão e bradicardia é similar àquele registrado em ratos que foram submetidos à
261 bivagotomia ou ao pré-tratamento perineural com capsaicina (em torno de 10 segundos).

262 Devido ao número reduzido dos experimentos ($n = 2$), nenhuma análise estatística pode ser
263 concluída a cerca da comparação dos efeitos cardiovasculares do NFE vs. seus derivados e da
264 influência da bivagotomia ou do TPN com capsaicina sobre estes efeitos. Entretanto, as
265 seguintes observações podem ser formuladas:

- 266 1. Em ratos intactos, a magnitude da hipotensão (fase 2) tende a ser 3-4 vezes maior para
267 os derivados I (Fig. 4C) e II (Fig. 4E) em relação aquela registrada para o NFE (Fig.
268 4A);

269 2. Em ratos bivagotomizados ou submetidos ao TPN com capsaicina, a fase 1 (para
270 hipotensão e bradicardia) induzida pelo NFE (Figs. 4A,B e 5A,B, respectivamente)
271 seus derivados I (Figs. 4C,D e 5C,D, respectivamente) ou II (Figs. 4E,F e 5E,F,
272 respectivamente) tende a ser reduzida ou até abolida. A mesma observação pode ser
273 feita para a fase 2 das respostas hipotensora e bradicardizante (Figs. 4 e 5).

274

275 **DISCUSSÃO**

276 Neste estudo, a administração i.v. do NFE e seus derivados I e II na dose de 15 mg/kg
277 induziu dois períodos de hipotensão e bradicardia. Inicialmente, uma bradicardia rápida
278 ocorreu coincidindo com uma hipotensão arterial (fase 1, tempo de latência de em torno de 1
279 segundo), seguida de uma diminuição tardia na pressão sanguínea, associada a uma segunda
280 bradicardia (fase 2, tempo de latência de em torno de 10 segundos). Todos estes efeitos são
281 reversíveis excluindo a possibilidade de estarem relacionados a um efeito tóxico desses
282 compostos. Ao nosso conhecimento, é a primeira vez que tais efeitos cardiovasculares
283 resultantes a administração i.v. do NFE e seus dois derivados foram relatados em ratos SHR
284 anestesiados.

285 Apesar de que os resultados desta investigação *in vivo* são ainda preliminares, é possível
286 especular que a fase 1 é caracterizada como um reflexo vago-vagal como foi observado
287 recentemente com o 1-nitro-2-feniletano, o principal constituinte do OEAC, em ratos
288 normotensos (de SIQUEIRA et al, 2010) ou espontaneamente hipertensos (SHR)
289 (INTERAMINENSE et al, 2010). Esta hipótese parece estar corroborada por resultados
290 preliminares (n = 2) que mostram que a fase 1 para hipotensão e bradicardia induzidas pelo
291 NFE e seus derivados (cuja o tempo de latência é similar a conhecida resposta reflexa vago-
292 vagal induzida pela injeção i.v. da capsaicina) foi quase abolida pela bivagotomia, assim
293 como pelo tratamento perineural (TPN) de ambos nervos vagos com a capsaicina, um

294 procedimento eficaz para dessensibilizar seletivamente as fibras sensoriais do tipo C de
295 origem cardíaca ou pulmonar projetando para o NTS (JANSCÓ e SUCH 1983; SCHELEGLE
296 et al, 2000). A possibilidade de que as fibras C sensoriais vagais pudessem ser ativadas
297 indiretamente, através de metabólitos do NFE e seus derivados, parece improvável, pois a
298 latência da resposta reflexa é muito curta para resultar de uma via metabólica e/ou efeito
299 secundário à liberação de outras substâncias. Estudos estão em andamento para elucidar a
300 origem e a transdução farmacológica do reflexo vago-vagal induzido pelo NFE e seus
301 derivados. Estudos prévios mostram que o reflexo vago-vagal induzido pelo 1-nitro-2-
302 feniletano tanto em ratos normotensos (de SIQUEIRA et al, 2010), quando em ratos SHR
303 (INTERAMINENSE et al, 2010) é decorrente da estimulação das fibras C aferentes
304 pulmonares e parece não envolver a ativação dos receptores vanilóides (TPRV1) ou dos
305 receptores serotoninérgicos (5-HT3), localizados nestas fibras sensoriais vagais.

306 É interessante notar que a resposta hipotensora e bradicardizante da fase 2 induzida pelo
307 NFE e seus derivados tende a ser também reduzida após a bivagotomia ou após o TPN dos
308 nervos vagos com capsaicina. Isso indica que parte das respostas cardiovasculares da fase 2 é
309 parcialmente mediada pela ativação das fibras-C aferentes vagais, como foi previamente
310 observado com o 1-nitro-2-feniletano em ratos normotensos (de SIQUEIRA et al, 2010) ou
311 hipertensos (SHR) (INTERAMINENSE et al, 2010). No entanto, é muito provável que a
312 resposta residual hipotensora da fase 2 seja decorrente de um efeito direto do NFE e seus
313 derivados na musculatura lisa vascular.

314 Esta hipótese parece ser corroborada por duas observações. Primeiro, o NFE e seus dois
315 derivados induziram uma hipotensão na fase 2 mais potente sobre a pressão arterial diastólica
316 (dados não mostrados), sugerindo que é provavelmente devido à diminuição da resistência
317 vascular periférica total (RVP). Segundo, a diminuição da RVP é corroborada pelo estudo *in*
318 *vitro*, mostrando que o NFE e seus derivados foram capazes de relaxar, de maneira

319 dependente da concentração, a contração sustentada induzida por FEN em preparações
320 isoladas de artérias de resistência, tais como SMA com o endotélio intacto. A FEN é um
321 agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, que provoca a contração vascular por ativar os canais para Ca^{2+}
322 operados por receptor (ROCCs) (acoplamento farmacomecânico) (SOMLYO e SOMLYO
323 1994; WEBB 2003).

324 É bem conhecido o papel do endotélio vascular na regulação do tônus vasomotor, pela
325 síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras (CARAMORI e ZAGO 2000). Portanto, a
326 influência do endotélio foi avaliada na resposta vasorrelaxante induzida pelo NFE e seus
327 derivados. Para isto utilizaram-se preparações em que o endotélio foi mecanicamente
328 removido e a resposta relaxante para estes compostos foi comparada na presença e na
329 ausência do endotélio. Foi mostrado que o NFE e seus derivados I e II induziram
330 vasorrelaxamento em anéis de SMA, independente da integridade do endotélio, visto que este
331 efeito permaneceu inalterado após remoção da camada endotelial vascular. De fato, não houve
332 diferença estatística entre as CI_{50} s para o relaxamento de preparações com o endotélio intacto
333 e com endotélio removido, tanto para o NFE quanto para seus derivados. Esses achados
334 corroboram com os resultados obtidos com o NFE em preparações isoladas de anéis de aorta
335 de ratos normotensos (BARBOSA 2012) e também com 1-nitro-2-feniletano em preparações
336 de SMA de ratos SHR (INTERAMINENSE et al, 2010). Por outro lado, os efeitos relaxantes
337 do NFE e seus derivados foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com o
338 ODQ, uma substância capaz de inibir de forma específica a enzima guanilato ciclase (GC)
339 através da oxidação de seu grupamento heme, o que conseqüentemente reduz os níveis de
340 GMPc intracelular (vide tabela 1). Como já se sabe, o GMPc por sua vez, ativa a PKG que
341 dentre suas funções, promove uma diminuição da concentração intracelular de Ca^{+2} ,
342 resultando no vasorrelaxamento (MURAD 1994). A partir deste achado, podemos sugerir que
343 os efeitos vasorrelaxantes do NFE e seus derivados envolvem a ativação da via

