



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Zingiber zerumbet (L.) Smith E SEU COMPOSTO MAJORITÁRIO,
ZERUMBONA, SOBRE A FUNÇÃO RENAL E VASCULAR EM
RATOS WISTAR**

ANNE CAROLLINE DOS SANTOS GRAÇA

MANAUS – AMAZONAS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Zingiber zerumbet (L.) Smith E SEU COMPOSTO MAJORITÁRIO,
ZERUMBONA, SOBRE A FUNÇÃO RENAL E VASCULAR EM
RATOS WISTAR**

ANNE CAROLLINE DOS SANTOS GRAÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ WILSON DO NASCIMENTO CORRÊA

MANAUS – AMAZONAS

2018

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, autor e consumidor da minha fé, meu companheiro fiel que sempre me fez prosseguir, **aos meus pais** pelo amor, apoio e compreensão imensuráveis, **ao meu amado esposo** que se despojou de si mesmo para que hoje pudéssemos vencer juntos esta etapa.*

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço a Deus por seu amor, auxílio e sustento, por ter sido meu socorro bem presente nos momentos de aflição, pelas bênçãos incontáveis, por sempre ir a minha frente abrindo as portas e realizando o impossível e, sobretudo por achar descanso e segurança em sua presença. Definitivamente eu não conseguiria sem o Senhor!

Em segundo lugar, aos meus amados pais, Núbia Silva e Wilson Oliveira. Poderia redigir todo esse trabalho com palavras de gratidão por tudo o que fazem por mim, meus maiores incentivadores, as pessoas que acreditam em mim mais do que eu mesma! Vocês sempre salientam que eu sou a motivação da vida de vocês, mas aqui quero deixar registrado que hoje, vocês são a minha maior motivação, por vocês não desistirei, alcançarei o impossível para vê-los realizados, obrigada por abnegar suas vontades para viverem os meus sonhos, vocês são as melhores pessoas que eu conheço nessa terra, sinto-me agraciada por tê-los como pais! Amo-lhes imensuravelmente!

Ao meu amável esposo, Eliézio Graça que em nenhum momento me deixou sozinha, que abdicou de seus finais de semana e horas de descanso para acompanhar-me nesses dias de labuta, que compreendeu que a difícil sementeira foi necessária para que os bons frutos viessem, a você meu amor, minha gratidão por ser esse companheiro incrível, você continua sendo minha melhor escolha! Obrigada por deixar meu caminho mais prazeroso, por sempre fazer meu sorriso brotar do meio das lágrimas e por fazer do nosso lar o melhor lugar dessa terra! Eu te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa por todo conhecimento repartido comigo a cada conversa, pelo auxílio na construção deste trabalho e por não medir esforços para que fizéssemos dele o melhor que podíamos, pelos incentivos e por me mostrar o incrível mundo da farmacologia, ainda fico abismada com o conhecimento absurdo que o senhor possui! Obrigada por me ensinar, com seu exemplo, a ser uma profissional melhor e mais competente, agradeço a Deus pela experiência em ter sido sua aluna!

Ao Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa e sua amável técnica Erilene do Carmo (Lene) por sua disponibilidade e paciência em ensinar-me as técnicas estereológicas, fundamentais para o bom desenvolvimento deste trabalho, seu conhecimento é gigantesco professor! Obrigada por reparti-lo comigo!

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima e as alunas Ângela Barros, Bárbara da Silva e Carolina Valentim pela atenção e disponibilidade em nos receber em seu laboratório, permitindo-nos realizar parte dos experimentos *in vitro*, aqui apresentados.

A Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, docente da Universidade de São Paulo, e suas técnicas Juliana Vercesi e Marcella Grando, que me receberam em seu laboratório, propiciando-me a execução e aprimoramento das técnicas de reatividade vascular, minha sincera gratidão pelo tempo de aprendizado!

Ao Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro que nos assistiu na obtenção, produção e caracterização dos extratos usados neste trabalho, sou grata por seu apoio e disponibilidade, bem como pelo esforço e hospitalidade de sua técnica Mirian Silva.

A Profa. Dra. Aya Sadahiro por seus conselhos, seu apoio, suas palavras tão singelas que sempre me confortaram. Obrigada, pois foi através da senhora que meus olhos se abriram para Imunologia, foste o divisor de águas para que hoje eu estivesse neste programa de pós-graduação, aprendi muito com a senhora, não apenas por ser minha professora há cinco anos, mas por cada contato que fizeram de mim uma profissional e uma pessoa melhor!

E aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) que contribuíram diretamente ou indiretamente para a plena realização deste trabalho, assim como para a construção de meus conhecimentos ao longo destes anos.

Aos queridos técnicos e alunos do laboratório de Farmacologia Experimental, Me. Nayana Yared (Nay), Evandro Pessoa, Kadmiel Cândido (Kadi), Zinalton Andrade e Marcílio Souza, que estiveram juntos a mim nesta trajetória, dividindo responsabilidades, finais de semana, feriados e madrugadas no laboratório. Obrigada pelo apoio e companhia, pelas orientações, por dividirem seus conhecimentos comigo e permitirem-me dividir o meu com vocês! Obrigada por terem sido incansáveis nesta jornada, que Deus os recompense!

Aos amigos que fiz durante esses anos, Adriane Batalha (Drica), Vanessa Almeida (Nessa), Marissa Anjos (Mari) e demais alunas da minha turma de mestrado. Obrigada por serem instrumentos de Deus em minha vida, por juntas partilharmos vitórias e nos momentos de aflições sermos consolo uma para as outras! Estamos prestes a romper a linha de chegada nesta árdua corrida, meninas (Glória a Deus)! Sinto-me orgulhosa de todas vocês, sabemos muito bem das batalhas que cada uma de nós teve que travar, mas agora as entendemos e com sabedoria valorizamos cada uma delas, pois certamente elas nos fizeram mais fortes!

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Programa de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) pela oportunidade e parceira desenvolvida.

A Capes pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

“ Nem olhos víram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou
em coração humano o que Deus tem preparado
para aqueles que o amam ”

(1 Coríntios 2:9)

RESUMO

Zingiber zerumbet é uma planta comum no Norte do Brasil, sendo usualmente utilizada para fins medicinais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Z. zerumbet* (OEZz) sobre o metabolismo, função vascular e renal de ratos Wistar, bem como seu potencial antioxidante/anti-inflamatório. Para isso, foram realizados experimentos de reatividade vascular, cultura celular e análises estereológicas. Para os experimentos *in vivo* os ratos foram tratados com OEZz (50-100mg/Kg/dia) por 21 dias. Constatou-se que OEZz e zerumbona (Zer), seu constituinte majoritário, promoveram vasodilatação aórtica de maneira independente da presença do endotélio vascular em preparações pré-contraídas com fenilefrina (10^{-7} M), sendo Zer mais potente, porém de menor eficácia ($p < 0,05$). A pré-incubação das aortas com OEZz ou Zer (10^3 µg/mL) foi capaz de bloquear a vasoconstrição induzida por fenilefrina ($p < 0,0001$). OEZz e Zer demonstraram reduzir a potência da vasoconstrição mediada por influxo de cálcio em aortas estimuladas com fenilefrina (10^{-7} M) e KCl (60mM). OEZz também demonstrou potencial vasodilatador *in vivo*, observado pelo aumento de volume da aorta torácica, capilares glomerulares e peritubulares. Não foi observada hipertrofia vascular ou renal. Apesar de promover redução no ritmo de filtração glomerular, não observamos modificação de fluxo urinário ou da excreção de albumina, indicando que OEZz não promove lesão à barreira de filtração glomerular. Adicionalmente, OEZz e Zer demonstraram atividade anti-inflamatória ao inibir a produção de NO por macrófagos, e antioxidante por inibir a produção de EROs. Assim, OEZz e Zer revelam-se como possíveis ferramentas terapêuticas para o tratamento de distúrbios cardiovasculares associados à inflamação e estresse oxidativo que comprometam a função vascular e renal como a hipertensão arterial. O tratamento com OEZz ou Zer poderia promover melhora não apenas local sob o músculo liso vascular mas também prevenir lesão em órgãos-alvo por suas ações renais, potencial anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras-chave: *Zingiber zerumbet*, zerumbona, vasodilatação, função renal, inflamação.

ABSTRACT

Zingiber zerumbet is a common plant in Northern Brazil, and is usually used for medicinal purposes. The present study aimed to evaluate the biological activity of the essential oil of *Z. zerumbet* (OEZz) on the metabolism, vascular and renal functions of Wistar rats, as well as its antioxidant/anti-inflammatory potential. For this were performed experiments of vascular reactivity, cell culture and histological analysis were performed by stereology. For the *in vivo* experiments, the rats were treated with OEZz (50-100mg/kg/day) for 21 days. *In vitro*, OEZz and zerumbone (Zer), its major constituent, demonstrated a concentration-dependent vasodilator effect that were independent of the presence of the endothelium in phenylephrine (10^{-7} M) pre-constricted vessels, Zer being more potent but lower in efficacy than OEZz ($p < 0.05$). Pre-incubation of aortas with OEZz or Zer ($10^3 \mu\text{g/mL}$) were able to inhibit phenylephrine-induced vasoconstriction ($p < 0.0001$). OEZz and Zer showed to reduce the potency and efficacy of calcium influx-mediated vasoconstriction in rings stimulated with phenylephrine (10^{-7} M) or KCl (60mM). OEZz also demonstrated vasodilator potential *in vivo*, as observed by enlargement of the thoracic aorta, glomerular and peritubular capillaries. No hypertrophic responses were observed. Despite the reduction in glomerular filtration rate, OEZz treatment did not modify the urinary flow, albumin excretion or kidney structure, indicating that it did not promote damage to the glomerular filtration barrier. Additionally, OEZz and Zer demonstrated anti-inflammatory activity by inhibiting NO production in macrophages, and antioxidant properties by inhibiting the production of ROS. Thus, OEZz and Zer could be potential therapeutic tools for the treatment of cardiovascular disorders, such as hypertension, which is associated with inflammation, oxidative stress and impairment of vascular and renal function. Treatment with OEZz or Zer could promote not only improve vascular smooth muscle function, but also prevent target organ damage, due to its renal action, anti-inflammatory and antioxidant potential.

Key words: *Zingiber zerumbet*, zerumbone, vasodilation, renal function, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosine diphosphate, Difosfato de adenosina
AMPK	AMP-activated protein kinase, Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1, Proteína quinase reguladora do sinal apoptótico 1
AT1	Receptores de angiotensina II
ATP	Adenosine triphosphate, Trifosfato de adenosina
BBC	Bloqueadores de canais para cálcio
CAT	Catalase
CG-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLM	Cadeia leve de miosina
CMLVs	Células do músculo liso vascular
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-	Preparações sem endotélio
E+	Preparações com endotélio
EC₅₀	Concentração ou dose necessária para produzir 50% do efeito máximo.
ECA	Enzima conversora de angiotensina II

EDFH	Endothelium-derived hyperpolarizing factor, Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E_{máx}	Efeito máximo produzido por um fármaco
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GPx	Glutathione peroxidase
HÁ	Hipertensão arterial
HDL	High Density Lipoprotein, Lipoproteína de alta densidade
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humana
IC₅₀	Concentração do fármaco necessária para inibir 50% do efeito observado
IL-4	Interleucina do tipo 4
IL-6	Interleucina do tipo 6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase, Óxido nítrico sintase induzível
IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
Kv	Canal para potássio sensível a voltagem
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OE	Óleos essenciais
OEAZ	Óleo essencial obtido dos rizomas de <i>Alpinia zerumbet</i>

OECL	Óleo essencial obtido dos rizomas de <i>Curcuma longa</i>
OEZz	Óleo essencial obtido dos rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PGI₂	Prostaciclina
Phe	Phenylephrine, Fenilefrina
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
SHR	Spontaneously hypertensive rat, Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TNFα	Tumor necrosis factor-alpha, Fator de necrose tumoral-alfa
VLDL	Very low density lipoprotein, Lipoproteína de densidade muito baixa
VO	Via oral
Zer	Zerumbona

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografia da aorta torácica de ratos Wistar demonstrando as túnicas que compõe os vasos sanguíneos.....24
- Figura 2:** Regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular pelos íons de cálcio.....26
- Figura 3:** Cultivo de *Zingiber zerumbet*, na área rural do município de Iranduba, conhecida como Pau-Rosa.....35
- Figura 4:** *Zingiber zerumbet*: (A) Rizomas utilizados para extração do óleo essencial,(B) Exsicata e (C) Registro de exsicatas armazenadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.....41
- Figura 5:** Produção do óleo essencial obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet*: (A) Aparelho de destilação Clevenger acoplado a balão de 2L para realização do processo de hidrodestilação. (B) Fases formadas pela diferença de densidade da água e do óleo (indicado pela seta) obtidos no processo de hidrodestilação.....42
- Figura 6:** Produção de zerumbona: (A) OEZz obtido por arraste-hidrovapor. (B) Cristais de zerumbona obtidos pela recristalização do OEZz. (C) Estrutura química da zerumbona (2,6, 9,9-tetrametil-cicloundeca-2-6,10-trienona).....43
- Figura 7:** Reatividade vascular: (A) Anéis aórticos (4mm). (B) Banho de órgão isolado acoplado ao sistema de reatividade vascular para registro de força isométrica.....46
- Figura 8:** Órgãos fixados: (A) Rins direito fixados em formol tamponado (10%), (B) Aorta torácica isolada e fixada.....53
- Figura 9:** Sistema de contagem contendo pontos por meio do software *Imod* versão 4.7/módulo *stereology*.....55
- Figura 10:** Viabilidade celular de células endoteliais (HUVECs) após incubação com concentrações crescentes (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).....60
- Figura 11:** Viabilidade celular de células do músculo liso vascular de ratos Wistar após incubação com concentrações crescentes (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).....61

- Figura 12:** Viabilidade celular de fibroblastos da linhagem MRC-5 após incubação com concentrações crescentes (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).....62
- Figura 13:** Viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 após incubação com concentrações crescentes (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).....62
- Figura 14:** Cromatograma representativo das análises por CG-MS do OEZz, empregando coluna capilar (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) com uma fase estacionária composta de 5% de fenil-metilpolisiloxano e gás hélio como fase móvel.....63
- Figura 15:** Cromatograma representativo das análises por CLAE dos cristais obtidos do óleo essencial de *Z. zerumbet*, empregando coluna C18 (simetria, 250 x 4,6 mm de ID e tamanho de partículas de 5 μm), com fase móvel constituída de acetonitrila: metanol:tampão de fosfato de di-hidrogênio de potássio 0,001% (25:55:20, v/v/v), vazão de 1 mL.min⁻¹. Detecção de UV em 254nm.....65
- Figura 16:** Vasodilatação induzida pelo OEZz (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$; n=6) ou veículo (DMSO + salina; n=6) em anéis de aorta de ratos Wistar com (E+) e sem (E-) endotélio pré-contraídas com U46619(10^{-7}M).....66
- Figura 17:** Vasodilatação induzida pelo OEZZ (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$; n=6) em anéis de aorta de ratos Wistar com (E+) e sem (E-) endotélio pré-contraídos com U46619(10^{-7}M).....67
- Figura 18:** Vasoconstrição induzida por fenilefrina (Phe, 10^{-10} – 10^{-5}M) em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar pré-incubados com 500, 750 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ de OEZz ou veículo (controle).....68
- Figura 19:** Vasoconstrição induzida por influxo de cálcio pré-incubados ou não com OEZz (1000 $\mu\text{g/mL}$). (A) Preparações estimuladas com fenilefrina (10^{-7}M) (N=4). (B) Preparações estimuladas com KCl ($6 \times 10^{-4}\text{M}$) (N=5).....70
- Figura 20:** Vasodilatação induzida por zerumbona (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$; n=4) em anéis de aorta de ratos Wistar desprovidos de endotélio (E-), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7}M). (A) Curva concentração-efeito. (B) Valores de E_{c50} e $E_{m\acute{a}x}$72
- Figura 21:** Vasoconstrição induzida por fenilefrina em aorta de ratos Wistar na presença ou ausência de zerumbona (10^3 $\mu\text{g/mL}$), (A) Curvas concentração-efeito de fenilefrina (10^{-10} – 10^{-5}mol/L ; n=5) na ausência (veículo) ou presença de zerumbona (10^3 $\mu\text{g/mL}$), (B) Valores de E_{c50} e $E_{m\acute{a}x}$73

Figura 22: Vasoconstrição induzida por influxo de cálcio pré-incubados ou não com zerumbona (1000ug/mL). (A) Preparações estimuladas com fenilefrina (10^{-7} M) (N=4). (B) Preparações estimuladas com KCl (6×10^{-4} M)(N=4).....75

Figura 23: Vasodilatação induzida por OEZz e zerumbona ($10^{-3} - 10^3 \mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta de ratos Wistar desprovidos de endotélio (E-), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} M). (A) Curva concentração-efeito. (B) Valores de EC_{50} e $E_{\text{máx}}$76

Figura 24: Fotomicrografias de aorta torácica de ratos Wistar tratados ou não com OEZz. (A) Aorta torácica de animal controle. (B) Aorta torácica de animal tratado com OEZz (50mg/Kg). (C) Aorta torácica de animal tratado com OEZz (100mg/Kg).....80

Figura 25: Tratamento com OEZz promove aumento no volume total da aorta torácica. (A) Volume aórtico total. (B) Volume do espaço intraluminal. Imagens capturas por microscópio óptico sob aumento de 40.....80

Figura 26: Densidade volumétrica de componentes do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados com OEZz. CB: Corpúsculo de Bowman; EB: Espaço de Bowman; CG: Capilares glomerulares; CeG: Células glomerulares (células endoteliais + podócitos + células mesangiais).....81

Figura 27: Fotomicrografias do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados ou não com OEZz. (A) Grupo controle: corpúsculo renal sem alteração. (B) Tratamento com OEZz com (50mg/Kg). C) Tratamento com OEZz (100mg/Kg), grupos tratados apresentaram redução no Espaço de Bowman e dilatação de capilares glomerulares.....82

Figura 28: Aumento no volume de capilares peritubulares de ratos Wistar tratados com OEZz.....83

Figura 29: Fotomicrografias do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados e não tratados com OEZz evidenciando aumento de volume dos capilares peritubulares de animais tratados.. (A) Grupo controle: capilares peritubulares sem alteração. (B) Tratamento OEZz (50mg/Kg). (C) Tratamento OEZz (100mg/Kg).....83

Figura 30: Efeito anti-inflamatório via inibição da produção de NO em macrófagos murinos (J774) estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) induzidos por OEZz e Zer (12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0,390 $\mu\text{g/mL}$). Células não expostas ao LPS foram utilizadas como controle positivo e células desafiadas com LPS, como controle negativo.....84

Figura 31: Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fibroblastos humanos (MCR-5) estimulados com AAPH (600 μM), promovida por OEZz e Zer (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$). Quercetina foi usada nas

mesmas concentrações que as substâncias testadas, como controle positivo.....85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Constituintes do óleo essencial obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet*, revelados a partir de CG-MS.....64
- Tabela 2:** Constituintes dos cristais obtidos do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber zerumbet* revelados a partir da CLAE.....65
- Tabela 3:** Valores de EC₅₀ e E_{máx} do efeito vasodilatador do óleo essencial de *Z. zerumbet* (OEZz).....67
- Tabela 4:** Valores de EC₅₀ e E_{máx} do efeito vasoconstritor de fenilefrina na presença ou ausência de OEZz em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio..... 69
- Tabela 5:** Valores de EC₅₀ e E_{máx} do efeito vasoconstritor induzido por influxo de cálcio em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio pré-incubadas com OEZz (10³µg/mL) ou veículo (controle) e estimuladas com fenilefrina ou KCl.....71
- Tabela 6:** Valores de EC₅₀ e E_{máx} do efeito vasoconstritor do influxo de Ca²⁺ em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio pré-incubados com Zerumbona (10³µg/mL) ou veículo (controle) e estimulados com fenilefrina ou KCl75
- Tabela 7:** Valores finais de pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, peso corporal, fluxo urinário, consumo de água e ração de ratos Wistar controle ou submetidos ao tratamento por 21 dias com OEZz77
- Tabela 8:** Valores médios de níveis plasmáticos de colesterol, HDL, LDL e VDL de ratos Wistar submetidos ao tratamento com OEZz.....78
- Tabela 9:** Parâmetros bioquímicos e marcadores de função renal de ratos Wistar submetidos ao tratamento com OEZz.....80

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1.	Doenças vasculares x Função vascular	23
2.2.	Reatividade Vascular	23
2.2.1.	Endotélio vascular	24
2.2.2.	Músculo liso vascular	25
2.3.	Inflamação x Função vascular	27
2.4.	Estresse oxidativo x Função vascular	28
2.5.	Fitoterápicos	29
2.5.1.	Uso de óleos essenciais	31
2.5.2.	Óleo essencial de <i>Zingiber zerumbet</i>	35
3.	OBJETIVOS	40
3.1.	Objetivo geral	40
3.2.	Objetivos específicos	40
4.	METODOLOGIA	41
4.1.	Produção e caracterização do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> e <i>zerumbona</i>	41
4.1.1.	Obtenção de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	41
4.1.2.	Higienização, trituração e secagem.....	41
4.1.3.	Obtenção do óleo essencial.....	42
4.1.4.	Obtenção dos cristais de <i>zerumbona</i>	43
4.1.5.	Caracterização do OEZz por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS)	43
4.1.6.	Caracterização de <i>Zerumbona</i> por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	44
4.2.	Viabilidade celular por MTT	44
4.3.	Animais.....	45
4.3.1.	Reatividade vascular	45
4.3.1.1.	Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina.....	46
4.3.1.2.	Avaliação da integridade funcional do endotélio	47
4.3.1.3.	Protocolos experimentais	47

4.3.1.4. Análise estatística.....	48
4.4. Avaliação da atividade do óleo essencial dos rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i> sob a função vascular, renal e metabolismo de ratos Wistar	48
4.4.1. Gaiola metabólica.....	49
4.4.2. Coleta de sangue para análise bioquímica	49
4.4.3. Análise do metabolismo corporal.....	50
4.4.4. Avaliação de parâmetros de função renal.....	52
4.4.5. Coleta, processamento e volumetria dos órgãos	53
4.4.6. Estereologia.....	53
4.4.6.1. Determinação de Volume (Cavalieri).....	54
4.4.6.2. Determinação do Volume Relativo (Delesse).....	56
4.4.6.3. Análise estatística.....	56
4.5. Avaliação da ação anti-inflamatória.....	57
4.5.1. Quantificação de nitrito	58
4.6. Avaliação da atividade antioxidante celular	58
5. RESULTADOS.....	60
5.1. Testes de viabilidade celular (MTT)	60
5.2. Caracterização do óleo essencial de <i>Zingiber zerumbet</i> e de seu componente majoritário.....	63
5.3. Avaliação da atividade biológica de OEZz sobre a reatividade vascular em ratos Wistar.....	66
5.3.1. Análise do efeito vasodilatador direto de OEZz em anéis aórticos pré-contraidos com U46619.....	66
5.3.2. Análise do efeito de diferentes concentrações de OEZz sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina.....	68
5.3.3. Avaliação do mecanismo de bloqueio da vasoconstrição induzida por fenilefrina ou KCl em preparações incubadas com OEZz	69
5.4. Análise do efeito de zerumbona sob a reatividade vascular aórtica em ratos Wistar	71
5.4.1. Análise do efeito vasodilatador direto de zerumbona em anéis aórticos pré-contraidos com fenilefrina	71
5.4.2. Análise do efeito de zerumbona sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina	73
5.4.3. Avaliação do mecanismo de bloqueio da vasoconstrição induzida por fenilefrina ou KCl em preparações incubadas com zerumbona.....	74

5.5.	Avaliação do metabolismo corporal.....	77
5.5.1.	Peso corporal, consumo de ração e água, pressão arterial e frequência cardíaca	77
5.5.2.	Perfil lipídico	78
5.5.3.	Avaliação de parâmetros de função renal	78
5.5.4.	Avaliação estereológica da aorta torácica de animais tratados com OEZz.....	80
5.5.5.	Avaliação estereológica do rim direito de animais tratados com OEZz.....	81
5.6.	Potencial anti-inflamatório de OEZz e Zer.....	84
5.7.	Potencial antioxidante de OEZz e Zer.....	85
6.	Discussão	86
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE	121

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como instrumento terapêutico é tão antiga quanto à própria civilização humana. Durante muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram os únicos recursos para o tratamento de enfermidades. Desde então, as plantas têm representado uma fonte importante de produtos bioativos para a humanidade (RATES, 2001; ADAMS, 2009; PROENÇA DA CUNHA, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso de medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais alcança 80% da população mundial. No Brasil, pesquisas demonstram que cerca de 90% da população já fez uso de alguma planta com caráter medicinal (CÔRREA, 2008). Revela-se ainda que o uso destas é tão comum no Brasil que em algumas regiões do país elas são comercializadas livremente em mercados populares e cultivadas nos quintais das residências (MACIEL, 2002).

Em geral, plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de várias doenças, desde quadros leves como tosse, gripe, dores musculares e desordens do trato intestinal, como também no tratamento de patologias mais graves como diabetes, obesidade, carcinomas, doenças cardiovasculares entre outras (SILANO, 2004; FOGGIO, 2006; AHMAD, 2010; MORAES, 2011; CONTER, 2015; MARMITT, 2016).

Muitas pesquisas têm se empenhado em identificar os compostos ativos e os mecanismos de ação de plantas usadas na medicina tradicional (PROENÇA DA CUNHA, 2010). O interesse pela utilização de plantas tem aumentado devido a vários fatores, como o surgimento de novas ameaças à saúde pública e a toxicidade relacionada ao uso indiscriminado de fármacos sintéticos (ELLESS, 2000).

A ação medicinal das plantas é conferida aos metabólitos produzidos por elas, compostos estes que desempenham funções importantes como na defesa de predadores e atração de polinizadores, colaborando assim para sua

sobrevivência (TRAPP e CROTEAU, 2001). Entre esses metabólitos, estão os óleos essenciais que se tornaram alvos de interesse da comunidade científica, havendo inúmeros relatos de suas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* (SADEGHI, 2013).

Os avanços nos estudos de plantas medicinais propiciaram o surgimento dos fitoterápicos, medicamentos produzidos a partir de matéria-prima vegetal, seja em sua forma integral ou a partir de seus constituintes, com a finalidade de uso no tratamento de patologias (FRANÇA, 2008). A partir disso, vários medicamentos foram e continuam sendo produzidos direta ou indiretamente a partir de plantas, a exemplo da morfina, taxol, pilocarpina, vincristina, entre outros (FOGLIO, 2006). O uso e a produção de fitoterápicos é de tal relevância que, segundo Oshiro e colaboradores (2016), cerca de 25 à 30% de todas as drogas disponíveis para terapêutica são derivadas de produtos naturais.

Esses dados justificam o grande interesse da indústria farmacêutica em pesquisar e produzir agentes terapêuticos oriundos de produtos naturais, recebendo apoio do Ministério de Saúde do Brasil que criou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Esta política incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologia e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos nas diversas fases da sua cadeia (BRASIL, 2006).

Na busca por novos fitoterápicos ou novas moléculas para a semi-síntese de fármacos, a investigação dos óleos essenciais tem apresentado grande crescimento. Óleos essenciais de várias espécies de plantas já tiveram seu potencial farmacológico descrito, como o *Zingiber officinale*, *Spiranthera odoratissima*, *Echinodorus macrophyllus*, *Alpinia speciosa*, entre várias outras espécies (BEZERRA, 2000; COELHO, 2013; OLIVEIRA, 2016). O óleo essencial obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* tem demonstrado em diversos estudos atividades anti-inflamatória (ZAKARIA et al., 2010), antinociceptiva (SOMCHIT et al., 2005), hepatoprotetora (CHAUNG et al, 2008) e anticancerígena (TUSHAR et al., 2010), porém seus efeito sob a função renal e vascular ainda merecem maiores investigações.

Atualmente, muitos estudos têm se voltado para a problemática das doenças cardiovasculares as quais foram consideradas a principal causa de morte no Brasil em 2013 (IBGE, 2014). Segundo Souza e colaboradores (2017),

as doenças do aparelho circulatório são as principais responsáveis por óbitos no mundo e apresentam relação direta com as condições de vida das populações.

Diante disso, este projeto visa avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith e seu componente majoritário, zerumbona, sobre a função vascular e renal em ratos Wistar e seu potencial antioxidante/anti-inflamatório, podendo assim contribuir para a investigação de novas terapias ou mecanismos farmacológicos que visem contribuir para a redução das injúrias ocasionadas por doenças que afetam o sistema cardiovascular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Doenças vasculares x Função vascular

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), no ano de 2015 a doença cardiovascular (DCV) foi a principal causa de morte em todo o mundo. Aproximadamente 17,7 milhões de pessoas foram a óbito, representando 31% de todas as mortes globais. Segundo o Instituto Nacional de Geografia e Estatística (2013), as doenças cardiovasculares foram a principal causa de óbito no Brasil no ano de 2013, de forma que 4,2% (6,1 milhões) da população com idade acima de 18 anos se auto-referiram com DCV.

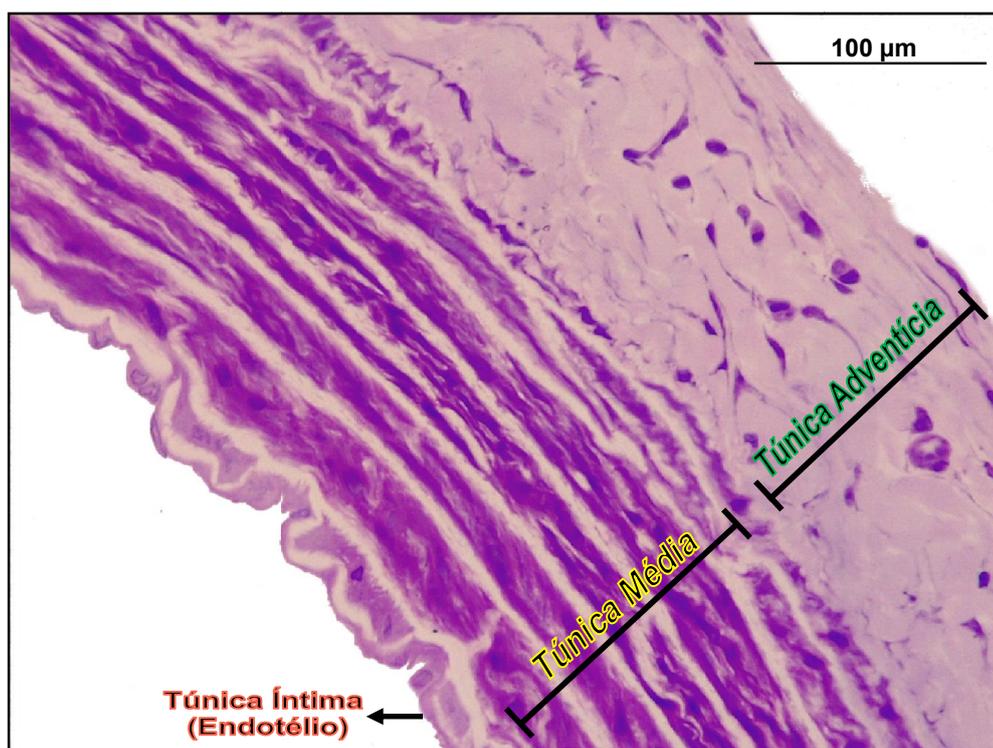
As DCVs são denominadas como um grupo de doenças que ocasionam distúrbios no coração e vasos sanguíneos, como a doença arterial coronariana, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, entre outras (OMS, 2017). Essas patologias normalmente estão associadas ao comprometimento da função vascular. Neves e colaboradores (2009) afirmam que a função autonômica e a reatividade vascular quando comprometidas podem constituir mecanismos centrais no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares.

A aterosclerose, hipertensão e diabetes mellitus são patologias que estão relacionadas à disfunção endotelial, ocasionando má regulação da reatividade vascular (WAJCHENBERG, 2002; BAHIA, 2004; BASZCZUK, 2014). Estas patologias são consideradas fatores que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de DCV, entre outros motivos, por prejudicar o funcionamento vascular e o fluxo sanguíneo (ANDRADE, 2012).

2.2. Reatividade Vascular

O bom funcionamento dos vasos sanguíneos se dá por sua capacidade de responder aos diferentes estímulos vasoconstritores e vasodilatadores aos quais

estão expostos. Os vasos sanguíneos são formados basicamente por três camadas, também denominadas como túnicas: túnica íntima – composta por uma camada única de células endoteliais; túnica média – constituída por células do músculo liso vascular; e túnica adventícia – formada por fibroblastos em uma camada de tecido conjuntivo denso não modelado (Figura 1) (KIERSZENBAUM, 2016).



Fonte: Anne Graça (2017)

Figura 1: Fotomicrografia de aorta torácica de ratos Wistar demonstrando as túnicas que compõem os vasos sanguíneos (Aumento 400, Coloração: Toluidina e Fucsina).

2.2.1. Endotélio vascular

O endotélio vascular faz a interconexão entre o sangue e o músculo liso vascular. Ele é responsável pela modulação do tônus vascular e exerce o controle das respostas vasodilatadoras ou vasoconstritoras locais em resposta a alterações de fluxo sanguíneo e agentes vasoativos (CERAVOLO et al., 2012).

Além disto, o endotélio exerce funções anticoagulantes e anti-inflamatórias que são fundamentais para manter a homeostasia. Exerce função protetora contra

o desenvolvimento de lesões vasculares, além de inibir a adesão leucocitária, a proliferação de células musculares lisas e manter a vasodilatação. Essas ações são exercidas principalmente por substâncias como óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Existem também os fatores contráteis do endotélio como endotelinas, angiotensina II, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (CARVALHO, et.al.,2001). Assim, o endotélio pode ser considerado um sistema autócrino, parácrino e endócrino no organismo humano (HSIEH, 2014).

Em condições homeostáticas, a liberação e produção desses fatores contráteis e vasodilatadores são equilibrados e responsáveis pela manutenção do tônus vascular. Entretanto, em condições patológicas como na hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio entre estes fatores e uma consequente diminuição da vasodilatação endotélio-dependente resultante do processo de disfunção endotelial (BASZCZUK, 2014).

2.2.2. Músculo liso vascular

O músculo liso vascular, segundo Hall (2017), é classificado como músculo liso unitário, também chamado de visceral ou sincicial, onde milhares de fibras musculares se contraem simultaneamente como uma unidade única. As fibras ocorrem geralmente em feixes ou camadas, de forma que suas membranas celulares são unidas por junções comunicantes que permitem o fluxo de íons de uma fibra a outra, possibilitando que o potencial de ação rapidamente se propague, promovendo uma contração conjunta de todas as fibras musculares lisas.

A contração do músculo liso vascular é ativada pelos íons cálcio (Ca^{2+}), enquanto o fornecimento de energia é suprido pela degradação da molécula de trifosfato de adenosina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP) (CHONG e MICHEL, 2009).

A maquinaria contrátil deste músculo é acionada quando a cadeia reguladora da cabeça leve de miosina é fosforilada, favorecendo sua interação com os filamentos de actina. Esse processo se inicia com a elevação do nível de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). O cálcio, desta forma, interage com a calmodulina,

formando o complexo cálcio-calmodulina. Este complexo ativa a enzima miosina quinase, que por sua vez, é a responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM). Em contrapartida, quando os níveis de $[Ca^{2+}]_i$ reduzem, esses processos se reverterem, exceto a fosforilação da cabeça de miosina. Para que esta etapa se reverta é necessária a ação da enzima miosina fosfatase, responsável pela desfosforilação da CLM, promovendo o relaxamento vascular (Figura 2) (HALL, 2017).

Assim, a atividade das miosinas quinases e fosfatases regulam a atividade do músculo liso vascular promovendo contração ou relaxamento muscular (GUYTON e HALL, 2017).

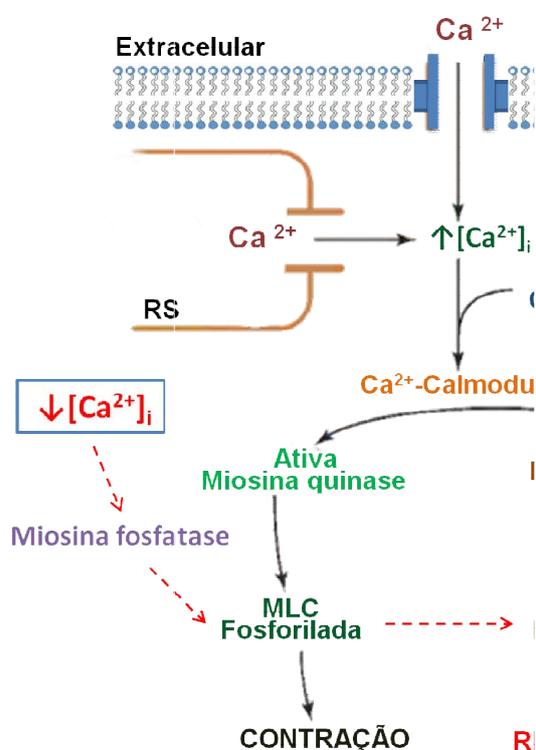


Figura 2: Regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular pelos íons de cálcio. RS: Retículo sarcoplasmático; $\uparrow [Ca^{2+}]_i$: Aumento na concentração intracelular de cálcio; $\downarrow [Ca^{2+}]_i$: Diminuição na concentração intracelular de cálcio; MLC: Cadeia leve da cabeça de miosina. Adaptada de Guyton e Hall (2017).

Muitos fármacos que promovem contração ou relaxamento do músculo liso, o fazem por meio da ativação ou inibição da vasoconstricção promovida por esta cascata. A ativação pode ser desencadeada por agonistas de receptores acoplados a proteína G expressa no músculo liso vascular, como o cloridrato de fenilefrina, noradrenalina ou angiotensina II. A vasodilatação, por outro lado, pode

ser estimulada por nitroprussiato de sódio ou nitroglicerina. Estes fármacos liberam óxido nítrico, o qual ativa a enzima guanilato ciclase solúvel presente no citosol das células do músculo liso vascular e estimula a redução da $[Ca^{2+}]_i$. A promoção de relaxamento no músculo liso vascular também pode ser resultante do antagonismo de receptores ou modificação do comportamento de canais iônicos que medeiam a vasoconstrição. Como exemplo, podemos citar a prazosina, antagonista dos receptores α_1 -adrenérgico, a nifedipina, bloqueador de canais para cálcio, ou por outros mecanismos, tais como os utilizados por diuréticos tiazídicos, simpatolíticos centrais, inibidores da enzima conversora de angiotensina II, entre outros fármacos (SAIDA e BREEMEN, 1983; RANG et al., 2012; BRUNTON et al., 2012).

2.3. Inflamação x Função vascular

As modificações nos vasos sanguíneos de seres humanos e animais com hipertensão arterial (HA) estão associadas a vários fatores, entre eles a inflamação (GALVÃO, 2014). Observa-se que a hipertensão arterial ocasiona aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, promovendo o aumento da interação destas com monócitos circulantes e sua consequente migração para os tecidos, gerando o processo de inflamação.

Estudos têm demonstrado que os macrófagos estão intimamente relacionados ao desenvolvimento e evolução da doença endotelial, principalmente no processo aterogênico resultante de estados hiperlipidêmicos (ROSS, 1993; STOLL e BENDSZUS, 2006; LUZ, 2013). Assim sendo, infere-se que a presença de macrófagos, uma vez associada à manutenção do estado inflamatório, colabora para o desenvolvimento de doenças como a hipertensão e a aterosclerose.

Além da presença dos macrófagos, o quadro inflamatório tem demonstrado promover disfunção endotelial por meio do aumento de seus marcadores inflamatórios, como IL-6, PCR e espécies reativas oxigênio (EROs) (SOUZA et al., 2008). Estudos apontam que esses mediadores comprometem a biodisponibilidade do NO, diminuindo a vasodilatação endotélio dependente e promovendo aumento de endotelina-1 (vasoconstritor produzido por células

endoteliais) (TEIXEIRA, 2014). Diversos estudos apontam que mediadores inflamatórios atuam como desencadeadores do processo de disfunção endotelial (BIRUKOV, 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2015).

2.4. Estresse oxidativo x Função vascular

O comprometimento da função vascular, além da inflamação, tem sido associado à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As células vasculares, em condições homeostáticas, produzem EROs como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^{\cdot}) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (SOUSA, 2012). Estas espécies são encontradas em baixos níveis no interior das células e são rapidamente inativadas por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). Estas enzimas formam o sistema antioxidante endógeno, que em conjunto com outras moléculas antioxidantes não enzimáticas do corpo, inibem o estresse oxidativo (MATLUNG, 2009).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de EROs e a sua eliminação por defesas antioxidantes. Estudos demonstram que a presença exacerbada de EROs pode promover redução na biodisponibilidade de NO e ativação de vias de sinalização intracelular que, em conjunto, culminam em alteração no tônus e remodelamento vascular, seja por induzir proliferação celular ou por promover o desenvolvimento de processo inflamatório (SZASZ, 2007; WESELER e BAST, 2010; ZINKEVICH e GUTTERMAN, 2011).

Giordano (2005) demonstra que a presença aumentada de EROs está associada à modificação da contratilidade cardíaca, devido à alteração que estas espécies induzem em canais iônicos, mais especificamente em canais para cálcio de tipo L, para sódio e potássio. As EROs também podem reduzir a contratilidade de cardiomiócitos por ativar a proteína quinase reguladora do sinal apoptótico 1 (ASK-1). Esta proteína, por sua vez, promove a fosforilação da troponina C, diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (HE, 2003).

Por outro lado, sob a musculatura lisa vascular, estudos apontam que o estresse oxidativo tem demonstrado promover hipertrofia do músculo liso vascular, elevação na deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento da contratilidade das células do músculo liso vascular, inflamação, migração de

monócitos, peroxidação lipídica, disfunção endotelial e apoptose (UEMURA et al., 200; KADAGLOU et al., 2005).

Estudos em modelos animais demonstraram que o tratamento com antioxidantes foi capaz de restaurar o tônus vascular, revertendo à disfunção endotelial (SOLZBACH, 1997; SATO, 2002; AZEVEDO, 2015).

Diante do que foi visto, a investigação de novos fármacos que promovam melhora ao tônus vascular e inibição de eventos inflamatórios e oxidativo, podem desvendar novos recursos terapêuticos capazes de inibir às manifestações deletérias da hipertensão, bem como de outros fatores contribuintes para doenças cardiovasculares.

2.5. Fitoterápicos

A prática da utilização de plantas para fins medicinais perdura por milênios e tem sido passada de geração em geração de acordo com a cultura local (LEAL, 2016). No Brasil, o emprego de plantas medicinais é uma prática corriqueira, enriquecida por nossas diferenças culturais. Esta miscigenação atrelada à grande diversidade vegetal do país tem propiciado o estabelecimento de medicinas tradicionais baseadas em diferentes plantas e métodos de tratamento (BRANDÃO, 1996).

Neste cenário, surgiram medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais em diferentes apresentações, tais como sucos, ceras, exsudatos, óleos, extratos, tinturas, entre outros. Estes medicamentos são denominados de fitoterápicos (SCHULZ, 2013). Nas últimas décadas, observa-se um crescimento na utilização e comercialização de fitoterápicos pela população brasileira. Pelo menos três fatores parecem explicar este aumento: 1) avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes; 2) a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas à saúde, isto é, que gerem menos efeitos colaterais e 3) a frequente utilização de plantas como medicamento, hábito que continua se perpetuando em muitas sociedades tradicionais como um fator cultural (YUNES et al., 2001; TIRAPELLI et al., 2010; CUNHA et al., 2011).