344 GC/GMPc/PKG, como foi previamente relatado para o 1-nitro-2-feniletano em preparações
345 de aorta isolada de ratos normotensos (BRITO et al, 2013). Entretanto, foi relatado que o
346 efeito relaxante do NFE não envolve a participação desta via, pois permaneceu
347 significativamente inalterado pelo pré-tratamento com ODQ (BARBOSA 2012). Esta
348 discrepância pode ser explicada pelo fato que neste presente estudo foram utilizadas
349 preparações de SMA de ratos SHR, enquanto que no estudo de BARBOSA foram utilizadas
350 preparações de aorta isolada oriundas de ratos normotensos. Estudos estão em andamento para
351 elucidar o mecanismo de ação dos efeitos vasorrelaxantes induzidos pelo NFE e seus
352 derivados, especialmente a medida dos níveis do GMPc intracelulares e o potencial
353 envolvimento dos canais de potássio nestes efeitos. O NFE e seus derivados podem ser
354 compostos de grande interesse em virtude de que ativadores e/ou estimuladores da GC são
355 importantes não apenas para o tratamento de hipertensão arterial e pulmonar, mas também
356 para insuficiência cardíaca, aterosclerose, trombose, disfunção erétil, fibrose e insuficiência
357 renal, dentre outras doenças.

358 **CONCLUSÕES**

359 Os resultados preliminares do presente estudo mostram que a injeção i.v. do NFE e seus
360 derivados I e II em SHRs anestesiados promoveu um reflexo depressor e bradicardia vago-
361 vagal (fase 1) e uma hipotensão tardia (fase 2) que parece ser resultante de um efeito
362 vasodilatador direto desses compostos no músculo liso vascular. O efeito vasorrelaxante dos
363 derivados I e II em preparações de SMA foi dependente da concentração, mas independente
364 da integridade endotelial. Em comparação ao NFE, a potência deste efeito para ambos
365 derivados é da mesma magnitude, mas a eficácia do derivado I (com grupamento metoxila)
366 parece ser maior. Em termo de mecanismo de ação, é possível que o efeito relaxante do NFE e
367 seus derivados envolva a ativação da via GC/GMPc/PKG, entretanto são necessários mais
368 estudos para se confirmar essa hipótese.

369 **AGRADECIMENTOS**

370 Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela Universidade
371 Federal de Pernambuco (UFPE).

372

373 **REFERÊNCIAS**

374 BARBOSA, A.L. 2012. Estudo dos efeitos do 1-nitro-2-feniletano em músculo liso
375 vascular de rato, Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Curso de Pós-Graduação em
376 Fisiologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

377 BRITO T.S.; LIMA F.J.B.; ARAGÃO K.S.; de SIQUEIRA R.J.B.; SOUSA P.J.C.; MAIA
378 J.G.S.; FILHO J.D.; LAHLOU S.; MAGALHÃES P.J.C. 2013. The vasorelaxant effects of 1-
379 nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway.
380 *Biochemical Pharmacology*.

381 de SIQUEIRA, R.J.B.; MACEDO, F.I.; INTERAMINENSE, L.F.L.; DUARTE, G.P.;
382 MAGALHÃES, P.J.C.; DA SILVA, J.K.; MAIA, G.S.; SOUSA, P.J.C.; LEAL-CARDOSO,
383 J.H.; LAHLOU, S. 2010. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of
384 *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats.
385 *European journal of pharmacology*, 638: 90-98.

386 CARAMORI P.R.A.; ZAGO A.J. 2000. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana.
387 *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 75 (2).

388 INTERAMINENSE, L.deF.; de SIQUEIRA, R.J.B.; XAVIER, F.E.; DUARTE, G.P.;
389 MAGALHÃES, P.J.C.; DA SILVA, J.K.; MAIA, G.S.; SOUSA, P.J.C.; LEAL-CARDOSO,
390 J.H.; LAHLOU, S. 2010. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main
391 constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats.
392 *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 25 (6): 661-669.

393 JANCSÓ G.; SUCH G. 1983. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on
394 cardiovascular and respiratory functions in the cat. *Journal of Physiology*, 341: 359-370.

395 MURAD, F. 1994. Cyclic GMP: Synthesis, Metabolism, and Function, *Pharmacology*,
396 United Kingdom. v.26, ed. Academic press inc, 1994.

397 PINTO, A.C.O. 1995. Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos
398 Naturais Brasileira. *Quimica Nova*, 18 (6): 608-615.

399 SCHELEGLE, E.S.; CHEN, A.T.; LOH, C.Y. 2000, Effects of vagal perineural capsaicin
400 treatment on vagal efferent and airway neurogenic responses in anesthetized rats. *Journal of*
401 *basic and clinical physiology and pharmacology*, 11: 1-16.

402

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

405

406 VALE, J.K.L.; LIMA, A.B.; PINHEIRO, B.G.; CARDOSO, A.S.; SILVA, J.K.R.; MAIA,
407 J.G.S.; de SOUZA, G.E.P.; da SILVA, A.B.F.; SOUSA, P.J.C.; BORGES, R.S. 2013.

408 Evaluation and Theoretical Study on the Anti-inflammatory Mechanism of 1-Nitro-2-
409 phenylethane. *Planta Medica*, 79: 628-633.

410

411 WEBB, R.C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology*
412 *Education*, 27: 201- 206.

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436 **Figura 1.** Efeito vasorrelaxante do 1-nitro-2-feniletano (NFE) e seus derivados I (1-nitro-2-
437 [(4'-metoxi)-fenil]-eteno) e II (1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno) em artérias
438 mesentéricas superiores (SMA) isoladas de rato SHR pré-contraídas com fenilefrina (FEN, 1
439 μM). (A) Traçado original de um experimento mostrando a administração (indicada pelo
440 símbolo ●) de forma cumulativa de concentrações crescentes de NFE e seus derivados em
441 preparações pré-contraídas com FEN (1 μM). O efeito da administração do K^+ 75 mM antes
442 depois ou após cada experimento individual é usado como teste de viabilidade da preparação.
443 (B, C e D, respectivamente) Gráficos mostrando valores médios do efeito relaxante do NFE
444 e seus derivados I e II em anéis de SMA com endotélio intacto. As respostas são expressas em
445 % da contração induzida apenas por FEN (1 μM) antes da adição de NFE ou seus derivados.
446 As barras verticais indicam E.P.M. (n = 4 por grupo). *P < 0,05, primeiro efeito significativo
447 pelo teste ANOVA seguido de teste de Bonferroni, em relação ao valor para a curva controle
448 (etanol como veículo).