Com o avanço dos fitoterápicos, em 2006 o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), visando garantir acesso seguro e uso regular das plantas medicinais e fitoterápicos pela população brasileira (BRASIL, 2006). Porém, somente em 2012 os fitoterápicos foram inseridos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), onde doze fitoterápicos passaram a compor a relação de medicamentos e insumos farmacêuticos, voltados aos agravos prevalentes e prioritários da Atenção Básica (BRASIL, 2013) Essa relação de fitoterápicos se mantém até a última publicação da RENAME em junho de 2015 (BRASIL, 2015).

Os fitoterápicos geralmente são utilizados pela população de forma preventiva ou na terapêutica de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, intestinais, problemas respiratórios, entre outros (BRASIL, 2008). Segundo Calixto (2005), os fitoterápicos raramente têm seus princípios ativos conhecidos em decorrência de sua complexa composição. Entretanto, com o ascendente avanço das técnicas analíticas de alta resolução, o isolamento e a caracterização de compostos a partir de matérias primas vegetais tem sido realizado com êxito. Assim, os produtos naturais têm representado uma fonte importante de compostos biologicamente ativos.

Ser constituído por grande número de componentes fornece aos fitoterápicos vantagem terapêutica, visto que estes componentes podem interagir entre si de forma aditiva ou sinérgica, podendo promover maior eficácia do que a apresentada pelo constituinte conhecido de forma isolada (BRASIL, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde (2008), a caracterização do(s) princípio(s) ativo(s) pode ser alcançada pela análise de um ou mais constituintes sugestivamente responsáveis pela atividade da planta, por meio da quantificação de um composto que se apresenta com teor considerável em relação à composição total, ou ainda, pelo perfil cromatográfico dos constituintes totais.

Dentre os materiais vegetais com potencial fitoterápico, os óleos essenciais (OE) tem se destacado por apresentarem grande potencial farmacológico e terapêutico (EDRIS, 2007). Por este motivo, os OE têm sido alvo de interesse de vários pesquisadores brasileiros ao longo de várias décadas (CUNHA, 1995; LIMA, 1996; FARIAS, 2000; BELÉM, 2002; LIMA, 2003; MICHELIN ET AL., 2005; HENRIQUES, 2013; MILLEZI, 2014; ARAÚJO, 2015; MIRANDA, 2016).

2.5.1. Uso de óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) são originários do metabolismo secundário de plantas. São compostos naturais voláteis, complexos, lipofílicos, geralmente odoríferos, líquidos e normalmente extraídos de plantas provenientes de países de clima quente, como os da região do mediterrâneo e dos trópicos. Em geral, nestes países, os óleos essenciais são parte importante da medicina tradicional local (MACHADO, 2011).

Com o desenvolvimento das técnicas de análises químicas, vários componentes dos OE foram descritos, dentre eles, relata-se a presença de terpenos, predominante de monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), além de fenilpropanos e outros componentes voláteis (MOREIRA, 2001; FRANZ, 2010).

Propriedades físico-químicas importantes têm sido descritas para os OEs quando comparadas a outros medicamentos. Como exemplo, podemos citar a volatilidade, que viabiliza seu uso em nebulizações e banhos de imersão. Além disso, por apresentar componentes voláteis e com baixo peso molecular, os OE possuem a capacidade de serem rapidamente eliminados do organismo por meio das vias metabólicas (BANDONI, 2008).

Diversos estudos descrevem atividades biológicas promovidas por OE, dentre eles estão: i) atividade larvicida demonstrada em populações de *Aedes aegypti* (ARAÚJO, 2014); ii) atividade miorelaxante e antiespasmódico observada sob óleo de ratos Wistar (BEZERRA, 2000); iii) atividade antioxidante demonstrada pelo método de DPPH e peroxidação lipídica (BURITS, 2000; YASSA, 2015); iv) atividade antimicrobiana observada pela citotoxicidade promovida sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência (ARAÚJO, 2015); v) atividade antidepressiva revelada pelo tratamento com OE em camundongos albinos machos nos testes do campo aberto, nado forçado e suspensão pela cauda (OLIVEIRA, 2016); vi) atividade analgésica manifestada em camundongos em modelo de hiperalgesia induzido por ácido acético. (COELHO, 2013); vii) atividade anti-inflamatória demonstrada pela inibição na produção de NO de macrófagos (Raw 264.7) estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (RODRIGUES, 2014); viii) atividade antitumoral revelada em camundongos em modelo de carcinoma colorretal

(SILVA, 2008 ; DAHHAM, 2016); ix) atividade gastroprotetora observada em camundongos sob modelo de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina (AMARAL, 2004); x) atividade anticonvulsivante observada em camundongos com convulsões induzidas por eletrochoque e penetração de pentileno-tetrazol (SAYYAH, 2002) e xi) atividade sob o sistema cardiovascular revelado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (SANTOS, 2014).

Os OE podem ser extraídos de várias partes da planta como das flores, folhas, cascas, rizomas e frutos. Suas técnicas de extração podem variar de acordo com a localização do óleo na planta e com o foco de utilização deste, pois suas propriedades podem variar de acordo com o modo de extração. Geralmente, os métodos mais utilizados são a destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e por CO₂ supercrítico (OKOH et al, 2010).

Segundo Bizzo e colaboradores (2009) o Brasil é considerado um grande produtor e exportador de óleos essenciais, com destaque para os óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela e gengibre. Os quais são utilizados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos e farmacêutica.

A caracterização química dos componentes dos OE pode ser realizada por várias formas de cromatografia, porém, o método mais utilizado é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), onde os constituintes dos OE são definidos pela análise das regiões de pico formadas no cromatograma (ADRIANA, 2004).

É importante salientar que as atividades biológicas promovidas por OE não são obrigatoriamente geradas pelo constituinte majoritário do mesmo, todavia é possível que o efeito seja promovido por um constituinte em menor proporção ou mesmo que seja oriundo de um sinergismo entre outros compostos existentes no óleo, como ocorre com o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (MUKHERJEE, 2007).

Apesar das inúmeras atividades benéficas relatadas para os OE, estudos como o de Sen e colaboradores (2010) apontam para a toxicidade frequentemente dose dependente de OE voláteis. Seus estudos demonstram reações adversas como alergias de contato mesmo com a utilização de baixas

doses. Desta forma, é de fundamental importância a realização de estudos que analisem o perfil de segurança para utilização dos OE.

2.5.1.1. Efeitos biológicos de óleos essenciais da família Zingiberaceae sobre o sistema cardiovascular.

A família Zingiberaceae possui cerca de 50 gêneros e 1100 espécies que se distribuem em regiões tropicais, especialmente no sul e sudeste da Ásia, na África tropical e América do Sul. Suas espécies são conhecidas por seu valor econômico, fornecendo alimentos, perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e por serem utilizadas para fins medicinais (SOUZA e LORENZI, 2012). A seguir, relatamos algumas espécies desta família e os achados obtidos.

Alpinia zerumbet

Pertencente à família Zingiberaceae, a *Alpinia zerumbet*, popular gengibre concha, é uma erva terrestre comumente utilizada para fins depurativos, diuréticos, anti-hipertensivo e vermífugos, sendo as folhas, flores e rizomas as partes vegetais mais utilizadas (ALBUQUERQUE et al., 2007; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2007). Desta forma, esta planta tem sido alvo de estudo de vários grupos (LAHLOU et al., 2002; LAHLOU et al., 2003; LEAL-CARDOSO et al., 2004; MOURA et al., 2005; PINHO et al., 2005).

Estudos com o óleo essencial obtido dos rizomas de *A. zerumbet* (OEAZ) revelaram efeito anti-hipertensor, promovendo redução imediata e significativa da pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos induzidos por sal e deoxicorticosterona (DOCA-sal) (LAHLOU et al., 2002; LAHLOU et al., 2003). O terpinen-4-ol, principal constituinte de OEAZ, também promoveu redução na pressão arterial, de forma dependente da dose (1-10 mgKg⁻¹), indicando ser este, o responsável pela ação anti-hipertensiva do OEAZ. Os autores sugerem ainda, que a ação hipotensora do OEAZ independe do sistema nervoso autônomo, sendo atuante como um agente vasodilatador direto sob o músculo liso vascular (LAHLOU et al., 2003).

Pinto e colaboradores (2009) corroboraram o resultado do efeito hipotensor do OEAZ. Seus estudos com o OEAZ e um dos seus constituinte, o 1,8-cineol, confirmam a ação vasodilatadora das duas substâncias, acrescentando que possivelmente este efeito seja dependente da integridade funcional do endotélio vascular. Todavia, segundo eles, este efeito não pode ser conferido unicamente à ação do 1,8-cineol.

Estudos de Barcelos e colaboradores (2010) revelaram que o tratamento crônico com o OEAZ foi capaz de reduzir a pressão arterial média e diminuir o quadro de hipertrofia cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), efeitos atribuídos à presença de terpinen-4-ol e 1,8-cineol. Segundo os autores, a presença destes componentes promoveu melhora da resposta hemodinâmica cardiovascular, como a redução na pressão arterial média de ratos SHR, apesar de não normalizar a pressão.

Curcuma longa

A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão-da-terra, é uma planta de origem asiática comumente usada como tempero e para fins medicinais. O óleo essencial obtido dos rizomas de *Curcuma longa* (OECL) têm sido alvo de vários estudos, demonstrando efeito anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano e antitumoral (SANTOS FILHO et al., 2015; LIJU, et al. 2014; SADO KAMDEM et al., 2015). O principal constituinte do OECL é a curcumina, substância que têm apresentado, como referido abaixo, uma série de efeitos cardiovasculares.

Fleenor e colaboradores (2013) demonstraram que camundongos idosos (C57BL6) que receberam curcumina suplementada (0,2%) durante quatro semanas demonstraram redução na produção de colágeno I para níveis semelhantes de camundongos jovens. O tratamento também restaurou a capacidade de dilatação endotélio-dependente estimulada por acetilcolina, outrora deficiente em camundongos idosos. Além disto, o tratamento inibiu a produção de superóxido, melhorando o quadro de estresse oxidativo e a disfunção endotelial. Estes resultados revelam que a suplementação com curcumina reduz o enrijecimento aórtico, pela redução na produção de colágeno I e produtos da glicosilação avançada, melhora o envelhecimento da artéria elástica, associada à idade, melhorando a vasodilatação mediada por NO e inibindo o estresse oxidativo e a disfunção endotelial em camundongos idosos.

Em outro trabalho, observou-se que a curcumina é capaz de inibir os canais para K⁺ (K_v) de células musculares lisas de artérias coronárias de coelhos, fato este, que segundo os autores, pode contribuir para redução da hipertensão arterial, uma vez que o tratamento com curcumina promove inibição na corrente vascular de K_v de forma estatal, temporal e dependente do uso (SON et al., 2013). Akazawa e colaboradores (2012) observaram que a ingestão de curcumina diariamente por 8 semanas gerou aumento da dilatação fluxo-mediada em mulheres na pós-menopausa, sugerindo que o composto possa minimizar o declínio da função endotelial nestas mulheres.

Pode-se notar que a família Zingiberaceae possui espécies com ação sob o sistema cardiovascular. Entre elas, uma espécie que tem mostrado potencial farmacológico, tanto em modelos *in vivo* quanto em modelos *in vitro*, é a *Zingiber zerrubet*, conhecida popularmente como gengibre amargo.

2.5.2. Óleo essencial de *Zingiber zerumbet*

O *Zingiber zerumbet* L. Smith (Figura 3) é uma monocotiledônea perene, pertencente ao gênero *Zingiber* da família Zingiberaceae. De origem asiática, foi introduzida na região Amazônica distribuindo-se por todo o território estadual devido a sua fácil adaptação e cultivo (BUCKER et al., 2013).



Figura 3: Cultivo de *Zingiber zerumbet*, na área rural do município de Iranduba, conhecida como Pau-Rosa. Foto: Carlos Cleomir, 2015.

No Amazonas esta espécie tem sido cultivada na área rural do município de Iranduba. É popularmente conhecida como gengibre amargo e utilizada comercialmente em produtos cosméticos (SOUZA, 2015).

Os rizomas de *Z. zerumbet*, em particular, têm sido tradicionalmente utilizados como remédio caseiro pelos asiáticos, indianos, chineses e na cultura árabe desde os tempos antigos. Apesar de seu uso regular como aromatizante de alimentos e aperitivos na cozinha indiana e japonesa, os rizomas de *Z. zerumbet* também são amplamente utilizados na medicina tradicional com a finalidade de cura para várias doenças (SULAIMAN et al., 2010; NORULAINI et al., 2009; ELLIOTT S. e BRIMACOMBE, 1987) e no tratamento de inflamação, febre, dor de dente, indigestão, prisão de ventre, diarreia, entorses graves, como analgésico, bem como anti-espasmódico, anti-reumáticos e como agente diurético (BHUIYAN et al., 2008; ZAKARIA et al., 2010; ZAKARIA et al., 2011). Além disso, descreve-se o uso de seus rizomas frescos no tratamento de edema, dor de estômago, úlceras e perda de apetite, enquanto o suco dos rizomas cozidos é utilizado para tratar infestação por vermes em crianças (BURKILL, 1966; SOMCHIT e SHUKRIYAH, 2003; RUSLAY et al., 2007).

Dentre todas as partes da planta, os rizomas da *Z. zerumbet* têm sido utilizados em uma ampla variedade de estudos. Na tentativa de isolar e identificar compostos bioativos provenientes destes rizomas, Damodaran e Dev (1968) isolaram das frações sesquiterpênica do óleo essencial de *Z. zerumbet* o epóxido de humuleno-I, epóxido de humuleno-II, humulenol-II e humulenol-I e humulenol-III. Srivastava (2000) e Yu e colaboradores (2008) relataram a presença de aproximadamente 86% de sesquiterpenos, sendo a zerumbona o principal componente do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet*. Além do sesquiterpeno zerumbona, ainda foi isolado o flavonóide (3-O-metil campferol), um agente antioxidante, e flavonóides glicosídeos como campferol 3-O- (2, 4-di-O-acetil-L- α -ramnopiranosídeo) e campferol 3-O-(3,4-di-o-acetil-L- α -ramnopiranosídeo) provenientes do extrato metanólico obtido dos rizomas de *Z. zerumbet* (CHIEN et al., 2008).

Os rizomas de *Z. zerrubet* tem demonstrado atividade antimicrobiana, anti-hiperglicêmica, antialérgica, antioxidante e antiplaquetária em diferentes doses/concentrações. Além disto, demonstram atividades antiinflamatórias (ZAKARIA et al., 2010), antinociceptiva (SOMCHIT et al., 2005), hepatoprotetora (CHAUNG et al, 2008) e anticancerígena (TUSHAR et al., 2010).

A retinopatia diabética é uma complicação comum em pacientes com diabetes, que é desencadeada por alterações microvasculares da retina, como disfunção da barreira sangue-retiniana e hiperpermeabilidade da circulação capilar, resultantes do estado hiperglicêmico. Segundo Liou (2017), o tratamento oral com extrato aquoso de *Z. zerumbet* é capaz de reduzir a pressão intraocular de ratos diabéticos do tipo I, além de reduzir o acúmulo de fibrinogênio na retina, o inchaço celular, o sangramento e a angiogênese. Estes eventos promoveram melhora do quadro de retinopatia por diminuir os fatores que colaboram com as alterações microvasculares.

Ainda em modelos de diabetes, outra complicação decorrida desta patologia é a nefropatia diabética, Tzeng e colaboradores (2013), usando um modelo de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, observaram que o tratamento por via oral com extrato etanólico de *Z. Zerumbet* durante 8 semanas, produziu redução da hiperglicemia e da disfunção renal, promovendo melhora das alterações patológicas glomerulares induzidas pelo diabetes. Além disso, as expressões protéicas de nefrina renal e podocina em ratos diabéticos foram significativamente aumentadas após o tratamento, por outro lado a fosforilação e expressão da proteína quinase (AMPK) ativados por AMP foram notavelmente reduzidos nos tecidos renais dos ratos tratados. Assim sugere-se que os efeitos renoprotetores promovidos pelo extrato etanólico de *Z. zerumbet* estejam associados à prevenção da desfosforilação de AMPK e aumento na expressão protéica de nefrina e podocina.

O potencial anti-inflamatório do extrato aquoso de *Z. zerumbet* foi demonstrado por Chaung e colaboradores (2008), onde camundongos BALB/C sensibilizados e desafiados com ovalbumina para induzir anafilaxia. Os animais tratados com o extrato aquoso demonstraram, em ensaios *in vitro*, reduzir a liberação de TNF- α e interleucina-4 (IL-4). *In vivo*, o tratamento suprimiu significativamente a liberação de leucotrieno C4 no tecido pulmonar ($p < 0,05$). Estes dados demonstram a capacidade do extrato aquoso de *Z. zerumbet* em inibir mediadores inflamatórios *in vivo* e *in vitro*.

Outros estudos corroboram com o potencial anti-inflamatório de *Z. zerumbet* em modelos de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina) e crônica (testes de granulomas induzidos por pellets de algodão). Nestes modelos,

observou-se redução na formação dos edemas e granulomas nos animais tratados com óleo essencial de *Z. zerumbet* (ZAKARIA, 2010).

A Zerumbona, composto majoritário do óleo essencial de *Z. zerumbet*, tem ganhado destaque por revelar propriedades como, atividade antiparasitária, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antioxidante, gastoprotetora, atividade antimicrobiana e antimutagênica (SHIEH, 2015; SIDAHMED, 2015; MUKHERJEE, 2016; KUMAR, 2017; KIM, 2017; WANI, 2017).

Sidahmed e colaboradores (2015) observaram o potencial gastroprotetor e antioxidante de zerumbona, por meio da administração intragástrica deste composto em ratos expostos a úlcera gástrica aguda induzida pela administração de etanol absoluto. O tratamento demonstrou efeito gastroprotetor, protegendo a mucosa gástrica do efeito agressivo da úlcera, aumentando a produção de muco e reduzindo a produção de suco gástrico, além de reduzir o edema submucoso e a infiltração de leucócitos. No teste de poder antioxidante de redução férrica, a zerumbona demonstrou capacidade de eliminação de radicais livres semelhantes ao antioxidante, ácido ascórbico.

Em modelo de nefropatia diabética induzida em camundongos por estreptozotocina, o tratamento com zerumbona (20 ou 40 mg/kg/dia) durante 8 semanas foi capaz de reduzir os níveis séricos de IL-1, IL-6 e TNF- α , além de inibir a infiltração de macrófagos nos rins dos animais tratados. Ademais, o tratamento promoveu redução da expressão renal de TFG- β , ICAM-1 e fibronectina, culminando na melhora da função renal e redução da proteinúria de camundongos diabéticos (TZENG et al., 2013).

Apesar das inúmeras atividades biológicas já descritas para OEZz e zerumbona, estudos sobre a atividade de *Z. zerumbet* sobre o sistema cardiovascular ainda são escassos, de forma que não há trabalhos descrevendo sua ação sob os vasos sanguíneos. A elucidação dos mecanismos pelos quais os integrantes desta família produzem efeitos sobre o músculo liso vascular ainda precisam ser melhor investigados.

A busca de novos fármacos que produzam manutenção do tônus vascular e inibição de eventos inflamatórios e oxidativos, sobre os tecidos, podem elucidar novos recursos terapêuticos capazes de se contrapor às manifestações deletérias

das DCV e produzir benefícios de redução de morbidade e mortalidade que possuem grande impacto na qualidade de vida de indivíduos com esta patologia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith sobre o metabolismo, funções vascular, renal e seu potencial antioxidante/anti-inflamatório em ratos Wistar.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fitoquimicamente o óleo essencial obtido dos rizomas de *Z. zerumbet* (OEZz)

2. Avaliar o efeito de OEZz e de seu componente majoritário, zerumbona, sobre a reatividade vascular aórtica em ratos Wistar

3. Avaliar o efeito da administração por via oral de OEZz sobre a pressão arterial e metabolismo corporal em ratos Wistar

4. Avaliar os efeitos da administração por via oral de OEZz sobre os parâmetros de função renal de ratos Wistar

5. Observar os efeitos da administração por via oral de OEZz sobre a aorta e rim de ratos Wistar

6. Avaliar a atividade anti-inflamatória de OEZz e zerumbona em cultura de macrófagos estimulados com LPS

7. Avaliar o potencial antioxidante de OEZz e zerumbona sobre fibroblastos humanos em cultura

8. Avaliar a toxicidade de OEZz e de zerumbona sobre células endoteliais (HUVECs) e células do músculo liso vascular (CMLV)

4. METODOLOGIA

4.1. Produção e caracterização do óleo essencial de *Z. zerumbet* e zerumbona

Para obtenção e caracterização das substâncias testadas neste trabalho, isto é, OEZz e zerumbona, seguimos os seguintes protocolos.

4.1.1. Obtenção de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith

Para este estudo foram utilizados os rizomas de *Zingiber zerumbet* (Figura 4A). Os mesmos foram coletados na área rural do Amazonas em dezembro de 2015 no município de Iranduba/AM (S 03°17'05" – L 60°11'10" W), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro (INPA). A exsicata do material encontra-se depositada no herbário do INPA sob o registro nº186913, catalogada pelo Prof. Dr. Paul Maas (Departament of Plant Ecology and Evolucionary Biology, University of Utrecht) (Figura 4B e C).

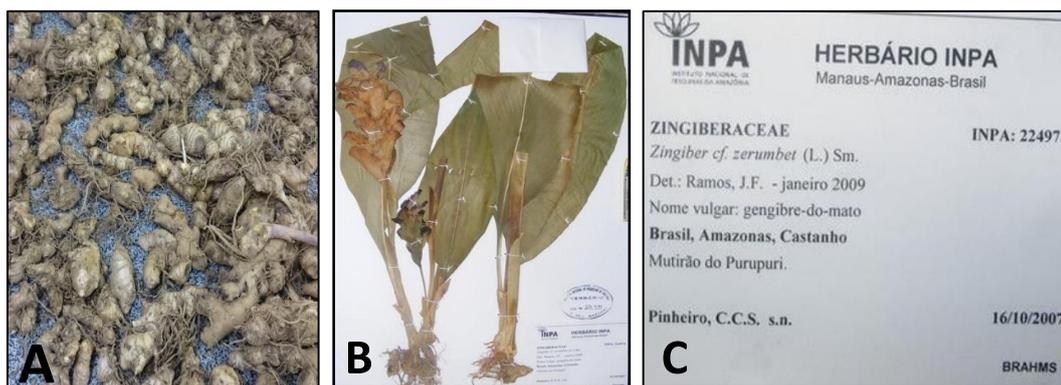


Figura 4: *Zingiber zerumbet*: (A) Rizomas utilizados para extração do óleo essencial (Fonte: Anne Graça, 2015),(B) Exsicata e (C) Registro de exsicatas armazenadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Fonte: Carlos Pinheiro, 2005).

4.1.2. Higienização, trituração e secagem

Os rizomas foram higienizados e descascados em água corrente em descascador de batatas industrial (DB-06-N Siemens). Em seguida foi realizada trituração em processador de alimentos (Philips Walita RI1861) e liquidificador (Walita RI2048). O triturado resultante foi espalhado em bancada de mármore forrada com papel jornal para secagem em ambiente com ar condicionado sob a temperatura de 17 a 19°C por 48h.

4.1.3. Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial a partir dos rizomas foi realizada pelo método de hidrodestilação (AOAC, 2000). Para este processo, foi utilizado o aparelho de destilação de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo (2L) o qual foi acomodado em manta aquecedora e conectado a condensador ligado a refrigerador por circulação de água (Figura 5A). Foram pesados 250g de material seco em balança digital (Urano US20/2 POP-S) e transferidos para balão de fundo redondo, adicionando-se 2L de água. A temperatura, controlada por termostato, era elevada a 100°C e posteriormente reduzida para 80°C. O tempo de extração foi de 4h, contado a partir do início da ebulição. A fase aquosa dos volumes obtidos diretamente no aparelho de Clevenger eram minuciosamente eliminada, visto que isso é possível pela diferença de densidade da água e do óleo obtidos no processo de destilação (Figura 5B). O rendimento da produção do óleo essencial foi expresso em percentagem em relação ao peso de material vegetal seco utilizado, sendo de 6% (6ml/100g). Após este processo, o óleo essencial foi centrifugado e secado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para eliminação total da umidade (SILVA et al., 1995). Em seguida, foram armazenados em frascos âmbar e acondicionados a 4°C.

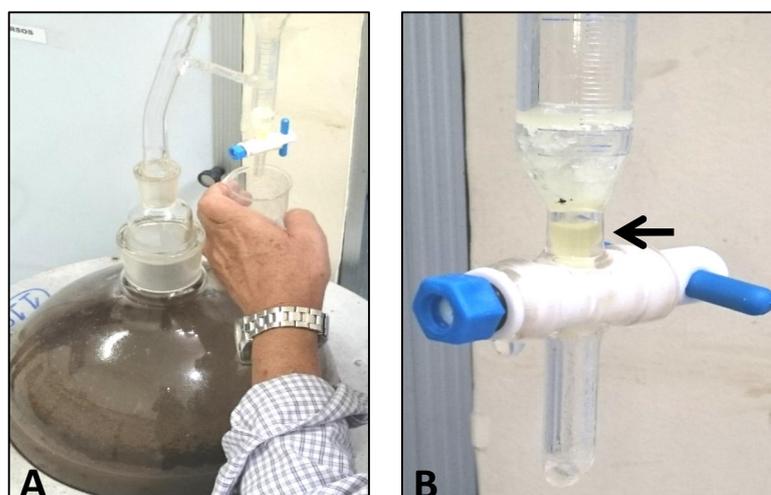
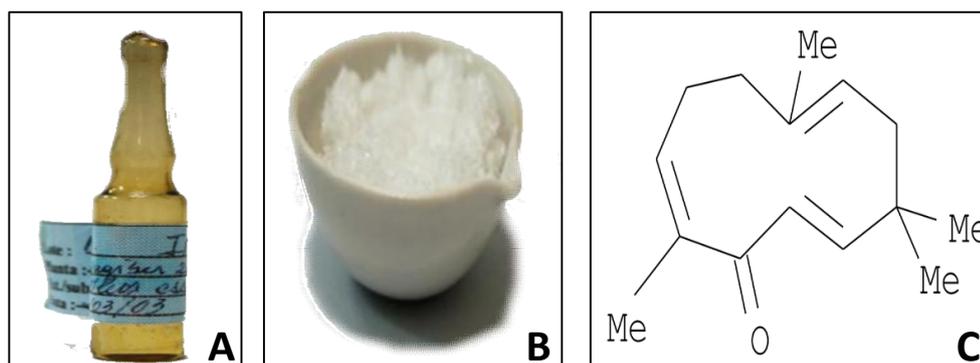


Figura 5: Produção do óleo essencial obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet*: (A) Aparelho de destilação Clevenger acoplado a balão de 2L para realização do processo de hidrodestilação. (B) Fases formadas pela diferença de densidade da água e do óleo (indicado pela seta) obtidos no processo de hidrodestilação.

4.1.4. Obtenção dos cristais de zerumbona

A extração de zerumbona foi realizada a partir do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet*. A partir da extração do óleo, a zerumbona passou pelo processo de recristalização, dando origem a cristais (Figura 6) com ponto de fusão 65-65,7°C, densidade: $0,887 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$ e grau de pureza de 97%. O método de produção quantitativo e qualitativo na obtenção de zerumbona está patenteado pelo Dr. Carlos Cleomirde Souza Pinheiro (PI 0505343-9).



Fonte: Carlos Pinheiro, 2015.

Figura 6: Produção de zerumbona: (A) OEZz obtido por arraste-hidrovapor. (B) Cristais de zerumbona obtidos pela recristalização do OEZz. (C) Estrutura química da zerumbona (2,6, 9,9-tetrametil-cicoundeca-2-6,10-trienona).

4.1.5. Caracterização do OEZz por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS)

A amostra de 1 μL de OEZz foi diluída em 1 mL de diclorometano para ser injetada no cromatógrafo Shimadzu, modelo QP2010MS. O espectrômetro de massas realizou as análises no modo scan (40-600 m/z). Utilizou-se coluna capilar (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) com fase estacionária composta de 5% de fenil-metilpolisiloxano e gás hélio como fase móvel (White Martins Gases Industriais, 99,9% de pureza). A programação que possibilitou a resolução cromatográfica dos picos de interesse foi na seguinte condição de análise: Temperatura inicial da coluna: 60 °C, Temperatura final da coluna: 240°C, Temperatura do injetor: 250 °C. Para identificação dos constituintes, além da comparação com a literatura (BHUIYAN, 2008; DAI, 2013; SINGH, 2014; RANA, 2017) foram utilizadas duas bibliotecas (intrínsecas do equipamento NIST107 e

NIST21) que possibilitaram a comparação dos dados dos espectros obtidos com aqueles pré-existentes nas bibliotecas.

4.1.6. Caracterização de Zerumbona por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O cromatógrafo Alliance, modelo E2695 foi utilizado para quantificação de zerumbona nos cristais obtidos a partir do OEZz. Os sinais captados pelo cromatógrafo foram processados pelo software Empower (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna analítica utilizada foi C18 (simetria, 250 x 4,6 mm de ID e tamanho de partículas de 5µm). A fase móvel foi composta de acetonitrila:metanol:tampão fosfato de di-hidrogênio de potássio 0,001% (pH:6) em uma proporção de 25:55:20 (v/v/v), sob temperatura ambiente. O eluído foi monitorado por detector PDA a uma taxa de fluxo de 1 mL/min em comprimento de onda de 254 nm. A quantificação foi determinada comparando-se as áreas de picos das amostras.

4.2. Viabilidade celular por MTT

Para assegurar a viabilidade do tratamento com diferentes concentrações do OEZz, foi executado o protocolo de viabilidade celular pelo método do MTT.

O teste de MMT baseia-se na atividade mitocondrial das células pelo método de redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT em formazan (MOSMANN, 1983; MORGAN, 1998). O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro. Dessa forma, utilizou-se 2×10^4 células endoteliais, de músculo liso vascular, fibroblastos ou macrófagos/poço e 200 µL de meio de cultivo (contendo 10% de soro fetal bovino) em microplacas de 96 poços. Após 24h de incubação a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultivo foi removido dos poços e um novo meio contendo concentrações crescentes de OEZz (10^{-3} – 10^3 µg/mL) foi adicionado aos testes com células endoteliais e do músculo liso vascular. Para os testes com fibroblastos foram utilizadas as concentrações de OEZz e Zer (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 µg/mL) e para os testes com macrófagos, OEZz e Zer (25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 µg/mL). Foram utilizados três poços da microplaca para cada concentração das

substâncias diluídas em meio de cultivo, dois poços apenas com o meio para controle de viabilidade e dois poços com 200 µL de triton X-100 1% para controle de morte. As microplacas foram incubadas por 4h no escuro a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% em cada poço. Logo após, a análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de ELISA a uma absorvância de 600 nm.

4.3. Animais

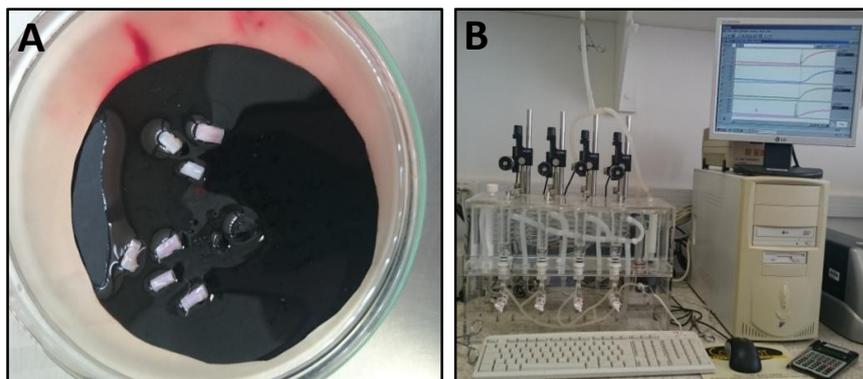
Para avaliar o efeito sistêmico da administração de OEZz foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e mantidos em seu Biotério Central. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas convencionais de polipropileno, em ciclo claro/escuro (12h/12h), a uma temperatura de 25°C. Cada gaiola continha dois ratos com suprimento de água e ração *ad libitum*. Para os experimentos, utilizaram-se animais de 180-200g. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia Experimental – ICB/UFAM, Laboratório de Morfologia Quantitativa – ICB/UFAM, Laboratório de Atividade Biológica – FCF/UFAM, Laboratório de Farmacologia e Química de Produtos Naturais – INPA e no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Este projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFAM) sob o protocolo nº 001/2015.

4.3.1. Reatividade vascular

Para avaliar a ação local do OEZz e zerumbona foram realizados protocolos de reatividade vascular aórtica, considerando os efeitos diretos de OEZz e Zer e suas influências na resposta vasodilatadora para acetilcolina e nas respostas vasoconstritoras induzidas por fenilefrina e KCl (FURCHGOTT, 1980; MENEZES, 2007).

Após a determinação da pressão arterial indireta (ver item 5.4.10), para a confirmação dos níveis pressóricos, os ratos normotensos foram anestesiados com isoflurano e sacrificados por decapitação. A aorta torácica foi isolada, seccionada em anéis com 4mm e montada em sistema de reatividade vascular

para registro de força isométrica (transdutor isométrico Panlab, acoplada a PowerLab 8/35 e LabChartPro) (Figura 7a). As preparações foram mantidas em cuba para órgão isolado contendo solução de Krebs sob gaseificação com mistura carbogênica (95%O₂ e 5%CO₂) a 37°C (Figura7b). Foram utilizadas preparações com endotélio e preparações cujo endotélio vascular foi removido mecanicamente.



Fonte: Anne Graça, 2015.

Figura 7: Reatividade vascular: (A) Anéis aórticos (4mm). (B) Banho de órgão isolado acoplado ao sistema de reatividade vascular para registro de força isométrica.

4.3.1.1. Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina

Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1,5g, reajustado quando necessário durante o período de estabilização de uma hora. Após o período de estabilização, foi adicionado a EC₅₀ da fenilefrina (10⁻⁷M) nas cubas para verificar a atividade contrátil, verificando assim, a viabilidade do músculo liso vascular, utilizaram-se os anéis que promoveram uma variação maior ou igual a 1g de contração a partir do seu valor basal.

Após, foi realizada a troca da solução de Krebs das cubas até retornar a tensão de repouso. Esse processo foi repetido três vezes, tempo necessário para que se atingisse um platô no registro da contração. Posterior a esse platô, os anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

4.3.1.2. Avaliação da integridade funcional do endotélio

A integridade do endotélio foi verificada pela presença de respostas vasodilatadoras para acetilcolina (10^{-6} M) em preparações pré-contraídas com a EC_{50} da fenilefrina (10^{-7} M), depois de assegurado a viabilidade dos anéis. O endotélio vascular foi considerado íntegro nos anéis com relaxamento igual ou superior a 80% da contração induzida pela fenilefrina. Para os testes com anéis sem endotélio, a efetividade da remoção do endotélio vascular foi demonstrada pelo relaxamento igual ou inferior a 20% da contração promovida pela fenilefrina.

4.3.1.3. Protocolos experimentais

4.3.1.3.1. Avaliação da resposta vascular ao efeito de concentrações crescentes de OEZz e Zer

Posterior a realização do teste de integridade do endotélio, os anéis foram lavados com solução de Krebs para que retornassem à tensão basal. Após, foram contraídas com a EC_{50} da fenilefrina (10^{-7} M) ou o análogo de tromboxano, U46619 (10^{-7} M) e expostos a concentrações crescentes (10^{-3} – 10^3 μ g/mL) do OEZz ou de Zer para avaliar o efeito dessas substâncias a reatividade vascular. Este protocolo foi feito para anéis com endotélio e sem endotélio.

4.3.1.3.2. Avaliação do efeito de OEZz e Zer sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina

Após a estabilização dos anéis, cada preparação foi incubada por 20 minutos com 500, 750 ou 1000 μ g/mL do OEZz ou 1000 μ g/mL de Zer. Em seguida, foram acrescentadas concentrações crescentes de Phe (10^{-10} – 10^{-5} M) para realização da curva concentração-efeito, visando avaliar o efeito das substâncias sobre a vasoconstrição.

4.3.1.3.3. Avaliação do mecanismo de bloqueio da vasoconstrição induzida por fenilefrina ou KCl em preparações incubadas com OEZz ou Zer

Anéis aórticos desprovidos de endotélio foram estabilizados em Krebs Normal. Após, foram incubados com Krebs sem Ca^{2+} , iniciando o protocolo para avaliar a vasoconstrição promovida pelo influxo de Ca^{2+} . A seguir foi adicionado

ao meio o ácido etilenoglicol-bis(b-amino-etil-eter)N,N,N9,N9-tetra-acético (EGTA) (1mM/L), um quelante dos íons de Ca^{2+} , permanecendo por 20 minutos.

Em seguida, adicionou-se Phe (10^{-7}M) e observou-se a presença de vasoconstrição. O processo foi repetido até que a vasoconstrição fosse abolida, indicando depleção completa das reservas de cálcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Na sequência, as preparações foram incubadas por 30 minutos com OEZz ou Zer 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentração máxima responsável pela abolição da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina) e adicionou-se concentrações crescentes de CaCl_2 (0,01 – 30 mM/L).

Para investigar se os efeitos inibitórios de OEZz sob as respostas vasoconstritoras seriam por meio do bloqueio de canais para cálcio, os quais necessitam ser ativados nas células do músculo liso vascular em resposta à fenilefrina, utilizou-se um protocolo similar ao descrito a cima. Após a depleção de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e posterior incubação com OEZz ou Zer (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi acrescentado KCl (60mM/L) em substituição à fenilefrina.

4.3.1.4. Análise estatística

Curvas concentração-efeito foram submetidas à análise de regressão não linear, para obtenção de valores de EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) e resposta máxima ($E_{\text{máx}}$). As análises destes parâmetros foram realizadas pelo programa Prisma, versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), bem como para a construção das curvas sigmóides. Foram utilizados teste “t”, análise de variância de uma via (One-way ANOVA) ou análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância mínima aceitável foi de $p < 0,05$.

4.4. Avaliação da atividade do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber zerumbet* sob a função vascular, renal e metabolismo de ratos Wistar

Para avaliação do efeito sistêmico do tratamento com OEZz sob órgãos alvo como aorta e rim, foram seguidos os seguintes protocolos.

Os animais receberam durante 21 dias, diferentes doses (50mg/Kg e 100mg/Kg) do óleo essencial por via oral (gavagem). Animais controle receberam o mesmo volume de veículo. A pressão arterial sistólica foi avaliada

semanalmente, antes e após o início do tratamento (Ver item 4.3.3.3). Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos descritos a seguir:

- Grupo controle: 3 ratos tratados com NaCl 0,9% por 21 dias, via oral (VO).
- Grupo tratado A: 6 ratos tratados com dose de 50mg/Kg/dia do óleo essencial, VO.
- Grupo tratado B: 6 ratos tratados com dose de 100mg/Kg/dia do óleo essencial, VO.

4.4.1. Gaiola metabólica

Para avaliar parâmetros metabólicos, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas por um período de quatro dias consecutivos, permanecendo na gaiola 16h por dia, recebendo água e ração *ad libitum*. O primeiro dia na gaiola metabólica foi para habituação, de modo que não foram computados dados de consumo e as urinas foram desprezadas. Nos três dias seguintes o consumo de ração e água e as urinas foram coletadas e processadas como descrito a seguir. A média dos três dias destes parâmetros foi calculada por animal e as amostras de urina de cada coleta foram utilizadas em duplicata nos ensaios bioquímicos.

Como os ratos são animais de hábito noturno, os mesmos foram colocados nas gaiolas às 16h e retirados às 08h do dia seguinte. O período na gaiola não pode ser superior por orientação do Biotério Central, dada as dimensões das gaiolas utilizadas e o tamanho dos animais.

4.4.2. Coleta de sangue para análise bioquímica

Para coleta de sangue, feita após o tratamento, isto é, dia 22, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. O sangue foi coletado em tubo heparinizado pelo método de punção intracardíaca após abertura da cavidade torácica, a qual foi utilizada como método de eutanásia complementar. Uma vez coletado, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos (Sorvall, Suwanee, EUA). O plasma foi isolado e acondicionado em tubos criogênicos (QUARESMA, 2003). As amostras foram

mantidas sob refrigeração (-20°C) até o momento da análise. A aorta e o rim direito foram dissecados para as análises histológicas.

4.4.3. Análise do metabolismo corporal

4.4.3.1. Consumo de água e ração

O monitoramento do consumo de ração foi realizado por meio de aferições diárias, onde o consumo foi calculado considerando a ração fornecida, os desperdícios e as sobras. Foram utilizados comedouros individuais e ração triturada, a qual era pesada em balança digital antes de serem postas na gaiola. O mesmo procedimento foi realizado para o registro do consumo diário de água, utilizando-se bebedouros individuais volumetricamente graduados. O consumo de água e fluxo urinário foram determinados por gravimetria, considerando 1g = 1mL. E, após as 16h de permanência na gaiola, as urinas dos ratos foram coletadas, pesadas e aliqüotadas. Todas as amostras de urina foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos em centrífuga automática (Sorvall, Suwanee, EUA) sendo o sedimento desprezado. Um mililitro de cada amostra foi acondicionado em tubos e mantido a -8°C para posterior avaliação.

4.4.3.2. Peso corporal

O peso corporal foi acompanhado semanalmente a partir do início do tratamento (Dia 1) até o último dia (Dia 21), com uso de balança comercial (Digimed, KN1000).

4.4.3.3. Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS)

Para avaliar a ação do OEZz sob a pressão arterial sistólica dos animais tratados, foram executadas, semanalmente, aferições pelo método de plestimografia de cauda (MALKOFF, 2005).

Iniciaram-se as medidas após a primeira semana de adaptação. A técnica consiste em colocar o animal dentro de uma caixa restritora, aquecida o suficiente para vasodilatar a artéria caudal. Um esfigmomanômetro (adaptado para ratos) acoplado a um transdutor de pulso (sensor) foi colocado na cauda do animal. Quando acionado o plestimógrafo (LE5001; Panlab, Barcelona, Espanha), o esfigmomanômetro era insuflado até que o fluxo sanguíneo fosse ocluído, para

que, ao ser desobstruído, os primeiros picos de PAS fossem captados pelo transdutor e registrados pelo plestimógrafo. A pressão arterial diastólica, pressão arterial média e o número de batimentos por minuto também foram registrados.

4.4.3.4. Avaliação de perfil lipídico

Para análise de perfil lipídico, os seguintes testes foram realizados e suas absorbâncias foram lidas de 490 a 510nm em analisador automático de bioquímica (ChemWell-BIO):

- **Colesterol total:** A determinação do colesterol total plasmático foi realizada, utilizando-se o kit enzimático colorimétrico, da In Vitro Diagnóstica (CAT 10017) (ALLAIN et al., 1974).

- **Colesterol HDL (High Density Lipoprotein, Lipoproteína de alta densidade):** A determinação de HDL no plasma foi definida pelo sistema de precipitação de proteínas, utilizando o kit enzimático da empresa In Vitro Diagnóstica (CAT 044) (ALLAIN et al., 1974).

- **Colesterol LDL (Low Density Lipoprotein, Lipoproteína de baixa densidade):** Como descrito por Bachorik e colaboradores (1999), os níveis de LDL foram calculados pela fórmula de Friedewald, onde:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{Colesterol HDL} + \text{VLDL})$$

- **Colesterol VLDL (Very Low Density Lipoprotein, Lipoproteína de muito baixa densidade):** Os níveis de VLDL foram calculados utilizando a fórmula (FRIEDEWALD et al., 1972; BACHORIK et al., 1999):

$$\text{Colesterol VLDL} = \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

- **Triglicerídeos:** A concentração de triacilgliceróis plasmáticos foi realizada utilizando-se o kit enzimático colorimétrico da In Vitro Diagnóstica (CAT 10724) (FOSSATE e PRINCIPE, 1982).