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

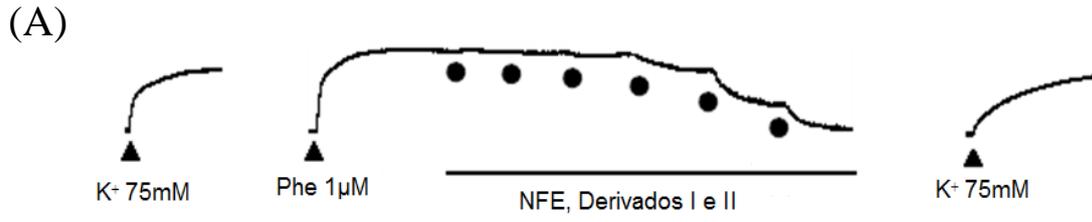
462

463

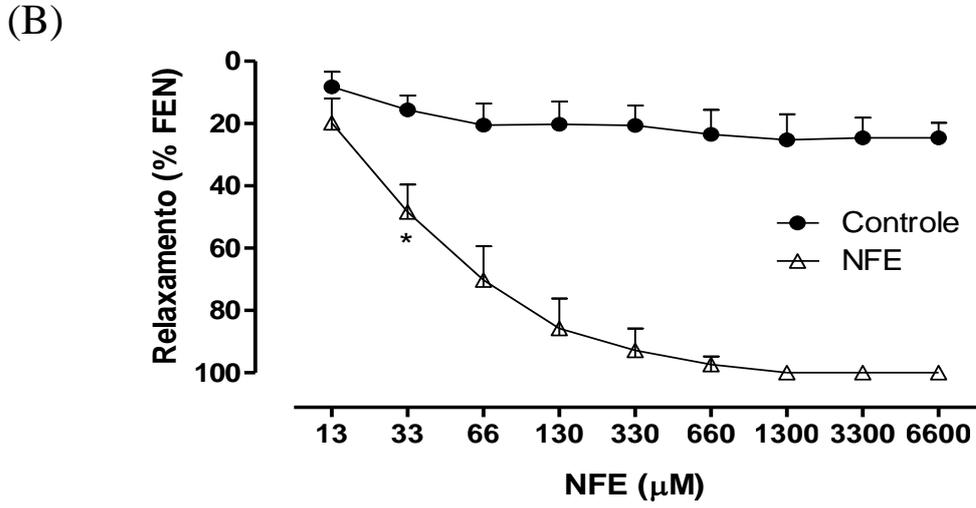
464

465

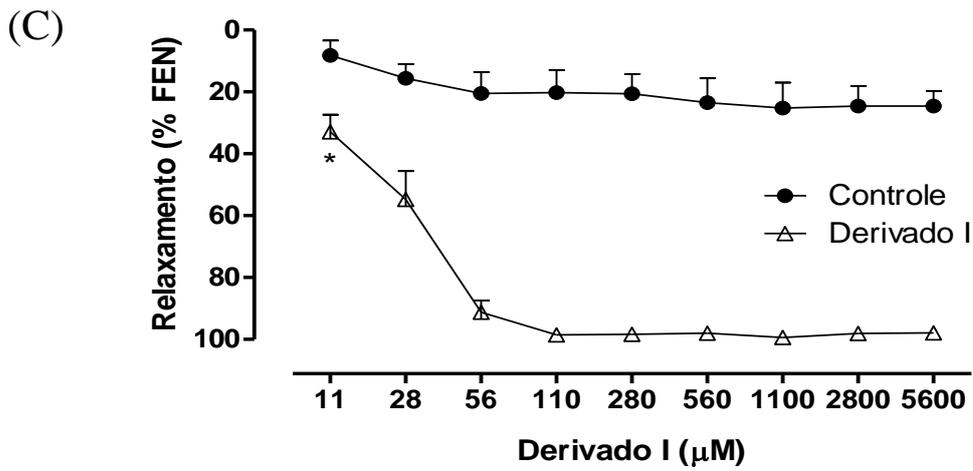
466



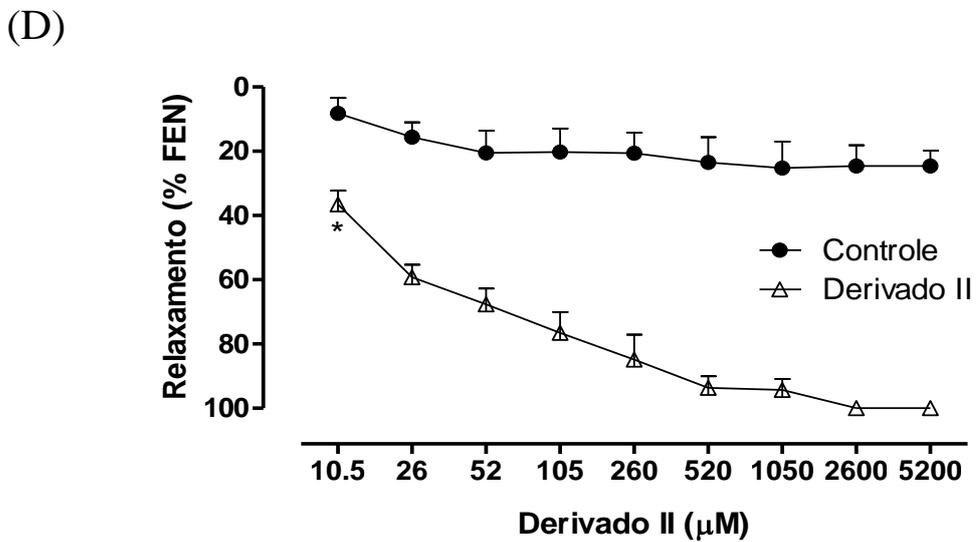
467



468



469



470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482 **Figura 2.** Efeito vasorrelaxante dos derivados I (1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno) e II (1-
483 nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno) em artérias mesentéricas superiores (SMA) isoladas
484 de rato SHR sem (E^-) ou com (E^+) endotélio funcional pré-contraídas com fenilefrina (FEN, 1
485 μ M). As respostas são expressas em % da contração induzida apenas por FEN (1 μ M) antes
486 da adição do derivado I ou II. As barras verticais indicam E.P.M. (n = 4 por grupo). *P < 0,05,
487 primeiro efeito significativo pelo teste ANOVA seguido de teste de Bonferroni, em relação ao
488 valor para a curva controle (etanol como veículo).