4.4.4. Avaliação de parâmetros de função renal

4.4.4.1. Índice de peso renal, fluxo renal e ritmo de filtração glomerular

Para averiguar o índice de peso renal, após a eutanásia dos animais, o rim direito e tibia foram dissecados. Registrou-se o comprimento da tibia e o peso do rim direito. O índice de peso foi calculado pela relação deste, com o comprimento da tibia. Onde: Índice de peso (g/cm) = [peso renal (g) / comprimento da tibia (cm)] (CERQUEIRA, 2012).

O fluxo urinário foi determinado a partir do volume de urina coletado no período de 16h (L). Os resultados foram expressos em L/Kg/24h.

O ritmo de filtração glomerular (ml/Kg/min) foi estimado pela depuração da creatinina endógena (ver item 4.4.4.2).

4.4.4.2. Avaliação de marcadores de função renal

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras plasmáticas ou urinárias, utilizando um analisador automático de bioquímica (ChemWell-BIO). Os seguintes testes foram realizados:

- **Sódio:** A quantificação de sódio na urina foi determinado pelo kit BioVision. Para isso, adicionou-se 200µL de urina a 2mL do reagente colorimétrico do kit. Após a reação, as absorbâncias foram determinadas a 405nm.
- **Albumina:** A concentração de albumina foi determinada pelo kit Doles, onde 10µL de plasma foram adicionados a 2,5mL do reagente colorimétrico do Kit. Após 15 minutos, as absorbâncias foram determinadas a 630nm.
- **Creatinina:** Para determinar a concentração de creatinina no plasma ou na urina utilizou-se o kit Doles. Segundo as recomendações dadas pelo fabricante, foi utilizado 200µL de amostra animal, acrescidos de 2mL de água destilada, 0,5mL de reagente pícrico e duas gotas de solução alcalina. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as absorbâncias foram lidas a 520nm.

- **Uréia:** A determinação da concentração de uréia no plasma ou na urina foi realizada através de um método enzimático colorimétrico (LaborLab). Neste método, a uréia sofre hidrólise pela urease em íons amônia e CO_2 . Em meio alcalino, os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, para formar indofenol. A absorbância deste complexo formado a 600nm é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.

4.4.5. Coleta, processamento e volumetria dos órgãos

Ao final do período de tratamento os animais foram anestesiados com cetamina/xilasina e eutanasiados por decaptação. A aorta torácica, os rins e a tibia foram isolados e removidos. O comprimento da tibia foi medido com o auxílio de um paquímetro. Os rins e a aorta foram fixados em formol tamponado (10%) por 48h (Figura 8). Antes da fixação, o peso úmido dos rim direito foi mensurado em balança analítica (Shimadzu AY220, Japão).

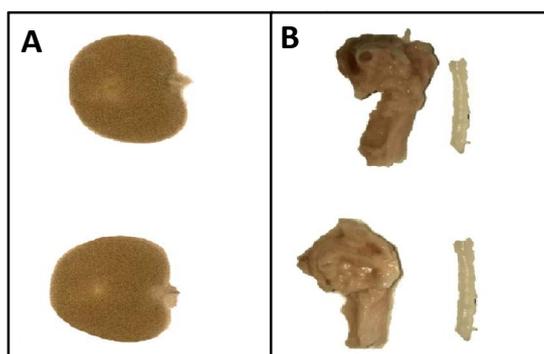


Figura 8: Órgãos fixados: (A) Rins direito fixados em formol tamponado (10%). (B) Aorta torácica isolada e fixada, desnuda (à direita), isto é, desprovida do tecido adiposo perivascular, o qual estava presente na imagem à esquerda.

Fonte: Anne Graça, 2016.

Para determinação do volume absoluto dos órgãos, com auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) para o rim e de microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Câmera digital Leica DFC295, Programa LAS) para a aorta, foram obtidas seções seriais dos órgãos para que a partir de sua análise se obtivesse o volume determinado pelo princípio de Cavalieri (HOWARD e REED, 2010).

4.4.6. Estereologia

Amostras de rim e aorta foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), pré-infiltradas com 96% etanol/resina plástica e infiltradas com resina plástica - glicol metacrilato. Em seguida, o rim foi seccionado ao meio

e cada metade disposta com sua face seccionada voltada para o plano da mesa (plano horizontal). Cada metade foi girada em relação ao eixo vertical perpendicular ao plano horizontal seguindo um sistema de ângulos sorteados ao acaso. A posição aleatória obtida foi marcada no rim e mantida durante o processo de inclusão. A aorta foi seccionada aleatoriamente em duas partes, de forma a manter um corte transversal. Esse procedimento permite a obtenção de seções com elevada variabilidade na disposição dos perfis de estruturas, garantindo redução no viés de amostragem. As seções obtidas são chamadas de verticais (BADDELEY et al., 1986). Em seguida, cada bloco foi observado em estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e o comprimento total dos órgãos, incluído na resina, foi medido e dividido por 8 ou 12, conforme o comprimento do órgão. O resultado obtido representou a distância entre as seções seriais a serem obtidas em cada órgão. Essa distância foi marcada em sequência ao longo do bloco de resina e serviu de orientação para a microtomia que foi realizada em um micrótomo (Leica RM 2145, Alemanha). As seções foram posteriormente coradas com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12g; borato de Na⁺, 0,5g; H₂O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5g e H₂O destilada, 100 mL). Todos os procedimentos adotados para o processamento histológico estavam de acordo com Kiernan (1999).

4.4.6.1. Determinação de Volume (Cavalieri)

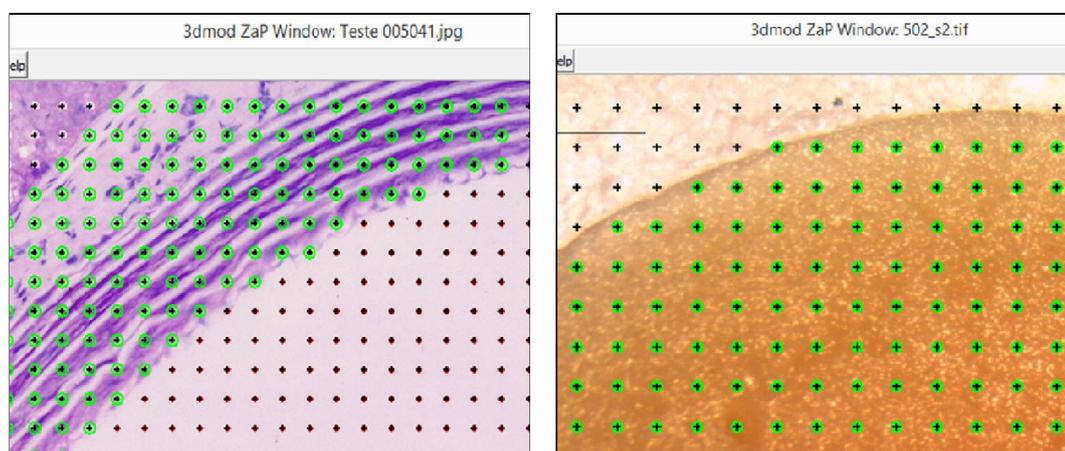
O princípio de Cavalieri (CAVALIERI) foi empregado para a determinação do volume total dos órgãos. Esta técnica está fundamentada em robusta análise matemática e estatística e é extremamente eficiente (WEIBEL, 1980; GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD e REED, 2010; MOUTON, 2011). Originalmente, o volume de qualquer estrutura é obtido pelo produto do somatório das áreas das seções pela distância entre as seções. Com o avanço dos sistemas de contagens, como o software *Imod*, a sobreposição de pontos gerados pelo software sob a estrutura de interesse, passou a ser o referencial de contagem. Este método permite uma quantificação com praticidade e eficiência (GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD, V.; REED, M. G., 2010).

Esta técnica foi empregada para determinação precisa e acurada do volume. Para tal, as seções foram digitalizadas através de um estereomicroscópio ou microscópio óptico com sistema de captura de imagem (Leica EZ4D ou

LeicaDM4000 Digital System, Alemanha) e sobre cada seção foi sobreposto um sistema teste de contagem contendo pontos por meio do software *Imod* versão 4.7/módulo *stereology* (KREMER *et al.*, 1996) (Figura 9). A análise consiste em contar os pontos que tocam os respectivos órgãos como mostrado na Figura 8. O somatório de pontos em cada órgão foi aplicado na seguinte equação:

$$V = \sum_{i=1}^m P_i \cdot \frac{a}{p} \cdot T$$

Onde, V é o volume absoluto do órgão, $\sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre cada órgão, a/p é a área representada por cada ponto e T é a distancia entre cada seção. Um coeficiente de erro de 5% e desvio padrão de 15% foram considerados aceitáveis (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981; GUNDERSEN *et al.*, 1988). Visto que as contagens nas seções seriais em um órgão representam eventos dependentes, não podemos aplicar as equações convencionais para a determinação das medidas de dispersão. Para tal, um conjunto de determinações estatísticas voltados para eventos dependentes foi aplicado (GUNDERSEN e ØSTERBY, 1981; MAYHEW, 1991; HOWARD e REED, 2010).



Fonte: Anne Graça, 2017.

Figura 9: Sistema de contagem contendo pontos por meio do software *Imod* versão 4.7/módulo *stereology*. A esquerda uma seção de aorta, onde os pontos são diferenciados em: vermelho quando tocam o lúmen, em verde se tocam a parede vascular e em branco se estão sob o tecido perivascular. À direita, tem-se uma seção de rim, onde os pontos verdes indicam estar sob o tecido renal.

4.4.6.2. Determinação do Volume Relativo (Delesse)

A porcentagem de cada componente interno foi obtida pelo princípio de Delesse (densidade de volume) (HOWARDe REED, 2010). Um aumento de 400x foi empregado em campos de vista selecionados aleatoriamente. Os componentes foram quantificados pela contagem de pontos e referenciados em relação ao volume total do órgão. A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (órgão) foi calculada como:

$$Vv (\text{componente} , \text{espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde **Vv** é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa), *P_{comp}* é o somatório de pontos sobre os componentes do órgão (Aorta: parede, lúmen, tecido adiposo perivascular, túnicas íntima, média e adventícia. Rim: corpúsculo renal – cápsula de Bowman, espaço de Bowman, capilares glomerulares e células glomerulares – capilares peritubulares e túbulos renais) e *P_{ref}* é o somatório de pontos que tocam o espaço de referência (Rim ou Aorta) ((HOWARDe REED, 2010) . Os valores percentuais foram transformados em absolutos após multiplicação pelo volume de Cavalieri.

4.4.6.3. Análise estatística

O programa estatístico Prisma, versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os resultados foram analisados por meio de one-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls quando apropriado. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%. Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (*C.E.*) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com (CRUZ-ORIVE, 1999):

$$CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right) = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)^{3/2}} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)$ indica o coeficiente de erro para a determinação do volume;

$\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância das áreas transversais (*shapecoefficient*) e depende da complexidade das formas da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^n Pi$ o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da densidade de volume e de superfície foi estimado de acordo com (ORIVE, 1980) usando a equação:

$$CE(Rv) = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE(Rv)$ indica o coeficiente de erro para a determinação da relação superfície-volume ou densidade-volume; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções ou pontos efetuadas. Um $CE \leq 10\%$ será considerado satisfatório (preciso).

4.5. Avaliação da ação anti-inflamatória

Para investigar o potencial anti-inflamatório do OEZz e de zerumbona, foram executados testes em macrófagos murinos da linhagem J774A.1 com avaliação da produção de óxido nítrico (NO), um reconhecido mediador inflamatório (CRUZ, 2001).

Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células/poço em placa de 96 poços. Após o plaqueamento as células permaneceram por 24h na estufa para aderência à placa, condicionadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24h o meio foi retirado e adicionado meio RPMI, suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino, com volume final de 100 μL /poço. A seguir as células

foram estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e tratadas com diferentes concentrações dos compostos OEZz e Zer (3.12, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/mL). Como controle positivo utilizou-se meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS. As células foram incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico - NO·.

4.5.1. Quantificação de nitrito

Para mensurar a produção de óxido nítrico (NO·), realizou-se a dosagem de nitrito, seu produto de degradação, utilizando o reagente de Griess, uma vez que o NO é um gás de curta duração. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo estável de coloração púrpura para assim ser quantificado em espectrofotômetro a 550 nm (GREEN et al., 1982). Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50 µL do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil). Para o preparo destes reagentes foram utilizadas soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% dissolvido em água destilada e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico (H₃PO₄) a 5%. Anteriormente ao uso as soluções foram adicionadas na proporção 1:1 formando o reagente de Griess. Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, BeckmanColter) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio (NaNO₃) 15µM até 1000µM.

4.6. Avaliação da atividade antioxidante celular

A produção de EROs intracelular foi detectada utilizando o composto fluorescente 2'7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), segundo a metodologia descrita por Wolfe e Liu (2007), com modificações. O DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares que retiram sua fração diacetato (-DA) deixando a diclorofluoresceína fluorescente (DCFH) livre no meio. Em contato com EROs, o DCFH é oxidado resultando no composto fluorescente, 2'-7'-DCF.

Nesta técnica foram utilizados fibroblastos da linhagem MRC-5 que foram semeados a uma concentração de 6×10^4 células/poço em microplaca de 96 poços com 100µL de meio de cultivo. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio de cultivo foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foi preparada uma solução a 25 µM de DCFH-DA dissolvido em tampão de Hank's e o OEZz e a zerumbona foram adicionados juntamente com essa solução nas concentrações 100, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/mL. Foram adicionados aos poços 100µL dessa solução e incubados por 60 minutos a 37°C e CO₂ a 5%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi preparada uma solução de dicloridrato de 2,2-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH), um gerador de radicais livres, a 600µM dissolvida em tampão de Hank's. Adicionou-se 100µL dessa solução aos poços e em seguida foi realizada a leitura da placa com fluorescência mesurada imediatamente tendo como comprimento de onda de excitação a 485nm e de emissão de 520nm durante 60min em intervalos de 5min. Os controles com e sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. Para controle positivo utilizou-se o antioxidante quercetina. Todos testes foram realizados em triplicatas.

5. RESULTADOS

5.1. Testes de viabilidade celular (MTT)

Avaliamos o potencial citotóxico, *in vitro*, de concentrações crescentes de OEZz (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) sobre células endoteliais (HUVECs) (Figura 10) e células primárias do músculo liso vascular (CMLVs) de ratos Wistar (Figura 11). Em conjunto, realizou-se o teste para o veículo do OEZz, isto é, DMSO (7×10^{-1} – $7 \times 10^{-7}\%$) e salina, na mesma concentração que usamos para diluir as concentrações do OEZz. Em todas as concentrações testadas não se observou efeito citotóxico às HUVECs e CMLVs, de maneira que em todas as concentrações utilizadas a viabilidade celular foi igual ou maior que 100%, corroborando o que foi visto por Picoli (2015) que aponta que 2,5% de DMSO é a máxima concentração que não causa prejuízos para o crescimento celular.

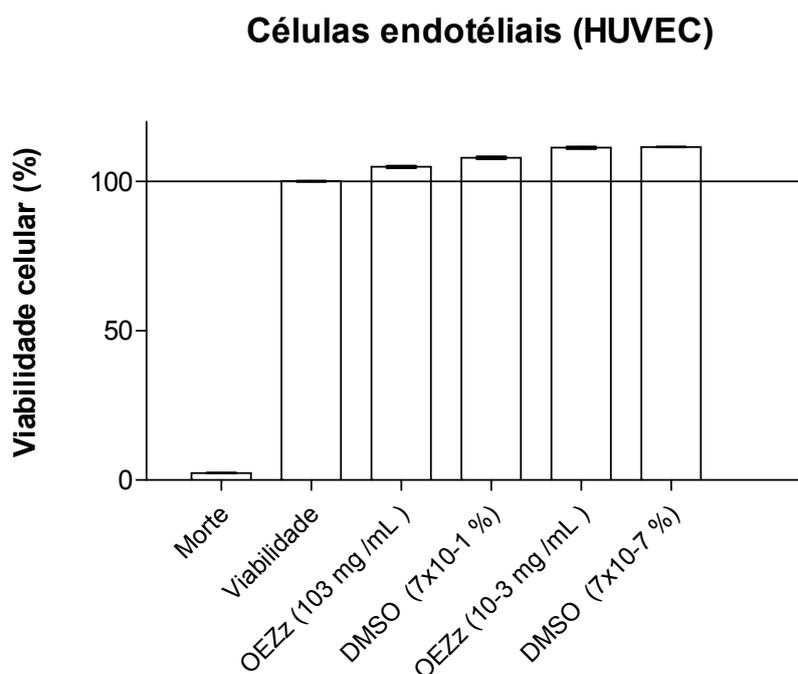


Figura 10: Viabilidade celular de células endoteliais (HUVEC) pós incubação com concentrações crescentes (10^{-3} - 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).

Células de músculo liso vascular

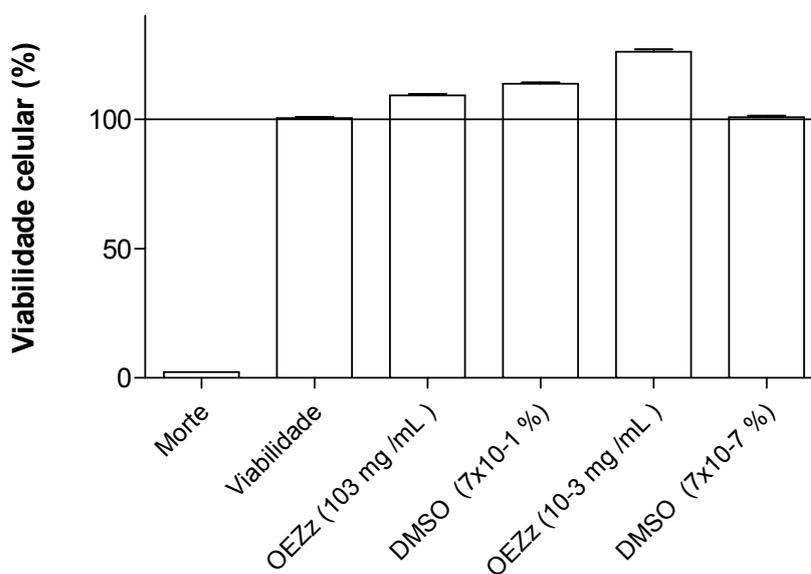


Figura 11: Viabilidade celular de células do músculo liso vascular de ratos Wistar pós incubação com concentrações crescentes (10^{-3} - 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou veículo (DMSO + salina) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio).

Dessa maneira, a faixa de concentração de OEZz (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou-se segura e foi selecionada para utilização nos experimentos seguintes.

Para os fibroblastos de linhagem MRC-5, as concentrações usadas de zerumbona e OEZz foram de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$. Nestas concentrações, a viabilidade celular foi mantida, não sendo apresentada nenhuma concentração que apresentasse citotoxicidade neste modelo. Revelando-se ser uma faixa de concentração segura para os testes posteriores. Não foram realizados testes com o veículo (DMSO), uma vez que na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), o mesmo estava dentro da faixa de segurança, sendo 0,01% (Figura 12) (PICOLI, 2015).

Nos testes realizados com macrófagos murinos da linhagem J774, foram utilizadas as concentrações de OEZz e Zer de 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.390 $\mu\text{g/mL}$. Nestes, observou-se uma redução de 20% na viabilidade celular para a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ para as duas substâncias. Nas demais concentrações, a viabilidade celular foi igual ou maior que 100%. Para estas

concentrações, a maior porcentagem de DMSO no veículo foi de 0,0025% (Figura 13). Assim, para os testes seguintes foram utilizadas, apenas, as concentrações 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.390 $\mu\text{g/mL}$, posto que estas não demonstrarem nenhuma ação citotóxica.

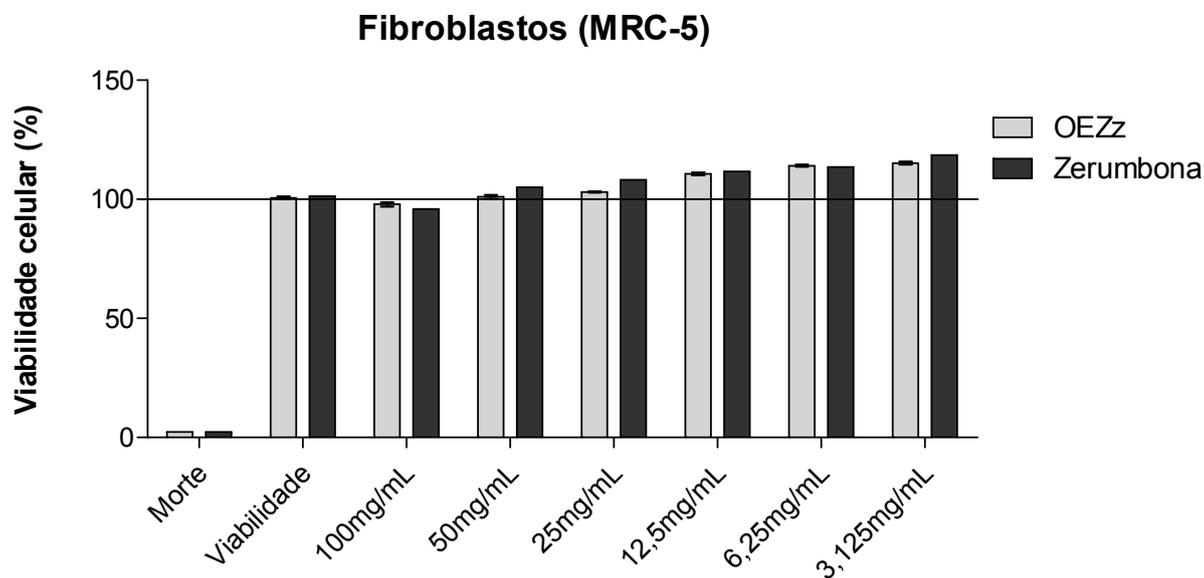


Figura 12: Viabilidade celular de fibroblastos da linhagem MCR-5 pós incubação com concentrações de OEZz ou Zer (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).