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

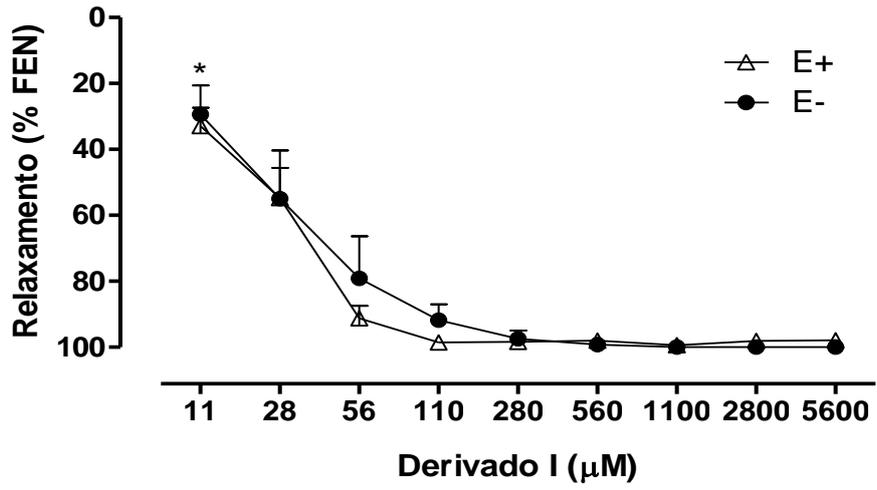
509

510

511

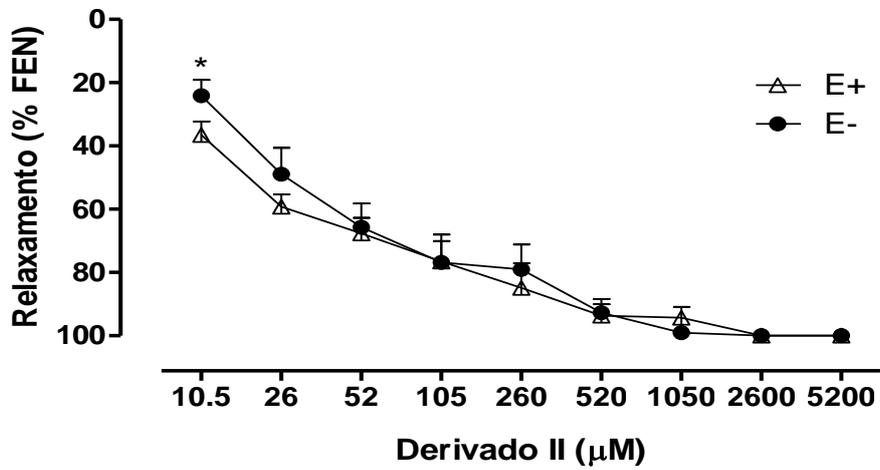
512
513
514
515
516
517
518
519
520

(A)



521

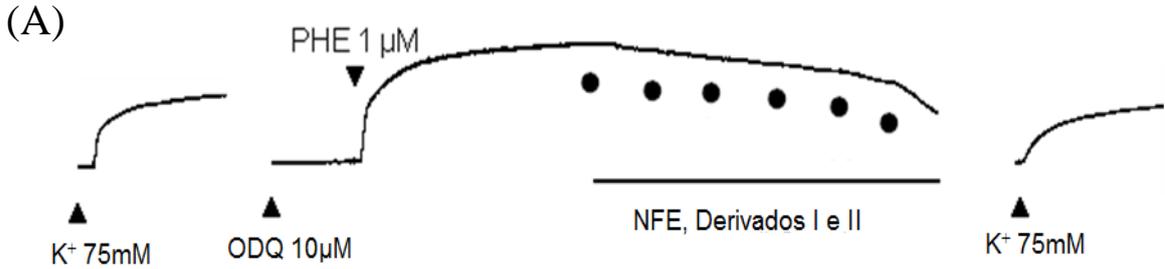
(B)



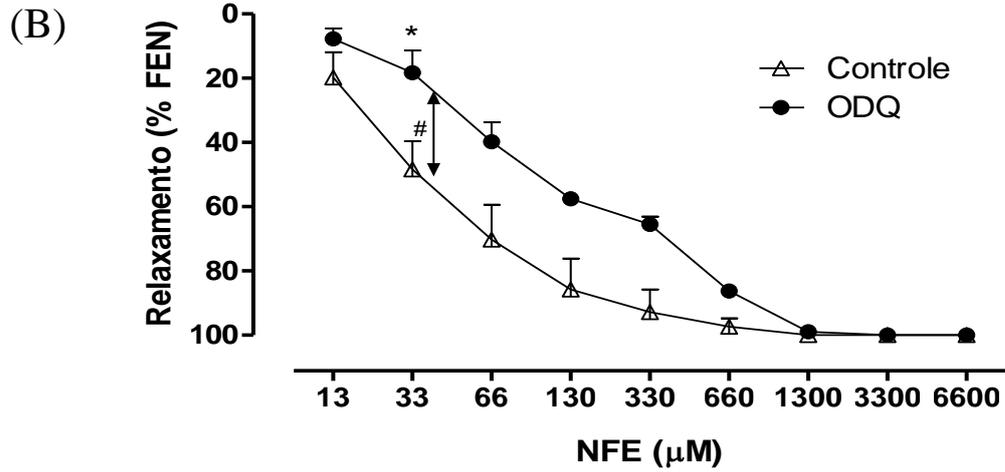
522
523
524
525
526
527
528
529

530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561

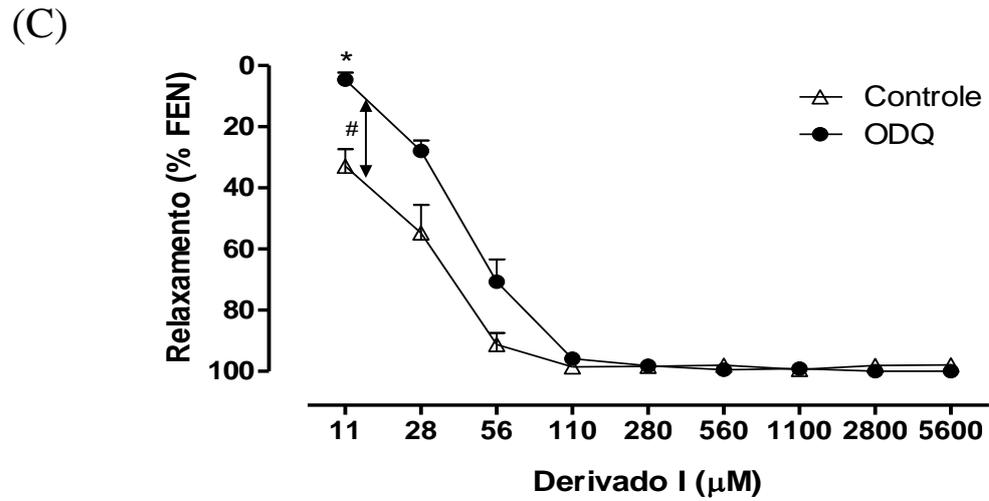
Figura 3. Efeito vasorrelaxante dos derivados I (1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno) e II (1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno) em artérias mesentéricas superiores (MAS) isoladas de rato SHR com endotélio funcional pré-contraídas com fenilefrina (FEN, 1 μ M) pré-tratadas ou não (controle) com o ODQ (10 μ M). (A) Traçado original de um experimento mostrando a administração (indicada pelo símbolo ●) de forma cumulativa de concentrações crescentes de NFE e seus derivados em preparações pré-contraídas com FEN (1 μ M) e pré-tratadas com ODQ. O efeito da administração do K^+ 75 mM antes depois ou após cada experimento individual é usado como teste de viabilidade da preparação. As respostas são expressas em % da contração induzida apenas por FEN (1 μ M) antes da adição do derivado I ou II. As barras verticais indicam E.P.M. (n = 4 por grupo). *P < 0,05, primeiro efeito significativo pelo teste ANOVA seguido de teste de Bonferroni. #P < 0,05 pelo teste ANOVA a duas vias em relação a resposta na ausência de ODQ (controle).