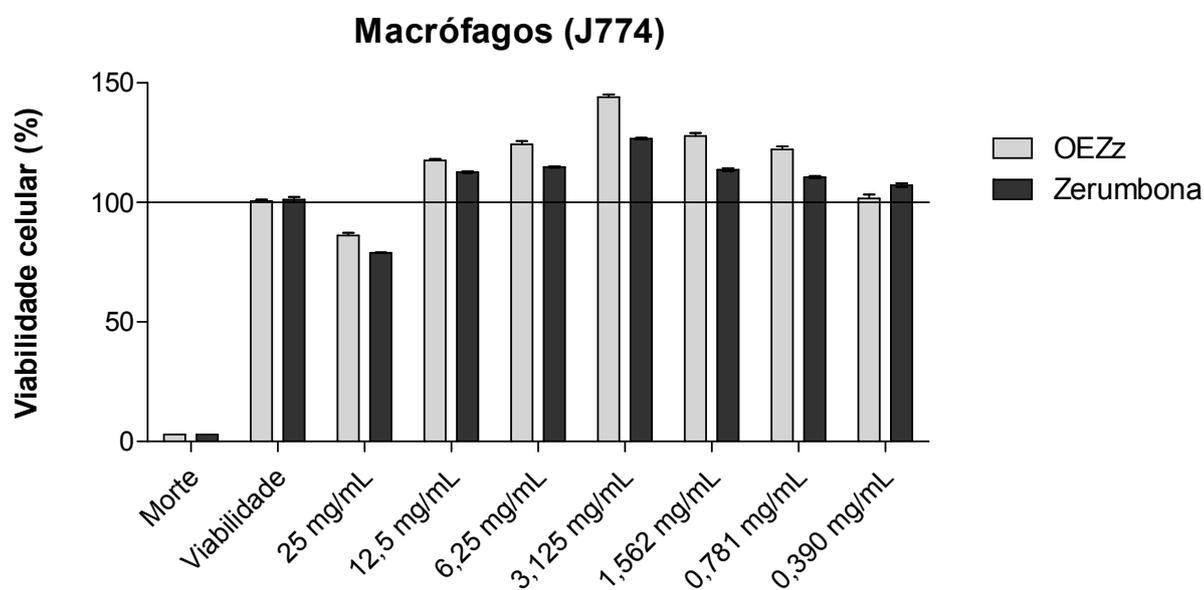


Figura 13: Viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 pós incubação com concentrações de OEZz ou Zer (25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$) pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio).

5.2. Caracterização do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* e de seu componente majoritário

Por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), revelou-se ser a zerumbona o componente majoritário do OEZz, representando 83,5% da composição total do óleo (Figura 14). Outros componentes de maior expressão foram: α -Humuleno (4,17%), 2,4-diisopropenil-1-metilciclohexano (1,72%), α -Cariofileno (1,64%), epóxido de humuleno II (1,41%) e biciclo[6,1,0]nonano,9-(1-metiletilideno) (1,07%) (Tabela 1). Outros estudos corroboram com os dados obtidos na análise da composição de OEZz (BHUIYAN, 2008; DAI, 2013; SINGH, 2014; RANA, 2017).

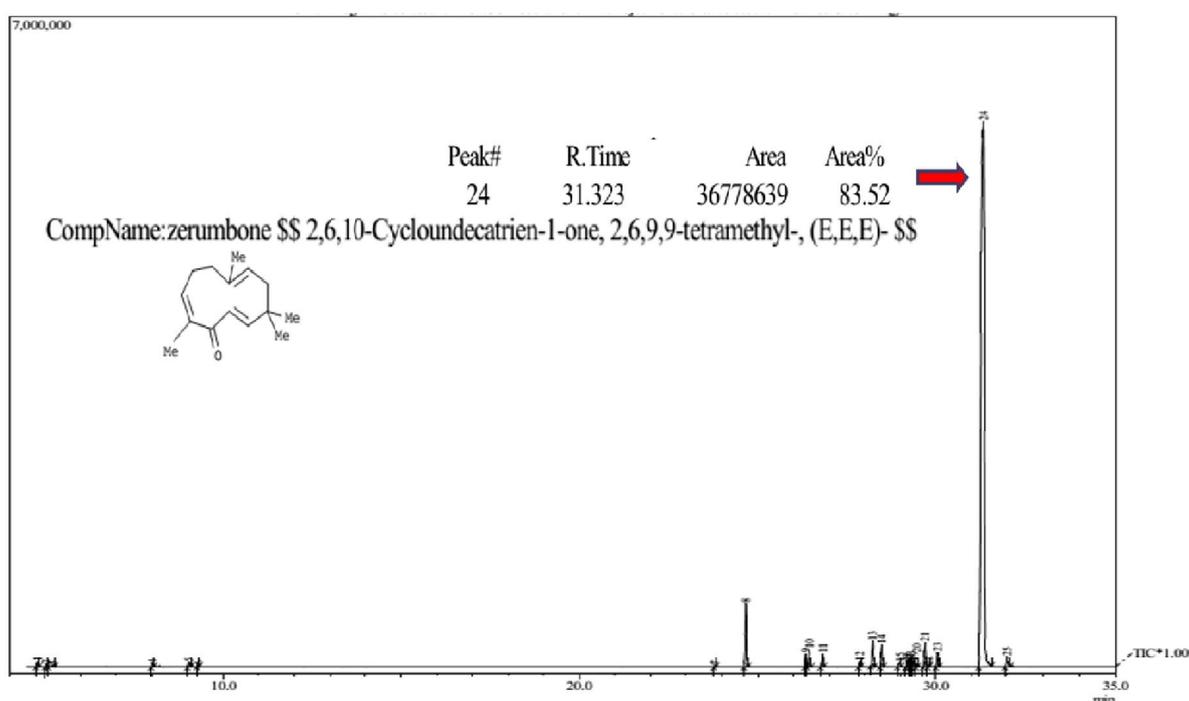


Figura 14: Cromatograma representativo das análises por CG-MS do OEZz, empregando coluna capilar (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) com uma fase estacionária composta de 5% de fenil-metilpolisiloxano e gás hélio como fase móvel.

Tabela 1: Constituintes do óleo essencial obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet*, revelados a partir de CG-MS. Os constituintes foram distribuídos de forma decrescente em relação ao % da área.

Picos	Constituintes	Tempo de retenção	% da área
24	Zerumbona	31,323	83,52
8	α -Humuleno	24,663	4,17
21	2,4-Diisopropenil-1-metilciclohexano	29,692	1,72
13	α -Cariofileno	28,218	1,64
14	Epóxido de humuleno II	28,466	1,41
10	Biciclo[6,1,0]nonano,9-(1-metiletilideno)	26,435	1,07
23	Carveol	30,036	0,93
11	1H-Cicloprop[e]jazuleno,decaidro-1,1,4,7-tetrametil-[1aR-(1a,alpha,,4,beta,,4a,beta,7,beta,,7a,beta,,7b,alpha,)]	26,816	0,83
9	6-Isopropenil-4,8a-dimetildecáhidro-1-naftalenol	26,340	0,76
25	Ciclohexanona, 2-etil-2-propil	31,982	0,72
16	Spiro(4,4)non-1-ene	29,190	0,43
19	β -Eudesmol	29,383	0,43
15	α -Cedreno	28,973	0,35
1	3,5,5-Trimetil-1-hexeno	4,788	0,33
5	3-Etilpentano	9,034	0,31
12	Óxido de cariasofileno	27,852	0,31
4	4-metil-2,3-di-hidrofurano	8,013	0,20
17	2,5-Dimetil-3-metileno -1,5-heptadieno	29,250	0,19
18	Epóxido de santolina	29,300	0,12
20	β -Costol	29,458	0,12
2	Cis-Butenediol	5,033	0,11
3	Ciclohexanemetanol	5,225	0,11
6	Amylisobutirato	9,293	0,08
22	β -Elemene	29,775	0,08
7	Cariofileno	23,789	0,06
TOTAL			100,00

Para investigar se a zerumbona seria o princípio ativo provedor do efeito vasodilatador observado para OEZz, realizamos novos teste *in vitro* com a zerumbona isolada a partir do OEZz.

O efetivo isolamento da zerumbona foi confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nesta, os cristais obtidos a partir do OEZz, demonstraram uma pureza de 98,3% de zerumbona (Figura 15, Tabela 2).

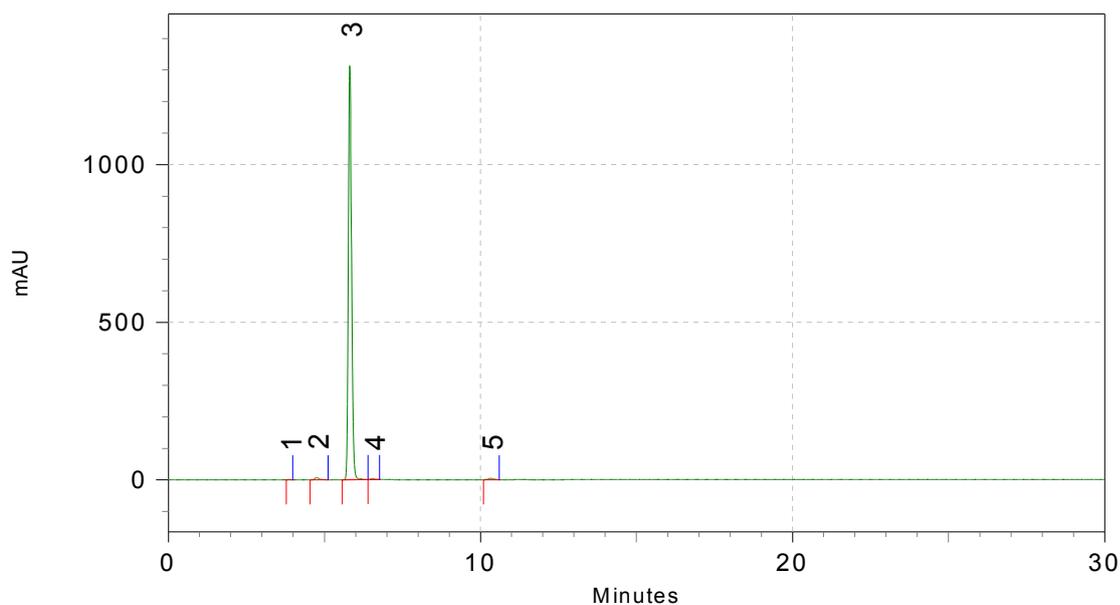


Figura 15: Cromatograma representativo das análises por CLAE dos cristais obtidos do óleo essencial de *Z. zerumbet*, empregando coluna C18 (simetria, 250 x 4,6 mm de ID e tamanho de partículas de 5 μ m), com fase móvel constituída de acetonitrila: metanol:tampão de fosfato de di-hidrogênio de potássio 0,001% (25:55:20, v/v/v), vazão de 1 mL.min⁻¹. Detecção de UV em 254nm. Fonte: Carlos Pinheiro, 2016.

Tabela 2: Constituintes dos cristais obtidos do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber zerumbet*, revelados a partir da CLAE descrita à cima.

Detector A-222 NM			
Picos	Nome	Tempo de retenção	% da área
1		3.868	0.07
2		4.741	0.80
3	Cristais - ZER	5.809	98.27
4		6.541	0.33
5		10.319	0.53
Total			100.00

Fonte: Carlos Pinheiro, 2016.

5.3. Avaliação da atividade biológica de OEZz sobre a reatividade vascular em ratos Wistar

5.3.1. Análise do efeito vasodilatador direto de OEZz em anéis aórticos pré-contraídos U46619

Curvas concentração-efeito foram obtidas demonstrando o relaxamento induzido por diferentes concentrações (10^{-3} - 10^3 $\mu\text{g/mL}$) de OEZz ou seu veículo, DMSO ($7 \times 10^{-1}\%$ - $7 \times 10^{-7}\%$) + solução salina 0,9%. O experimento foi realizado em preparações com endotélio (E+) e em preparações cujo endotélio foi removido mecanicamente (E-). As preparações foram pré-contraídas com a EC_{50} do análogo de tromboxano, U46619 (10^{-7}M).

Tanto em anéis E+ ou E-, verificou-se efeito vasodilatador dependente da concentração de OEZz. A resposta máxima vasodilatadora nestes anéis foi produzida na concentração de 10^3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16). Nos experimentos em que se utilizou apenas o veículo observou-se resposta vasodilatadora a partir da concentração de $10^{2,8}$ $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). A vasodilatação observada para o veículo foi de menor eficácia ($p < 0,001$) se comparada àquela produzida por OEZZ nas concentrações avaliadas (Tabela 1).

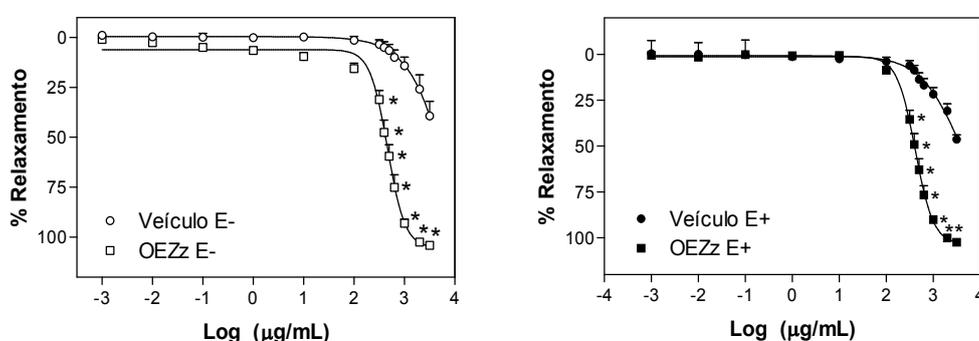


Figura 16: Vasodilatação induzida pelo OEZz (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$; $n=6$) ou veículo (DMSO + salina; $n=6$) em anéis de aorta de ratos Wistar com (E+) e sem (E-) endotélio pré-contraídas com U46619(10^{-7}M). Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs veículo. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Ao final, observa-se não haver diferença significativa na eficácia ou potência do OEZZ em induzir o relaxamento de anéis com ou sem endotélio (Figura 17).

Comparação do %Relaxamento em anéis E- e E+

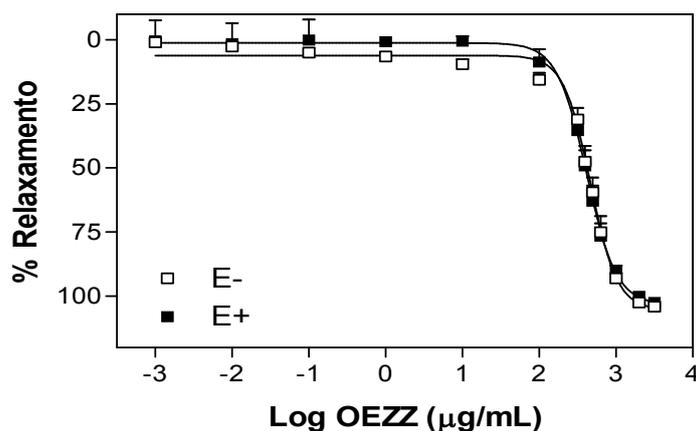


Figura 17: Vasodilatação induzida pelo OEZZ (10^{-3} – 10^3 $\mu\text{g/mL}$; $n=6$) em anéis de aorta de ratos Wistar com (E+) e sem (E-) endotélio pré-contraídos com U46619 (10^{-7}M). Os dados são apresentados como média \pm EPM. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Para avaliar a potência do OEZz sob a resposta vasodilatadora em preparações de aorta com e sem endotélio pré-contraídas com U46619, utilizou-se a análise de regressão não linear para cálculo dos valores de EC_{50} (IC 95%), para OEZz e veículo. Como observado na Tabela 3, a potência e a eficácia vasodilatadora de OEZz não foi modificada pela presença ou não do endotélio vascular. Adicionalmente, observou-se que o OEZz produziu vasodilatação máxima significativamente maior àquela observada com o veículo.

Tabela 3: Valores de EC_{50} e $\text{E}_{\text{máx}}$ do efeito vasodilatador do óleo essencial de *Z. zerumbet* (OEZz). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) em preparações com endotélio (E+) e sem endotélio (E-).

Substância	EC_{50}	$\text{E}_{\text{máx}}$	n
	($\mu\text{g/mL}$)	(% de relaxamento)	
OEZz E+	622,72 \pm 121,16	102,45 \pm 1,00*	6
Veículo E+	-	46,33 \pm 2,47	6
OEZz E-	771,21 \pm 154,17	104,15 \pm 1,32*	6
Veículo E-	-	39,33 \pm 7,4	6

* $P < 0,0001$ vs veículo.

Visto que a exposição ao OEZz demonstrou uma ação vasodilatadora direta sobre anéis com e sem endotélio, e que a eficácia e potência vasodilatadora não

foram diferentes em ambas as preparações, podemos concluir que o endotélio não participa da vasodilatação induzida por OEZz. Por esse motivo, os experimentos seguintes passaram a ser realizados apenas em preparações desprovidas de endotélio.

5.3.2. Análise do efeito de diferentes concentrações de OEZz sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina

Buscou-se verificar se o OEZz modificava a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina. Sendo assim, após a estabilização dos anéis, cada preparação foi incubada por 20 minutos com 500, 750 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ do OEZz e logo após foi realizada curva concentração-efeito para fenilefrina (10^{-10} – 10^{-5}M).

Evidenciou-se que o pré-tratamento das preparações com OEZz 500 $\mu\text{g/mL}$ não modifica de maneira significativa a potência ou eficácia da fenilefrina (Phe) em induzir vasoconstrição, conforme demonstrado pelos valores de EC_{50} e $\text{E}_{\text{máx}}$ (Tabela 4, Figura 18). Entretanto, o pré tratamento com OEZz 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de bloquear completamente a vasoconstrição induzida por fenilefrina (Figura 18). Desta forma, podemos sugerir que o efeito vasodilatador observado no experimento anterior (Figura 16-17) é dependente da concentração de OEZz e relacionado à inibição da vasoconstrição induzida pela fenilefrina.

OEZz bloqueia a vasoconstrição induzida por fenilefrina

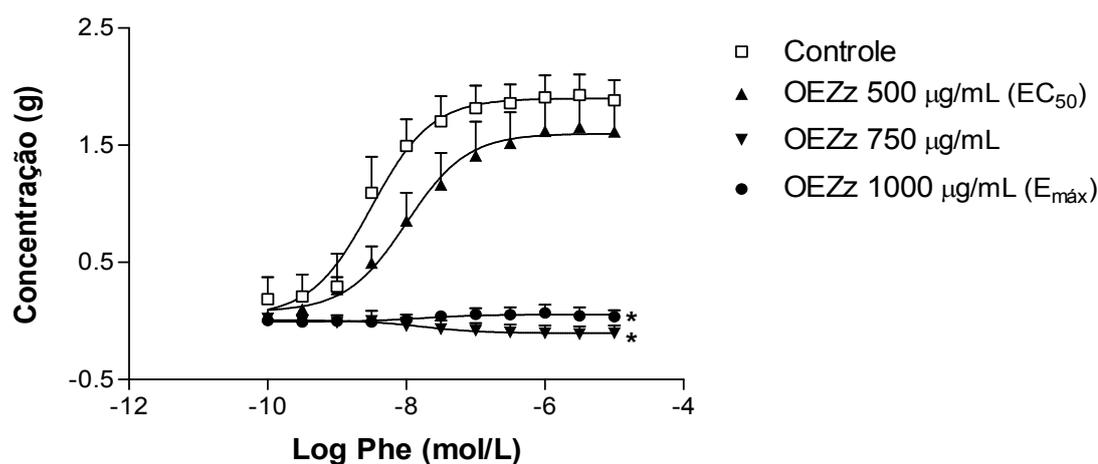


Figura 18: Vasoconstrição induzida por fenilefrina (Phe, 10^{-10} – 10^{-5}M) em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar pré-incubados com 500, 750 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ de OEZz ou veículo (controle) (n=4-5). Os resultados são apresentados como média \pm EPM. *p<0,0001 vs controle.

Tabela 4: Valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ do efeito vasoconstritor de fenilefrina na presença ou ausência de OEZz em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Substância	EC_{50} ($\times 10^{-9}$ $\mu\text{g/mL}$)	$E_{m\acute{a}x}$ (g)	n
Controle	3,99 \pm 1,67	1,88 \pm 0,17	6
OEZz 500 $\mu\text{g/mL}$	1,65 \pm 8,99	1,61 \pm 0,26	5
OEZz 750 $\mu\text{g/mL}$	----	-0,10 \pm 0,06*	5
OEZz 1000 $\mu\text{g/mL}$	----	0,03 \pm 0,05*	6

* $P < 0,0001$, OEZz vs controle.

5.3.3. Avaliação do mecanismo de bloqueio da vasoconstrição induzida por fenilefrina ou KCl em preparações incubadas com OEZz

Uma vez observado que o OEZz bloqueia a vasoconstrição promovida pela Phe, buscou-se investigar se os efeitos inibitórios de OEZz sobre as respostas vasoconstritoras seriam produto do antagonismo de receptores adrenérgicos ou bloqueio de canais para cálcio nas células do músculo liso vascular.

A incubação com OEZz (1000 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de bloquear parcialmente a vasoconstrição promovida pelo Ca^{2+} em anéis aórticos sem endotélio, pré-contraídos com Phe (10^{-7}M) (Figura 19a).

Para investigar se os efeitos inibitórios de OEZz sob as respostas vasoconstritoras seriam por meio do bloqueio de canais para cálcio, os quais necessitam ser ativados nas células do músculo liso vascular em resposta à fenilefrina, utilizou-se KCl (60mM/L) em substituição à fenilefrina.