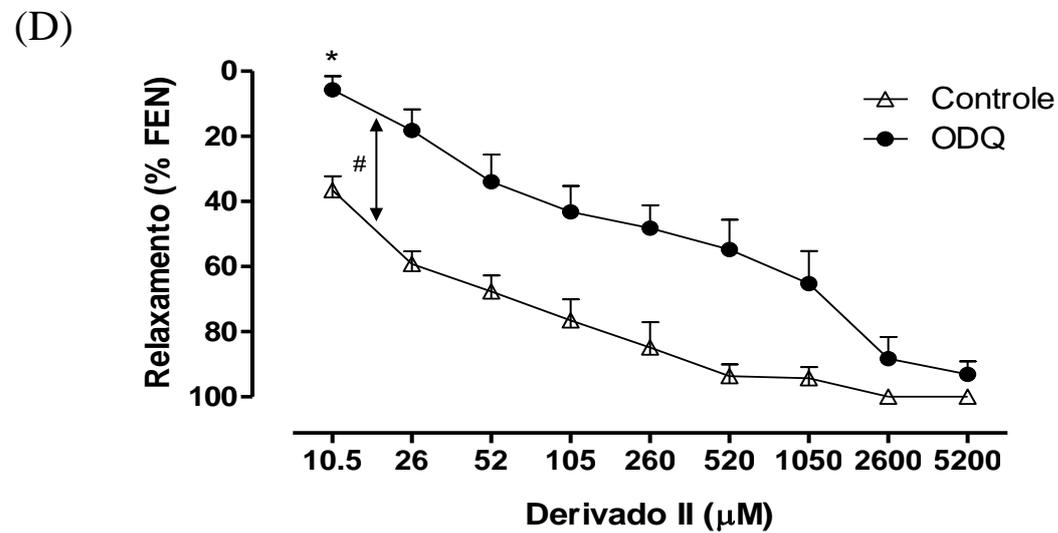
562



563



564



565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578 **Tabela 1.** Valores de CI_{50} (μM) do 1-nitro-2-feniletano (NFE) e seus derivados I e II em
579 preparações de artéria mesentérica superior de rato SHR sob acoplamento farmacomecânico
580 (fenilefrina, 10 μM). (ODQ: 1H-oxadiazolol[4,3-a] quinoxalina-1-ona. Os valores da CI_{50} são
581 expressos como média geométrica [intervalo de confiança de 95%] e “n”, o número de
582 experimentos)

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598
599
600
601
602
603
604
605
606
607

COMPOSTO	n	Controle	n	ODQ
NFE	4	37,95 [95,83-17,74]	4	103,2 [114,9-92,83]*
Derivado I	4	22,41 [27,52-15,23] [#]	4	43,34 [45,40-32,78]**
Derivado II	4	17,13 [31,29-11,82] [#]	4	487,5 [958,9-62,99]***

608 * p < 0,05, Mann-Whitney U-test; em relação ao correspondente valor na ausência do ODQ (controle);
609 ** p < 0,05, Mann-Whitney U-test; em relação ao correspondente valor na ausência do ODQ (controle);
610 *** p < 0,001, Mann-Whitney U-test; em relação ao correspondente valor na ausência do ODQ (controle);
611 [#]p < 0,05, Mann-Whitney U-test; em relação ao valor do NFE na ausência do ODQ (controle).

612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636 **Tabela 2.** Efeitos da bivaotomia e do tratamento perineural com capsaicina sobre os valores
637 basais da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). (TPN: tratamento
638 perineural)

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667

Tratamento	PAM (mmHg)		FC (bpm)	
	Basal	Após T	Basal	Após T
Bivagotomia	123,20 ± 2,68	110,10 ± 0,85	305,30 ± 23,50	298,80 ± 3,24
TPN com capsaicina	123,20 ± 2,68	117,60 ± 1,37	305,30 ± 23,50	326,10 ± 7,87

668 Os dados são expressos como média ± E.P.M. (n = 2 por grupo)

669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691 **Figura 4.** Alterações máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)
692 induzidas pela administração intravenosa de 1-nitro-2-feniletano (NFE) (A e B), 1-nitro-2-
693 [(4'-metoxi)-fenil]-etano (Derivado I) (C e D) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-etano
694 (Derivado II) (E e F) em ratos anestesiados antes e após bivagotomia (Biv) a nível cervical.
695 Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

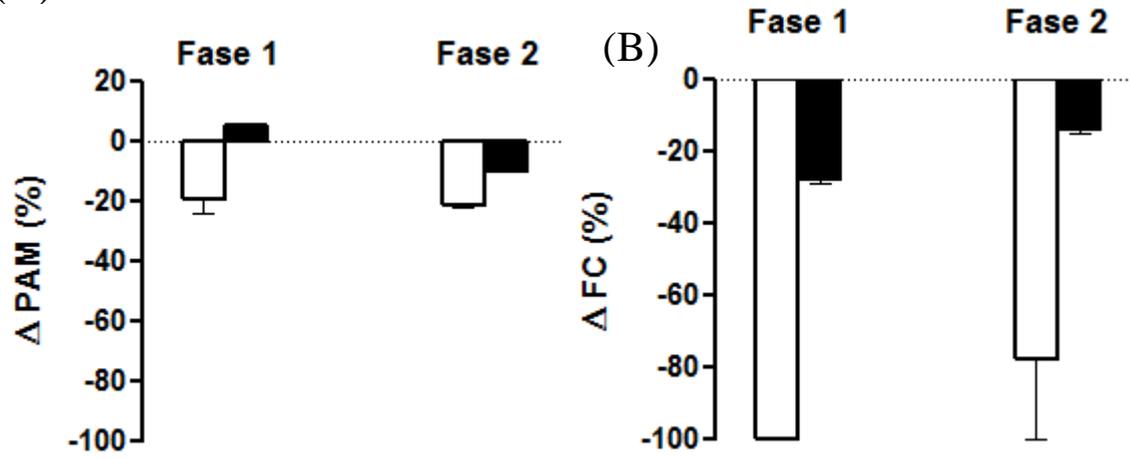
706

707

708

709

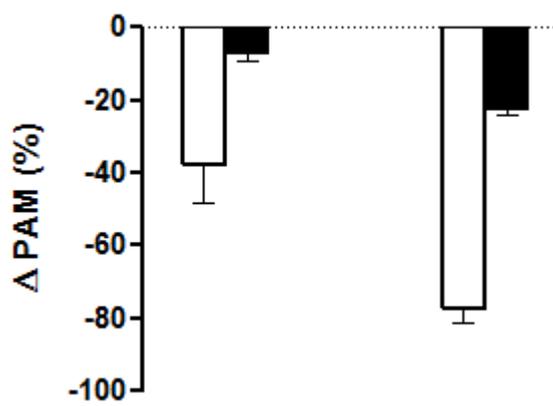
(A)



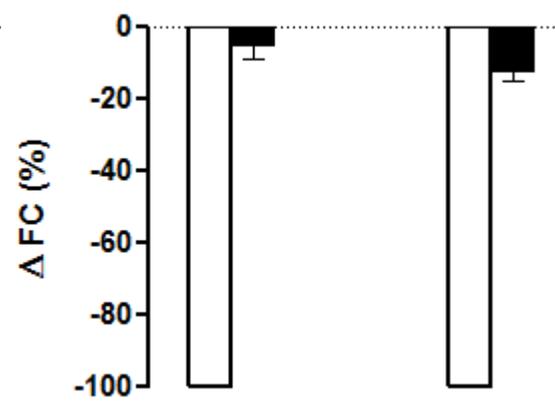
710

711

(C)