De maneira semelhante ao observado na resposta estimulada por fenilefrina, a incubação com OEZz (1000 $\mu\text{g/mL}$) também foi capaz de inibir a vasoconstrição em anéis aórticos estimulados pelo KCl ($6 \times 10^{-4}\text{M}$) (Figura 19b).

O tratamento com OEZz bloqueia a vasoconstrição induzida por influxo de Ca^{2+} em anéis aórticos pré-incubados com fenilefrina ou KCl

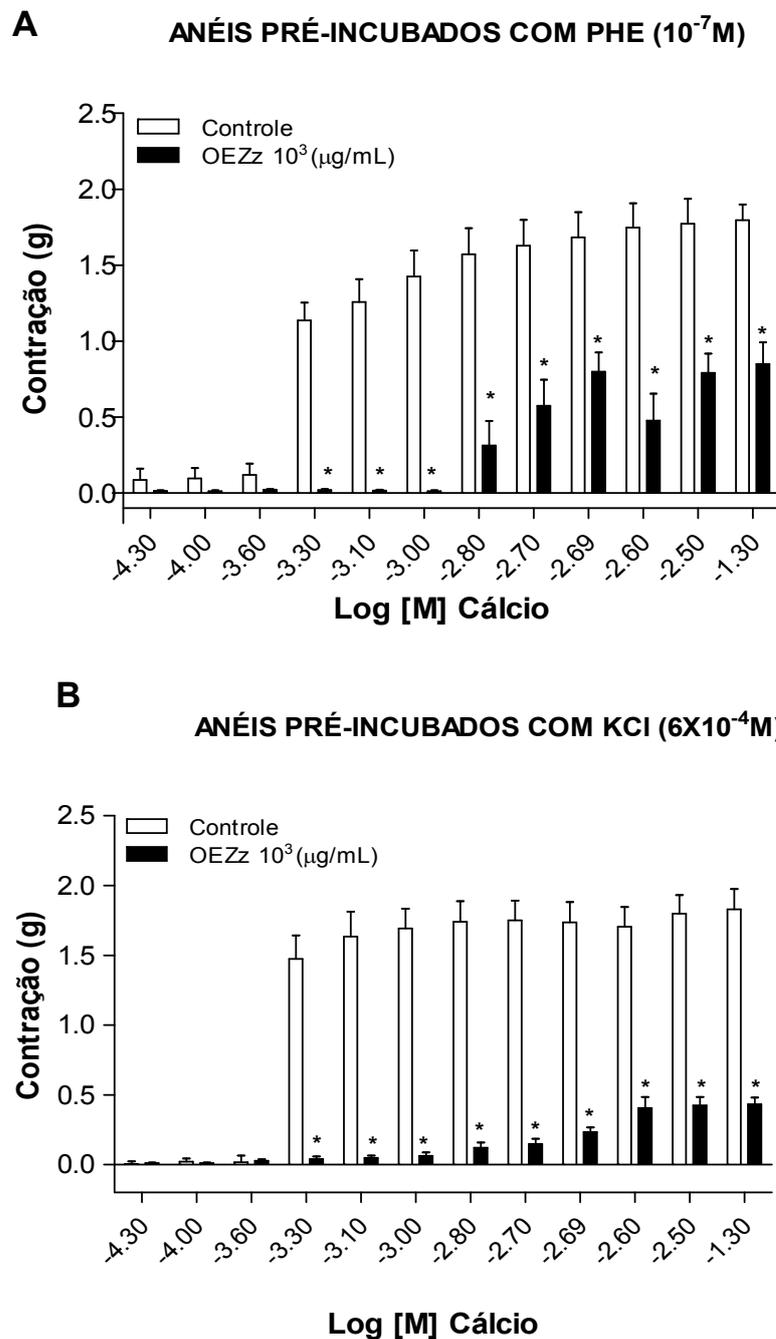


Figura 19: Vasoconstrição induzida por influxo de cálcio pré-incubados ou não com OEZz (1000 $\mu\text{g/mL}$). (A) Preparações estimuladas com fenilefrina (10^{-7}M) (N=4). (B) Preparações estimuladas com KCl ($6 \times 10^{-4}\text{M}$) (N=5). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs controle.

A pré-incubação com OEZz demonstrou reduzir a potência e a eficácia da vasodilatação promovida por influxo de Ca^{2+} em anéis aórticos estimulados com

fenilefrina. Semelhantemente, em anéis estimulados com KCl, o OEZz igualmente promoveu redução na potência (EC_{50}) e eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) da resposta vasoconstritora (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ do efeito vasoconstritor induzido por influxo de cálcio em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio pré-incubadas com OEZz ($10^3 \mu\text{g/mL}$) ou veículo (controle) e estimuladas com fenilefrina ou KCl. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

	Substância	EC_{50} ($\times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$)	$E_{m\acute{a}x}$ (g)	n
Fenilefrina (10^{-7}M)	Veículo	$8,16 \pm 1,56$	$1,79 \pm 0,10$	4
	OEZz $10^3 \mu\text{g/mL}$	$65,27 \pm 10,72^*$	$0,84 \pm 0,14^*$	4
KCl (60mM)	Veículo	$5,28 \pm 0,69$	$1,82 \pm 0,14$	5
	OEZz $10^3 \mu\text{g/mL}$	$82,38 \pm 8,82^*$	$0,43 \pm 0,04^*$	5

* $p < 0,005$ OEZz vs controle.

Dessa forma, o OEZz ($1000 \mu\text{g/mL}$) demonstrou reduzir em 20% a potência e 75% a eficácia da vasoconstrição mediada por influxo cálcio em anéis pré-incubados com fenilefrina (10^{-7}M) e KCl (60mM) após depleção do cálcio intracelular. Sugerindo que a vasodilatação observada para o OEZz está associada à sua capacidade de bloquear a vasoconstrição mediante o bloqueio de canais para cálcio.

Uma vez demonstrado o mecanismo vasodilatador induzido por OEZz, por meio de sua caracterização, buscou-se avaliar se seu principal componente seria o promovedor desse efeito sob a função vascular.

5.4. Análise do efeito de zerumbona sob a reatividade vascular aórtica em ratos Wistar

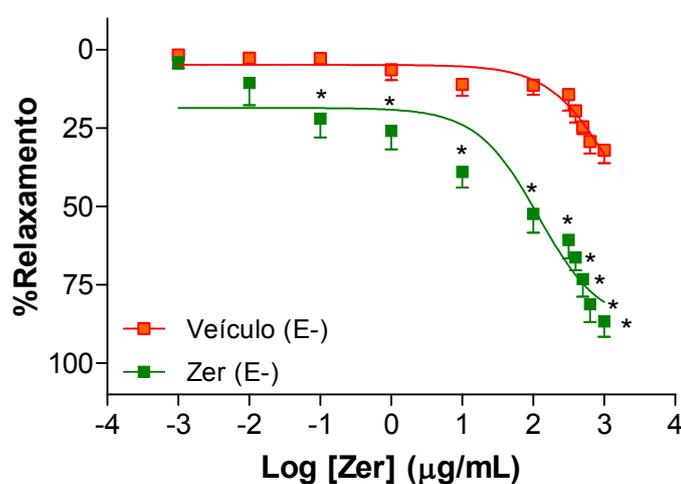
5.4.1. Análise do efeito vasodilatador direto de zerumbona em anéis aórticos pré-contráidos com fenilefrina

Uma vez que OEZz não promove vasodilatação dependente de endotélio, os testes com zerumbona foram feitos apenas em anéis aórticos desprovidos de endotélio. Nestes experimentos, zerumbona produziu vasodilatação em concentrações a partir de $0,1 \mu\text{g/mL}$, alcançando seu potencial máximo vasodilatador (86,8%) na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figura 20). Assim como

observado para o veículo de OEZz, observou-se vasodilatação para o veículo da zerumbona, DMSO ($7 \times 10^{-1}\%$ - $7 \times 10^{-7}\%$) + solução salina 0,9%, a partir da concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ do veículo, correspondente à $7 \times 10^{-3}\%$ de DMSO ($p < 0,05$). O efeito máximo vasodilatador para o veículo foi de $35,82 \pm 2,31\%$ observado na concentração de $10^3 \mu\text{g/mL}$. Entretanto, a eficácia vasodilatadora da zerumbona foi muito superior àquela observada para o veículo nas concentrações de 10^{-1} - $10^3 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5).

A

Zerumbona promove vasodilatação em anéis aórticos pré-incubados com Phe



B

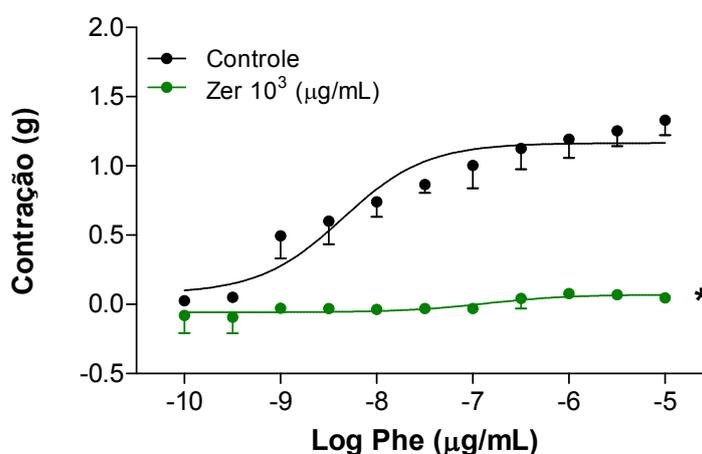
Substância	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	E _{máx} (%relaxamento)	N
Veículo	–	$35,82 \pm 2,31$	5
Zerumbona	$119,2 \pm 5,98$	$86,79 \pm 4,87^*$	4

Figura 20: Vasodilatação induzida por zerumbona (10^{-3} - $10^3 \mu\text{g/mL}$; $n=4$) em anéis de aorta de ratos Wistar desprovidos de endotélio (E-), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7}M). (A) Curva concentração-efeito. (B) Valores de EC₅₀ e E_{máx}. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,0001$ zerumbona vs controle.

5.4.2. Análise do efeito de zerumbona sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina

Verificada a ação vasodilatadora promovida por zerumbona, investigou-se sua ação sobre a vasoconstrição induzida por fenilefrina ($10^{-7}M$). Como resultado, observamos que a zerumbona, assim como o OEZz, promove bloqueio total não-superável da vasoconstrição estimulada por fenilefrina na concentração testada (Figura 21).

A Zerumbona promove bloqueio insuperável da vasoconstrição estimulada por fenilefrina



B

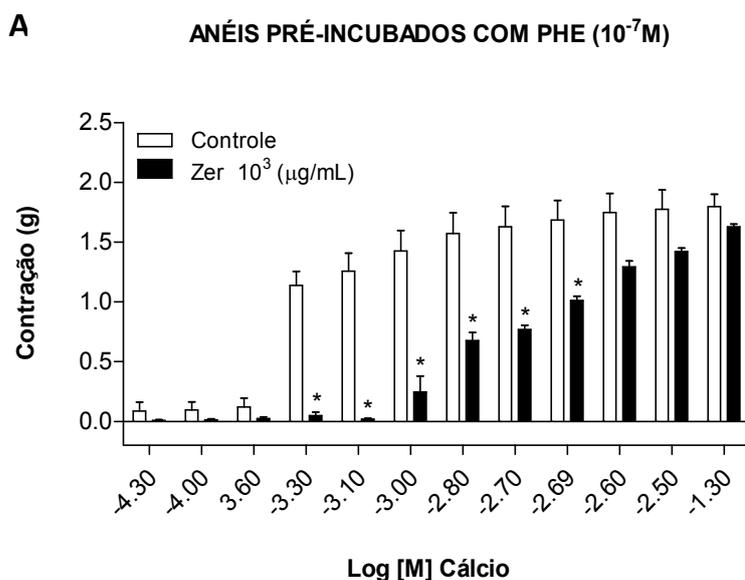
Substância	EC ₅₀ (10 ⁻⁹ µg/mL)	E _{máx} (contração em g)	N
Veículo	4,43 ± 5,98	1,32 ± 0,05	4
Zerumbona	-	0,05 ± 0,05*	4

Figura 21: Vasoconstrição induzida por fenilefrina em aorta de ratos Wistar na presença ou ausência de zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$), (A) Curvas concentração-efeito de fenilefrina ($10^{-10} - 10^{-5} \text{mol/L}$; $n=5$) na ausência (veículo) ou presença de zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$), (B) Valores de EC₅₀ e E_{máx}. Os dados são apresentados como média ± EPM. * $p < 0,0001$. Zerumbona vs controle.

5.4.3. Avaliação do mecanismo de bloqueio da vasoconstrição induzida por fenilefrina ou KCl em preparações incubadas com zerumbona

Ao investigar a ação de zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$) sob o influxo de Ca^{2+} , observamos que a mesma foi capaz de reduzir a potência do efeito vasoconstritor promovido pelo influxo de Ca^{2+} , porém a eficácia permaneceu inalterada (Figura 22, Tabela 6). Resultados semelhantes foram obtidos para os anéis pré-incubados com os agonistas, fenilefrina (Phe, 10^{-7}) e KCl ($60 \times 10^{-3}\text{M}$). Dessa forma, zerumbona promoveu bloqueio superável dos canais para cálcio envolvidos nas respostas vasoconstritoras para os agentes avaliados.

Zerumbona promove bloqueio superável da resposta vasoconstritora mediada por influxo de Ca^{2+} estimuladas com Phe (10^{-7}M) ou KCl ($6 \times 10^{-4}\text{M}$)



B

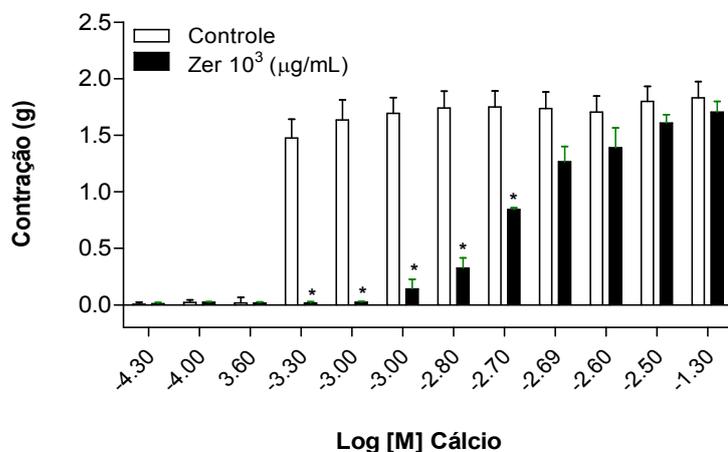
ANÉIS PRÉ-INCUBADOS COM KCl ($6 \times 10^{-4} \text{M}$)

Figura 22: Vasoconstrição induzida por influxo de cálcio pré-incubados ou não com zerumbona ($1000 \mu\text{g/mL}$). (A) Preparações estimuladas com fenilefrina (10^{-7}M) ($N=4$). (B) Preparações estimuladas com KCl ($6 \times 10^{-4} \text{M}$) ($N=4$). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs controle

Tabela 6: Valores de EC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ do efeito vasoconstritor do influxo de Ca^{2+} em anéis de aorta de ratos Wistar sem endotélio pré-incubados com Zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$) ou veículo (controle) e estimulados com fenilefrina ou KCl. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

	Substância	$EC_{50} (x10^{-5} \mu\text{g/mL})$	$E_{m\acute{a}x} (g)$	n
Fenilefrina (10^{-7}M)	controle	$8,16 \pm 1,56$	$1,79 \pm 0,10$	4
	zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$)	$75,79 \pm 5,55^{**}$	$1,62 \pm 0,02$	4
KCl ($60 \times 10^{-3} \text{M}$)	controle	$5,28 \pm 0,69$	$1,82 \pm 0,14$	4
	zerumbona ($10^3 \mu\text{g/mL}$)	$83,47 \pm 3,94^{**}$	$1,70 \pm 0,09$	4

* $p < 0,0001$ zerumbona vs controle.

A análise conjunta dos resultados, permite-nos sugerir que o OEZz e Zer possuem uma efetiva ação vasodilatadora promovida pelo bloqueio de canais para cálcio e não uma ação antagônica sobre receptores adrenérgicos vasculares. O componente majoritário do OEZz, zerumbona, de forma semelhante, promove ação vasodilatadora. Assim, a vasodilatação promovida pelo OEZz pode ser consequência da ação da zerumbona. Porém, a potência da

zerumbona é superior ao do OEZz, enquanto a eficácia é maior para o OEZz (Figura 23).

Assim, acreditamos que o efeito vasodilatador do OEZz seja oriundo principalmente da ação da zerumbona, todavia para atingir o efeito máximo da resposta vasoconstritora seja necessária a participação de outros componentes presentes no óleo, cujo ação sinérgica poderia estar envolvida no bloqueio insuperável de canais para cálcio.

Vasodilatação promovida por concentrações crescentes de OEZz e zerumbona

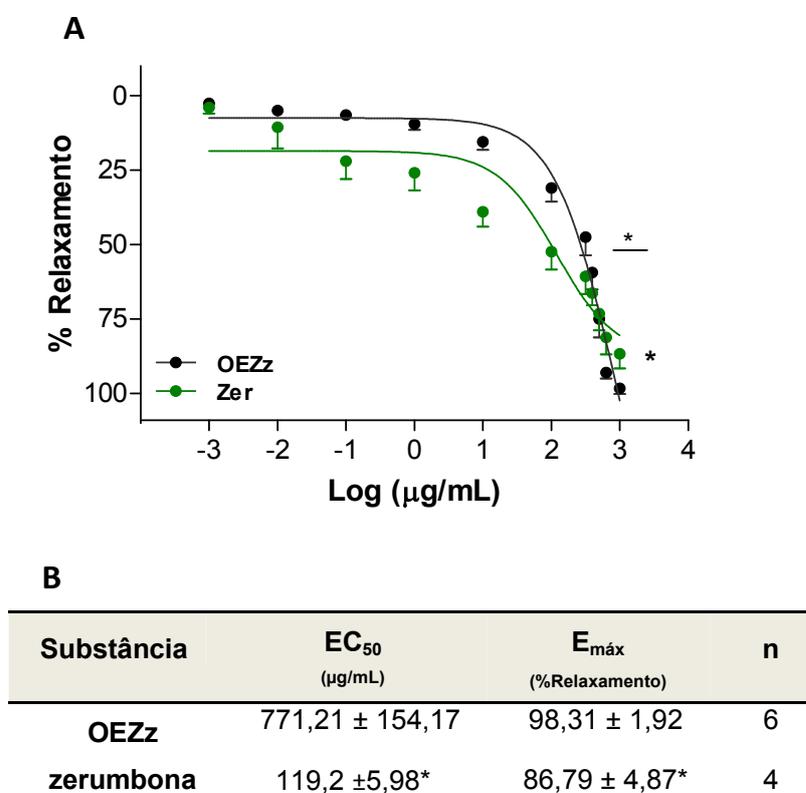


Figura 23: Vasodilatação induzida por OEZz e zerumbona (10^{-3} – 10^3 µg/mL) em anéis de aorta de ratos Wistar desprovidos de endotélio (E-), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} M). (A) Curva concentração-efeito. (B) Valores de EC₅₀ e E_{máx}. Os dados são apresentados como média ± EPM. *p<0,05. Zerumbona vs OEZz.

5.5. Avaliação do metabolismo corporal

Considerando a atividade vasodilatadora de OEZz *in vitro* e discutindo-se sua potencial utilização no tratamento de distúrbios vasculares associados a patologias, tornou-se interesse de nossa investigação averiguar os efeitos da administração sistêmica de OEZz sobre a estrutura vascular e renal, bem como sobre os mecanismos relacionados à função renal e metabolismo. A estrutura de órgãos-alvo como aorta e rim de ratos Wistar tratados por 21 dias, com doses de 50mg/Kg e 100mg/Kg do OEZz foram analisadas por técnica histológica e estereológica. Desta forma, visou-se averiguar a segurança do tratamento por via oral com OEZz sob órgãos-alvo.

5.5.1. Peso corporal, consumo de ração e água, pressão arterial e frequência cardíaca

O tratamento com OEZz, em relação ao grupo controle, não modificou a massa corporal, a pressão arterial (PAS, PAD ou PAM), frequência cardíaca, o consumo de água e ração dos animais, considerando o início (Dia 1) e o fim (Dia 21) do tratamento (Tabela 7).

Tabela 7: Valores finais de pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, peso corporal, fluxo urinário, consumo de água e ração de ratos Wistar controle ou submetidos ao tratamento por 21 dias com OEZz. Os valores são representados em média \pm EPM.

		Controle	OEZz (50mg/Kg)	OEZz (100mg/Kg)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	Início	158,33 \pm 14,11	120,79 \pm 11,66	139,20 \pm 20,86
	Fim	135,58 \pm 8,31	166,78 \pm 18,10	135,13 \pm 15,27
Pressão arterial diastólica (mmHg)	Início	112,32 \pm 6,43	102,11 \pm 4,48	110,46 \pm 4,54
	Fim	109,12 \pm 8,90	109,58 \pm 3,98	112,86 \pm 13,42
Pressão arterial média (mmHg)	Início	138,45 \pm 10,87	111,54 \pm 6,08	128,20 \pm 8,77
	Fim	115,54 \pm 8,26	134,92 \pm 8,38	121,12 \pm 11,00
Frequência cardíaca (BPM)	Início	391,21 \pm 7,42	410,13 \pm 20,53	415,86 \pm 17,01
	Fim	403,66 \pm 13,00	414,43 \pm 21,03	436,40 \pm 7,84
Peso corporal (g)	Início	295 \pm 8,73	352 \pm 4,59	316 \pm 11,38
	Fim	390 \pm 6,56	373 \pm 7,72	337 \pm 17,77

Consumo de água (mL/Kg/dia)	81,93±6,83	97,54±8,54	84,40±5,40
Consumo de ração (g/Kg/dia)	84,75±4,72	84,96±5,23	84,96±5,23
Nº de animais	3	6	5

5.5.2. Perfil lipídico

Os animais tratados com OEZz, nas doses de 50 e 100mg/Kg, apresentaram um aumento significativo no nível de colesterol plasmático, resultante de um aumento de colesterol HDL e LDL, para ambos os grupos (Tabela 8). Não foram observadas alterações no nível de colesterol VLDL, bem como no nível de triglicerídeos, entre os grupos tratados e o controle.