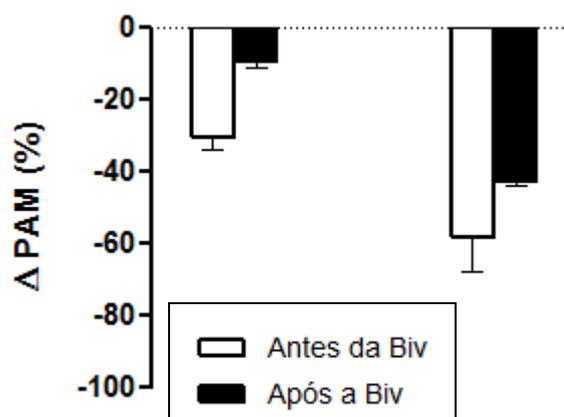


(D)

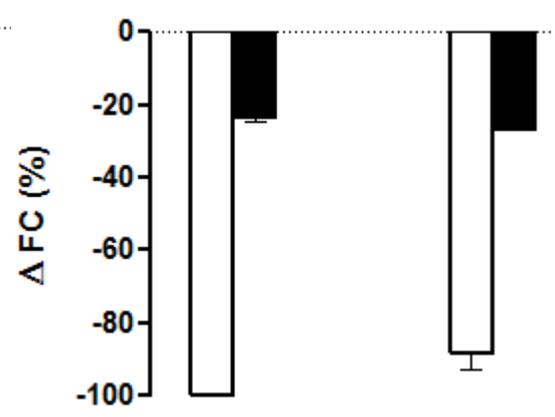


712

(E)



(F)



713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729 **Figura 5.** Alterações máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)
730 induzidas pela administração intravenosa de 1-nitro-2-feniletano (NFE) (A e B), 1-nitro-2-
731 [(4'-metoxi)-fenil]-eteno (Derivado I) (C e D) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno
732 (Derivado II) (E e F) em ratos anestesiados antes e 20 min após tratamento perineural (TPN)
733 de ambos os vagos cervicais com capsaicina (250 µg/ml). Os dados são expressos como
734 média ± E.P.M.

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

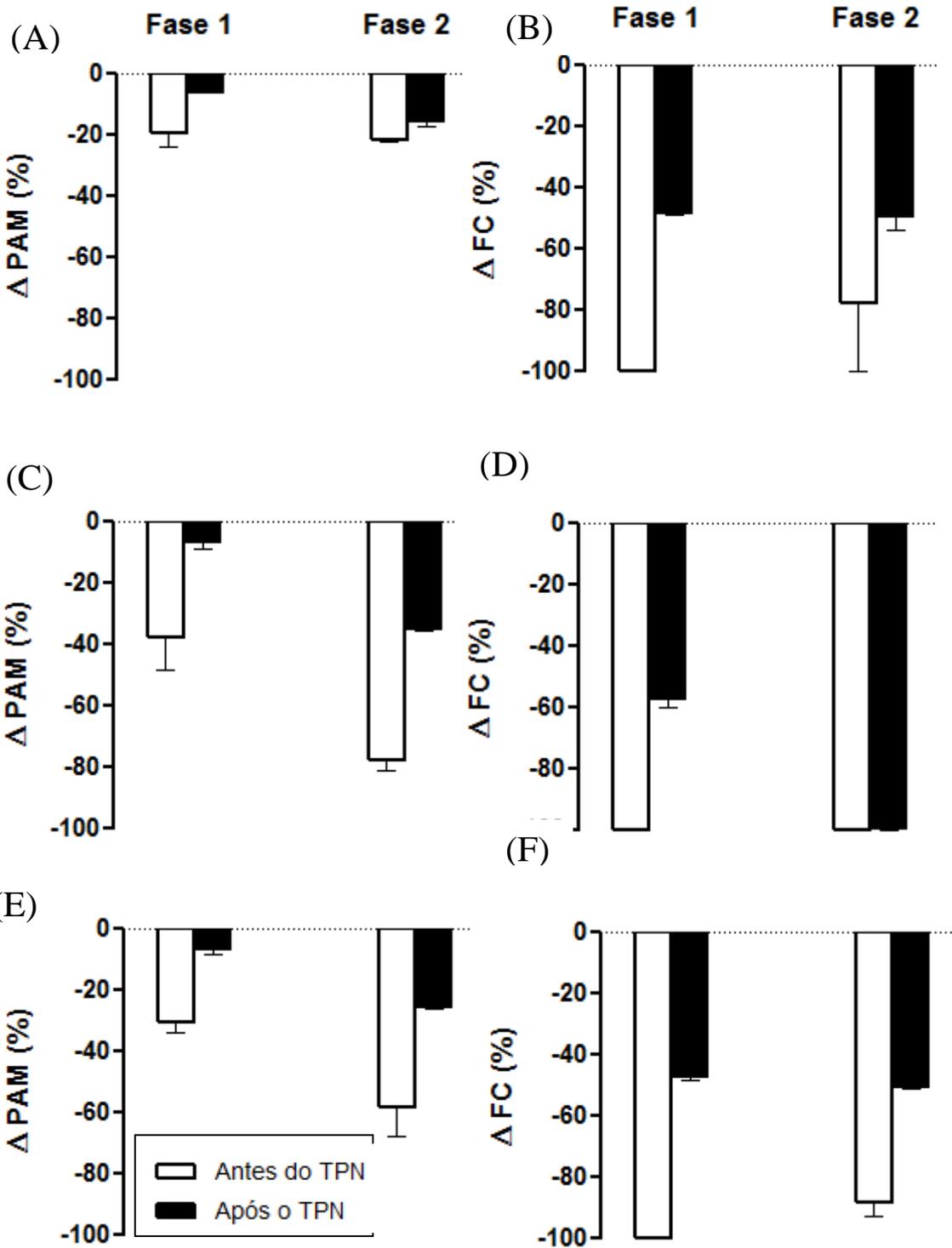
745

746

747

748

749



750

751

752

753

754

755

8. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares do presente estudo mostram que a injeção i.v. do NFE e seus derivados I e II em SHRs anestesiados promoveu um reflexo depressor e bradicardia vagovagal (fase 1) e uma hipotensão tardia (fase 2) que parece ser resultante de um efeito vasodilatador direto desses compostos no músculo liso vascular. O efeito vasorrelaxante dos derivados I e II em preparações de SMA foi dependente da concentração, mas independente da integridade endotelial. Em comparação ao NFE, a potência deste efeito para ambos derivados é da mesma magnitude, mas a eficácia do derivado I (com grupamento metoxila) parece ser maior. Em termo de mecanismo de ação, é possível que o efeito relaxante do NFE e seus derivados envolva a ativação da via GC/GMPc/PKG, entretanto são necessários mais estudos para se confirmar essa hipótese.

ANEXO

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

ISSN 0044-5967 versão
impressa

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. Submissões que não estejam de acordo com as normas são devolvidas aos autores.

1. O tamanho máximo de um arquivo individual deve ser 2 MB.
2. O manuscrito deve ser acompanhado de uma carta de submissão indicando que: a) os dados contidos no trabalho são originais e precisos; b) que todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo; c) a contribuição apresentada à Revista não foi previamente publicada e nem está em processo de publicação, no todo ou em arte em outro veículo de divulgação. A carta de submissão deve ser carregada no sistema da Acta Amazonica como "documento suplementar".
3. Os manuscritos são aceitos em português, espanhol e inglês, mas encorajam-se contribuições em inglês. A veracidade das informações contidas numa submissão é de responsabilidade exclusiva dos autores.
4. A extensão máxima para artigos e revisões é de 30 páginas (ou 7500 palavras, excluindo a folha de rosto), dez páginas (2500 palavras) para Notas Científicas e cinco páginas para outros tipos de contribuições.
5. Os manuscritos formatados conforme as Instruções aos Autores são enviados aos editores associados para pré-avaliação. Neste primeiro julgamento são levados em consideração a relevância científica, a inteligibilidade do manuscrito e o escopo no contexto amazônico. Nesta fase, contribuições fora do escopo da Revista ou de pouca relevância científica são rejeitadas. Manuscritos aprovados na pré-avaliação são enviados para revisores (pelo menos dois), especialistas de instituições diferentes daquelas dos autores, para uma análise mais detalhada.

6. Uma contribuição pode ser considerada para publicação, se tiver recebido pelo menos dois pareceres favoráveis no processo de avaliação. A aprovação dos manuscritos está fundamentada no conteúdo científico e na sua apresentação conforme as Normas da Revista.

7. Os manuscritos que necessitam correções são encaminhados aos autores para revisão. A versão corrigida deve ser encaminhada ao Editor, via sistema da Revista, no prazo de DUAS semanas. Uma carta de encaminhamento deve ser também carregada no sistema da Revista, detalhando as correções efetuadas. Nessa carta, recomendações não incorporadas ao manuscrito devem ser explicadas. Todo o processo de avaliação pode ser acompanhado no endereço, <http://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo>.

8. Seguir estas instruções para preparar e carregar o manuscrito:

a. Folha de rosto (Title page): Esta página deve conter o título, nomes (com último sobrenome em maiúscula), endereços institucionais completos e endereços eletrônicos dos autores. Os nomes das instituições não devem ser abreviados. Usar um asterisco (*) para indicar o autor correspondente.

Carregar este arquivo selecionando a opção: "Title page"

b. Corpo do manuscrito (main document). O corpo do manuscrito deve ser organizado da seguinte forma: Título, Resumo, Palavras-Chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Bibliografia Citada, Legendas de figuras e Tabelas. Para submissões em português ou espanhol incluir: título, resumo e palavras-chave em inglês.

Carregar este arquivo como "Main document".

c. Figuras. São limitadas a sete em artigos. Cada figura deve ser carregada em arquivo separado e estar em formato gráfico (JPG ou TIFF). Deve ser em alta qualidade e com resolução de 300 dpi. Para ilustrações em bitmap, utilizar 600 dpi.

Carregar cada um destes arquivos como "Figure".

d. Tabelas. São permitidas até cinco tabelas por artigo. Utilizar espaço simples e a função "tabela" para digitar a tabela. As tabelas podem ser carregadas como arquivos separados OU

inseridas no corpo do manuscrito (main document) após as legendas das figuras.

9. As Notas Científicas são redigidas separando os tópicos (i.e. Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão) em parágrafos, mas sem incluir os títulos das seções. Notas Científicas, como no caso do artigo, também devem conter: Título, Nomes e endereços institucionais e eletrônicos dos autores, Resumo, Palavras-Chave e os tópicos do artigo completo incluindo título em inglês, abstract e keywords. São permitidas até três figuras e duas tabelas. Carregar as diferentes partes do manuscrito como descrito no Item 8.

10. Nomes dos autores e endereço institucional completo, incluindo endereço eletrônico DEVEM ser cadastrados no sistema da Revista no ato da submissão.

11. **IMPORTANTE:** Os manuscritos não formatados conforme as Normas da Revista NÃO são aceitos para publicação.

FORMATO E ESTILO

12. Os manuscritos devem ser preparados usando editor de texto (e.g. doc ou docx), utilizando fonte "Times New Roman", tamanho 12 pt, espaçamento duplo, com margens de 3 cm. As páginas e as linhas devem ser numeradas de forma contínua. Para tabelas ver Item 8d.

13. Título. Justificado à esquerda, com a primeira letra maiúscula. O título deve ser conciso evitando-se o uso de nomes científicos.

14. Resumo. Deve conter até 250 palavras (150 palavras no caso de Notas Científicas), deve conter de forma sucinta, o objetivo, a metodologia, os resultados e as conclusões enfatizando aspectos importantes do estudo. O resumo deve ser autossuficiente para a sua compreensão. Os nomes científicos das espécies e demais termos em latim devem ser escritos em itálico. Siglas devem ser evitadas nesta seção; porém, se necessárias, o significado deve ser incluído. Não utilizar referências bibliográficas no resumo.

15. Palavras-chave. Devem ser em número de três a cinco. Cada palavra-chave pode conter dois ou mais termos. Porém, não devem ser repetidas palavras utilizadas no título.

16. Introdução. Enfatizar o propósito do trabalho e fornecer, de

forma sucinta, o estado do conhecimento sobre o tema em estudo. Especificar claramente os objetivos ou hipóteses a serem testados. Esta seção não deve exceder de 35 linhas. Não incluir resultados ou conclusões e não utilizar subtítulos na Introdução.

17. Material e Métodos. Esta seção deve ser organizada cronologicamente e explicar os procedimentos realizados, de tal modo que outros pesquisadores possam repetir o estudo. O procedimento estatístico utilizado deve ser descrito nesta seção. O tipo de análise estatística aplicada aos dados deve ser descrita. Procedimentos-padrão devem ser apenas referenciados. As unidades de medidas e as suas abreviações devem seguir o Sistema Internacional e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas. Equipamento específico utilizado no estudo deve ser descrito (modelo, fabricante, cidade e país de fabricação, entre parênteses). Por exemplo: "A fotossíntese foi determinada usando um sistema portátil de trocas gasosas (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)". Material testemunho (amostra para referência futura) deve ser depositado em uma ou mais coleções científicas e informado no manuscrito. NÃO utilizar sub-subtítulos nesta seção. Utilizar negrito, porém não itálico ou letras maiúsculas para os subtítulos.

18. Aspectos éticos e legais. Para estudos que exigem autorizações especiais (e.g. Comitê de Ética/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, IBAMA, CNTBio, INCRA/FUNAI, EIA/RIMA, outros) informar o número do protocolo e a data de aprovação. É responsabilidade dos autores o cumprimento da legislação específica relacionada a estes aspectos.

19. Resultados. Os resultados devem apresentar os dados obtidos com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto toda a informação contida em tabelas e figuras. Algarismos devem estar separados de unidades. Por exemplo, 60 °C e NÃO 60° C, exceto para percentagem (e.g., 5% e NÃO 5 %). Utilizar unidades e símbolos do Sistema Internacional e simbologia exponencial. Por exemplo, cmol kg^{-1} em vez de meq/100g. Não apresentar a mesma informação (dados) em tabelas e figuras simultaneamente. Não utilizar sub-subtítulos nesta seção.

20. Discussão. A discussão deve ter como alvo os resultados obtidos. Evitar mera especulação. Entretanto, hipóteses bem fundamentadas podem ser incorporadas. Apenas referências relevantes devem ser incluídas. As conclusões devem conter uma

interpretação sucinta dos resultados e uma mensagem final que destaque as implicações científicas do trabalho. As conclusões podem ser apresentadas como um tópico separado ou incluídas no final da seção Discussão.

21. Agradecimentos devem ser breves e concisos. **Incluir agência(s)** de fomento. NÃO abreviar nomes de instituições.

22. Bibliografia Citada. Pelo menos 70% das referências devem ser artigos de periódicos científicos. As referências devem ser preferencialmente dos últimos 10 anos, evitando-se exceder 40 citações. Esta seção deve ser organizada em ordem alfabética e deve incluir apenas citações mencionadas no manuscrito. Para referências com mais de dez autores, relacionar os seis primeiros seguido de *et al.* Nesta seção, o título do periódico NÃO deve ser abreviado. Observar os exemplos abaixo:

a) Artigos de periódicos:

Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

b) Dissertações e teses:

Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.

c) Livros:

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2da ed. McGraw-Hill, New York, 1980, 633p.

d) Capítulos de livros:

Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Ed.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto

Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p.3-10.

e) Citação de fonte eletrônica:

CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2
 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Acesso em
 19/05/1999.

f) Citações com mais de dez autores:

Tseng, Y.-H.; Kokkotou, E.; Schulz, T.J.; Huang, T.L.; Winnay, J.N.; Taniguchi, C.M.; *et al.* 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454:1000-1004.

23. Citações de referencias no texto. As referências devem seguir ordem cronológica. Para duas ou mais referências do mesmo ano citar conforme a ordem alfabética. Exemplos:

a) Um autor:

Pereira (1995) ou (Pereira 1995).

b) Dois autores:

Oliveira e Souza (2003) ou (Oliveira e Souza 2003).

c) Três ou mais autores:

Rezende *et al.* (2002) ou (Rezende *et al.* 2002).

d) Citações de anos diferentes (ordem cronológica):

Silva (1991), Castro (1998) e Alves (2010) ou (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

e) Citações no mesmo ano (ordem alfabética):

Ferreira *et al.* (2001) e Fonseca *et al.* (2001); ou (Ferreira *et al.* 2001; Fonseca *et al.* 2001).

FIGURAS

24. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser de alta resolução, em preto e branco com alto contraste, numerados sequencialmente em algarismos arábicos. NÃO usar tonalidades de

cinza em gráficos de dispersão (linhas ou símbolos) ou gráficos de barra. Em gráfico de dispersão usar símbolos abertos ou sólidos (círculos, quadrados, triângulos, ou losangos) e linhas em preto (contínuas, pontilhadas ou tracejadas). Para gráfico de barra, usar barras pretas, bordas pretas, barras listradas ou pontilhadas. Na borda da área de plotagem utilizar uma linha contínua e fina, porém NÃO usar uma linha de borda na área do gráfico. Em figuras compostas cada uma das imagens individuais deve ser identificada com uma letra maiúscula posicionada no canto superior direito, dentro da área de plotagem.

25. Evitar legendas desnecessárias na área de plotagem. Nos títulos dos eixos ou na área de plotagem NÃO usar letras muito pequenas (< tamanho 10 pt). Nos eixos usar marcas de escala internas. NÃO usar linhas de grade horizontais ou verticais, exceto em mapas ou ilustrações similares. O significado das siglas utilizadas deve ser descrito na legenda da figura. Cada eixo do gráfico deve ter o seu título e a unidade. Evitar muitas subdivisões nos eixos (cinco a seis seriam suficientes). Em mapas incluir escala e pelo menos um ponto cardeal.

26. As figuras devem ser elaboradas de forma compatível com as dimensões da Revista, ou seja, largura de uma coluna (8 cm) ou de uma página 17 cm e permitir espaço para a legenda. As ilustrações podem ser redimensionadas durante o processo de produção para adequação ao espaço da Revista. Na figura, quando for o caso, a escala deve ser indicada por uma barra (horizontal) e, se necessário, referenciadas na legenda da figura. Por exemplo, barra = 1 mm.

27. Citação de figuras no texto. As figuras devem ser citadas com letra inicial maiúscula, na forma direta ou indireta (entre parêntesis). Por exemplo: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, a figura deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exemplo: "Figura 1. Análise...". Definir na legenda o significado de símbolos e siglas usados. Figuras devem ser autoexplicativas.

28. Figuras de outras autorias. Para figuras de outras autorias ou publicadas anteriormente, os autores devem informar explicitamente no manuscrito que a permissão para reprodução foi concedida. Carregar no sistema da Revista (não para revisão), como documento suplementar, o comprovante outorgado pelo detentor dos direitos autorais.

29. Adicionalmente às figuras inseridas no sistema em formato

TIFF ou JPG, os gráficos preparados usando Excel ou SigmaPlot podem ser carregados como arquivos suplementares (selecionando a opção Not for review).

30. Ilustrações coloridas. Fotografias e outras ilustrações devem ser preferencialmente em preto e branco. Ilustrações coloridas são aceitas, mas o custo de impressão é por conta dos autores. Sem custo para os autores, podem ser usadas ilustrações em preto e branco na versão impressa e coloridas na versão eletrônica. Nesse caso, isso deve ser informado na legenda da figura. Por exemplo, adicionando a sentença: "Esta figura é colorida na versão eletrônica". Esta última informação é para os leitores da versão impressa.

31. Os autores podem ser convidados a enviar uma fotografia colorida, para ilustrar a capa da Revista. Nesse caso, não há custos para os autores.

TABELAS

32. As tabelas devem ser organizadas e numeradas sequencialmente com algarismos arábicos. A numeração e o título (legenda) devem estar em posição superior à tabela. A tabela pode ter notas de rodapé. O significado das siglas e dos símbolos utilizados na tabela (cabecinhos, etc.) devem ser descritos no título. Usar linhas horizontais acima e abaixo da tabela e para separar o cabeçalho do corpo da tabela. Não usar linhas verticais.

33. As tabelas devem ser elaboradas em editor de texto (e.g. doc ou docx) e não devem ser inseridas no texto como imagem (e.g. no formato JPG).

34. A citação das tabelas no texto pode ser na forma direta ou indireta (entre parêntesis), por extenso, com a letra inicial maiúscula. Por exemplo: Tabela 1 ou (Tabela 1). Na legenda, a tabela deve ser numerada seguida de ponto antes do título: Por exemplo: "Tabela 1. Análise...". Tabelas devem ser autoexplicativas.

INFORMAÇÕES

ADICIONAIS

1. A Acta Amazonica pode efetuar alterações de formatação e correções gramaticais no manuscrito para ajustá-lo ao padrão editorial e linguístico. As provas finais são enviadas aos autores para a verificação. Nesta fase, apenas os erros tipográficos e

ortográficos podem ser corrigidos. Nessa etapa, NENHUMA alteração de conteúdo pode ser feita no manuscrito. Se isso for necessário o manuscrito deve retornar ao processo de avaliação.

2. A Acta Amazonica não cobra taxas para publicação. Informações adicionais podem ser obtidas por e-mail acta@inpa.gov.br. Para informações sobre um determinado manuscrito, deve-se fornecer o número de submissão.

3. As assinaturas da Acta Amazonica podem ser pagas com cheque ou vale postal. Para o exterior, a assinatura institucional custa US\$ 100,00 e a assinatura individual US\$ 75,00. Para contato: acta@inpa.gov.br. Tel.: (55 92) 3643-3643 ou fax: (55 92) 3643-3029.