Tabela 8: Valores médios de níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, LDL e VLDL de ratos Wistar, submetidos ao tratamento com OEZz. Os valores estão representados em média ±EPM.

	Controle	OEZz 50mg/Kg	OEZz 100mg/Kg
Colesterol total (mg/dL)	84,83 ± 4,53	233,78 ± 21,88*	240,52 ± 4,34*
HDL (mg/dL)	38,73 ± 2,19	60,33 ± 4,48*	62,02 ± 1,29*
VLDL (mg/dL)	36,97 ± 4,36	37,23 ± 4,98	29,41 ± 0,52
LDL (mg/dL)	18,01 ± 0,79	137,49 ± 16,41*	148,83 ± 4,75*
Triglicerídeos (mg/dL)	205,85 ± 10,35	203,57 ± 24,78	147,83 ± 2,64
Nº de animais	3	6	5

*p<0,005

5.5.3. Avaliação de parâmetros de função renal

Animais tratados com OEZz (50mg/mL) demonstraram um aumento no índice de peso renal, não observado para o grupo OEZz (100mg/mL). O tratamento com OEZz não promoveu modificação sob o fluxo urinário dos

animais. Por outro lado, ambos apresentaram redução no ritmo de filtração glomerular, o qual estava associado à elevação plasmática e redução da excreção renal de creatinina e uréia. O nível de proteínas plasmáticas totais, bem como a fração de excreção de sódio, não foi alterado entre os grupos. Semelhantemente, não foi observado aumento na excreção urinária de albumina (Tabela 9).

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos e marcadores de função renal de ratos Wistar, submetidos ao tratamento com OEZz. Os valores estão representados em média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs controle.

	Controle	OEZz 50mg/Kg	OEZz 100mg/Kg
Índice de peso renal (g/cm)	0,41 \pm 0,02	0,52 \pm 0,028*	0,40 \pm 0,05
Fluxo urinário (mL/kg/dia)	61,47 \pm 3,50	53,03 \pm 3,38	45,93 \pm 4,45
Ritmo de filtração glomerular (mL/kg/min)	10,77 \pm 0,67	3,71 \pm 0,95*	2,17 \pm 0,38*
Fração de excreção de Sódio (mM/L/kg/dia)	10,28 \pm 1,25	10,18 \pm 1,14	8,74 \pm 1,35
Albuminúria (mL/kg/dia)	53,96 \pm 6,27	79,18 \pm 8,63	57,45 \pm 10,65
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,25 \pm 0,02	0,25 \pm 0,10	0,92 \pm 0,16*
Fração de excreção de creatinina (mg/kg/dia)	1,20 \pm 0,51	0,51 \pm 0,10*	0,61 \pm 0,21*
Uréia plasmática (mg/dL)	16,35 \pm 1,45	28,68 \pm 1,10*	32,74 \pm 0,64*
Fração de excreção de uréia (mg/kg/dia)	25,74 \pm 1,58	18,8 \pm 2,29	12,60 \pm 1,37*
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	5,10 \pm 0,25	5,28 \pm 0,22	5,06 \pm 0,09
Nº de animais	3	6	5

* $p < 0,005$

5.5.4. Avaliação estereológica da aorta torácica de animais tratados com OEZz

Análises estereológicas da aorta (Figura 24) demonstram um aumento no volume total da aorta torácica (volume total = parede aórtica + espaço intraluminal + tecido adiposo perivascular) para ratos tratados com OEZz (100mg/Kg), não foram observadas alterações para os animais tratados com OEZz (50mg/Kg). Entre os componentes da aorta, apenas o lúmen apresentou aumento de volume, enquanto o volume da parede aórtica e do tecido adiposo perivascular permaneceram inalterados (Figura 25). O volume das túnica íntima, média e adventícia também foi analisado, porém nenhuma alteração foi observada.

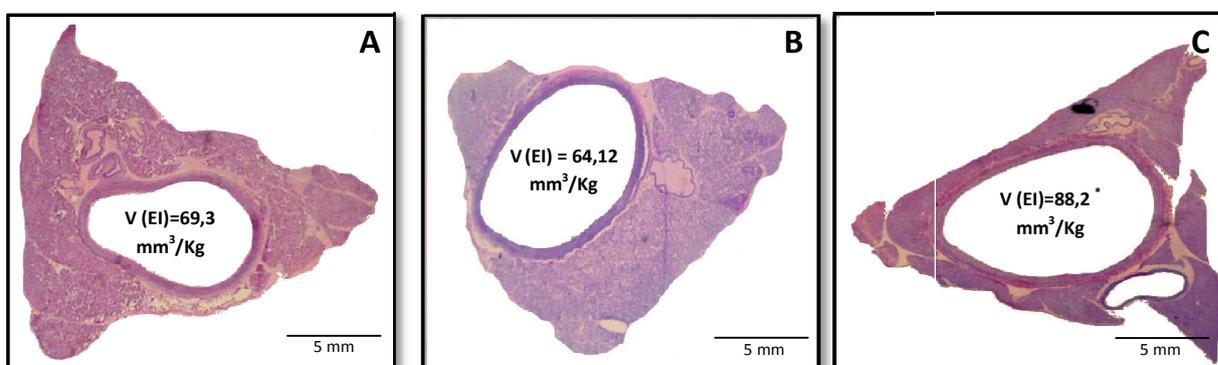


Figura 24: Fotomicrografias de aorta torácica de ratos Wistar tratados ou não com OEZz. (A) Aorta torácica de animal controle. (B) Aorta torácica de animal tratado com OEZz (50mg/Kg). (C) Aorta torácica de animal tratado com OEZz (100mg/Kg). V(EI): Volume do espaço intraluminal. * $p < 0,05$ vs OEZz (50mg/Kg).

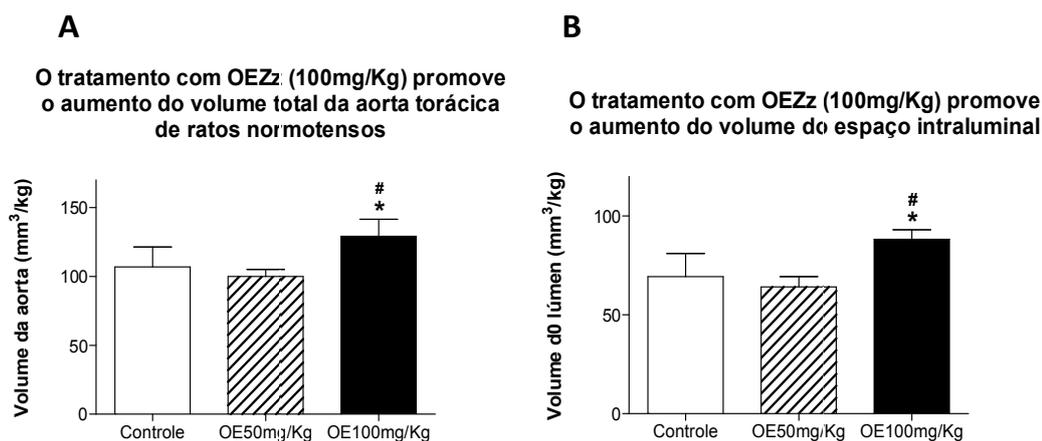


Figura 25: Tratamento com OEZz promove aumento no volume total da aorta torácica. (A) Volume aórtico total. (B) Volume do espaço intraluminal. Imagens capturas por microscópio óptico sob aumento de 40. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs OEZz (50mg/Kg).

5.5.5. Avaliação estereológica do rim direito de animais tratados com OEZz

Ao analisar o índice de peso renal (peso do rim / comprimento da tíbia), observou-se um aumento no índice de peso renal dos animais tratados com OEZz (50mg/mK), no entanto, as análises estereológicas demonstraram não haver modificação sob o volume total do órgão. Para estes parâmetros, não foram observadas modificações para os animais tratados com 100mg/Kg.

O tratamento, em conjunto, não demonstrou alterar a densidade volumétrica do corpúsculo renal (Controle: $59,47 \pm 8,22$; OE50: $72,30 \pm 5,73$; OE100: $62,57 \pm 3,56$), todavia o tratamento com OEZz (50mg/Kg) reduziu em 80% a densidade volumétrica do espaço de Bowman, para os animais tratados com OEZz (100mg/Kg) esta redução foi de 60%. Além disso, observou-se aumentou de maneira expressiva no volume dos capilares glomerulares em 60% e 150% para os grupos tratados com 50 e 100mg/Kg, respectivamente (Figura 26 e 27).

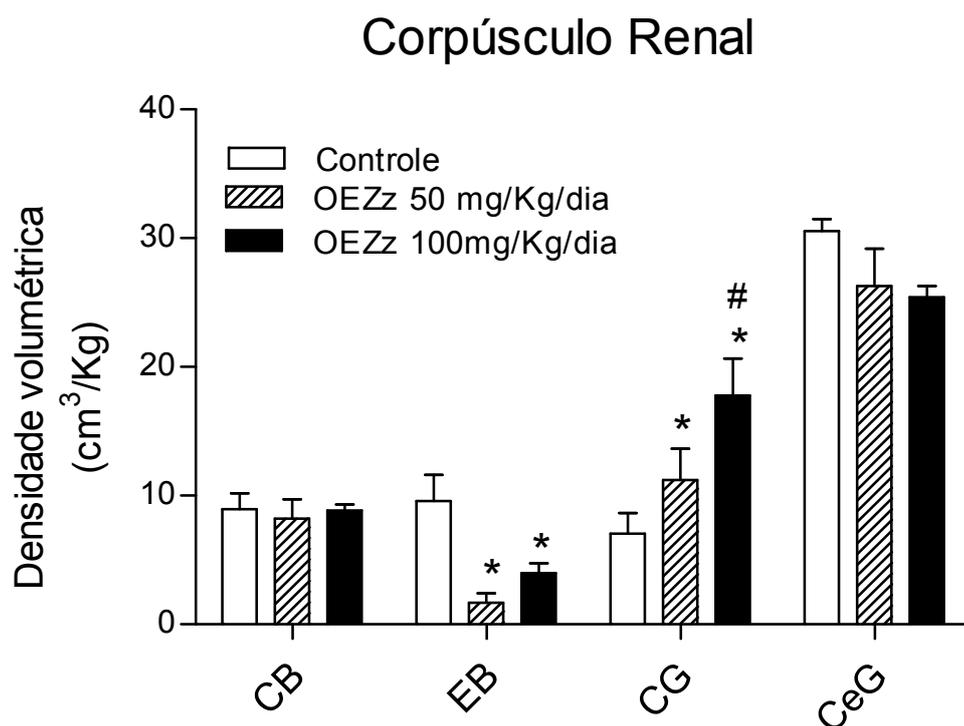


Figura 26: Densidade volumétrica de componentes do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados com OEZz. CB: Corpúsculo de Bowman; EB: Espaço de Bowman; CG: Capilares glomerulares; CeG: Células glomerulares (células endoteliais + podócitos + células mesangiais). Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$. Tratamento vs controle. # $p < 0,05$. OEZz (100mg/Kg) vs OEZz (50mg/Kg).

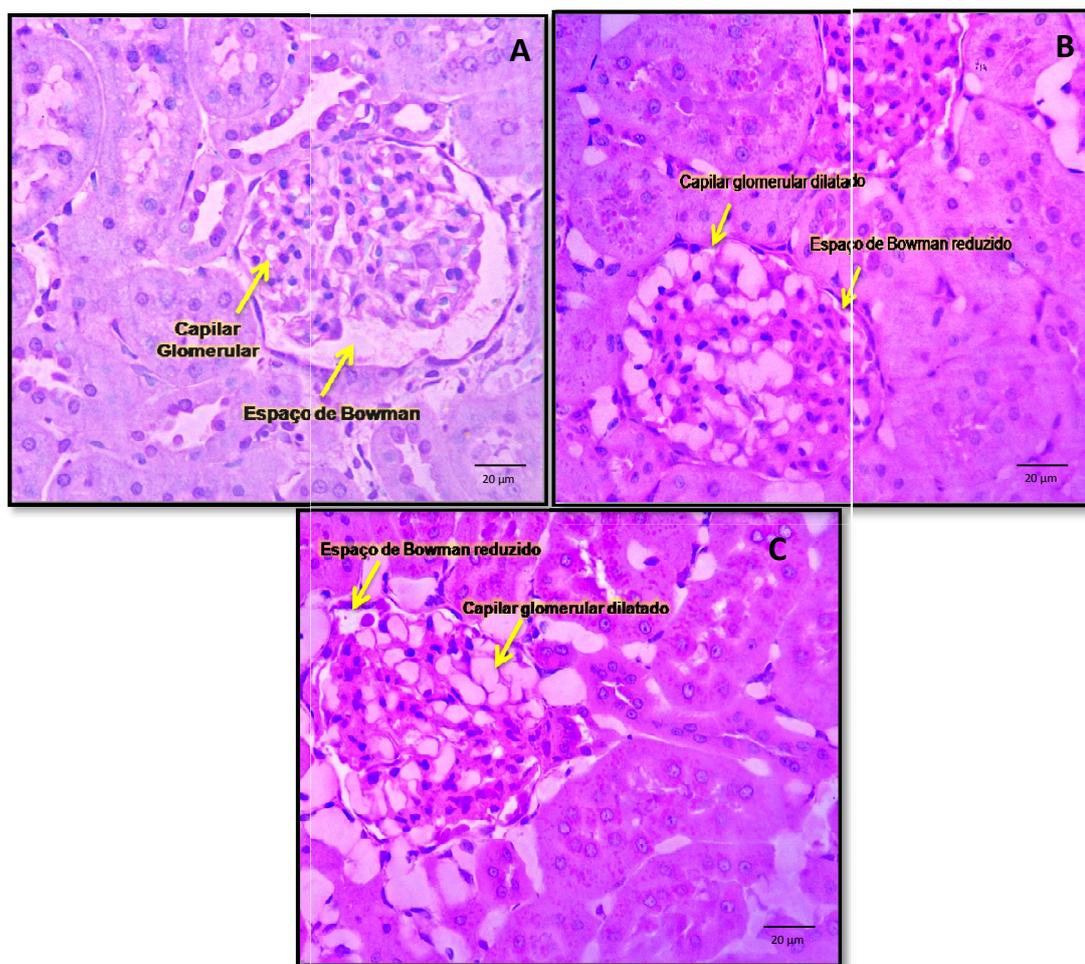


Figura 27: Fotomicrografias do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados ou não com OEZz. (A) Grupo controle: corpúsculo renal sem alteração. (B) Tratamento com OEZz com (50mg/Kg). C) Tratamento com OEZz (100mg/Kg), grupos tratados apresentaram redução no Espaço de Bowman e dilatação de capilares glomerulares. Aumento de 400; Coloração: azul de toluidina:fucsina básica .

Além do aumento na densidade volumétrica dos capilares no interior dos glomérulos, o tratamento com OEZz (50mg/Kg e 100mg/Kg) foi capaz de aumentar significativamente e de maneira semelhante o volume dos capilares peritubulares (Figura 28 e 29). Não foram encontradas modificações na densidade volumétrica dos túbulos renais.

O tratamento com OEZz aumenta o volume dos capilares peritubulares

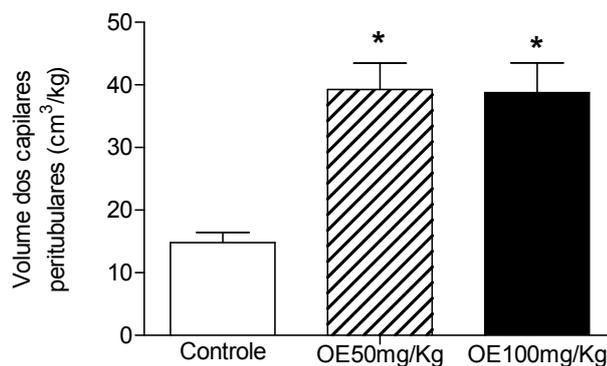


Figura 28: Aumento no volume de capilares peritubulares de ratos Wistar tratados com OEZz. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs controle.

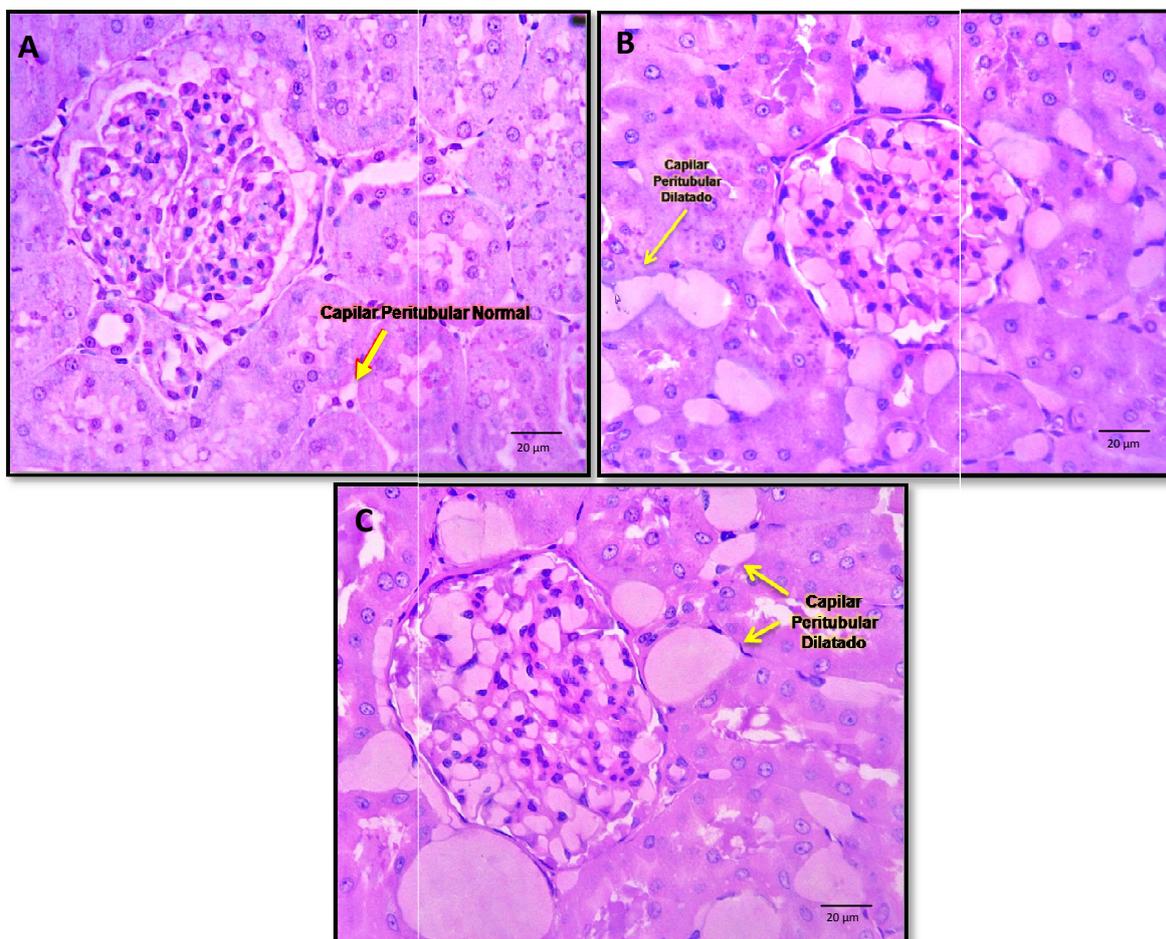


Figura 29: Fotomicrografias do corpúsculo renal de ratos Wistar tratados e não tratados com OEZz evidenciando aumento de volume dos capilares peritubulares de animais tratados.. (A) Grupo controle: capilares peritubulares sem alteração. (B) Tratamento OEZz (50mg/Kg). (C) Tratamento OEZz (100mg/Kg). Aumento de 400; Coloração: azul de toluidina:fucsina básica.

5.6. Potencial anti-inflamatório de OEZz e Zer

O OEZz e a Zer apresentaram atividade anti-inflamatória de forma dependente de sua concentração (Figura 30), de forma que, à medida que as concentrações decrescem o potencial anti-inflamatório dessas substâncias também é reduzido. A porcentagem de inibição de NO por macrófagos J774 foi realizada mediante a comparação com a produção basal de NO por macrófagos sem exposição ao LPS e ao tratamento (Produção de NO = não detectável, n=3) e a produção de NO por macrófagos ativados com LPS (1µg/mL) sem o tratamento (Produção de NO = 10,10 ± 1,34 µM, n=3).

O OEZz e a Zer demonstraram inibir completamente a produção de NO na concentração 12,5 µg/mL, na concentração de 6,25 µg/mL o percentual inibitório foi de 95% para o OEZz e 90% para zerumbona, reduzindo para 40% e 32% na concentração de 3,125 µg/mL, para o OEZz e Zer, respectivamente.

Para a concentração de 1,56 µg/mL, a eficácia na inibição de NO pelo OEZz (%Inibição = 32,88 ± 4,32, n=3) foi significativamente maior que a de Zer (%Inibição = 3,20 ± 2,85, n=3) (p<0,005). Entretanto a concentração inibitória máxima (IC₅₀) da Zer foi significativamente menor (IC₅₀= 3,02±0,10µg/mL) que a revelada para o OEZz (IC₅₀=5,85±0,26µg/mL). Não foram observadas nenhuma atividade inibitória para as concentrações de 0,781 e 0,390µg/mL.

Concentrações de OEZz e Zer promovem redução na produção de NO por macrófagos murinos

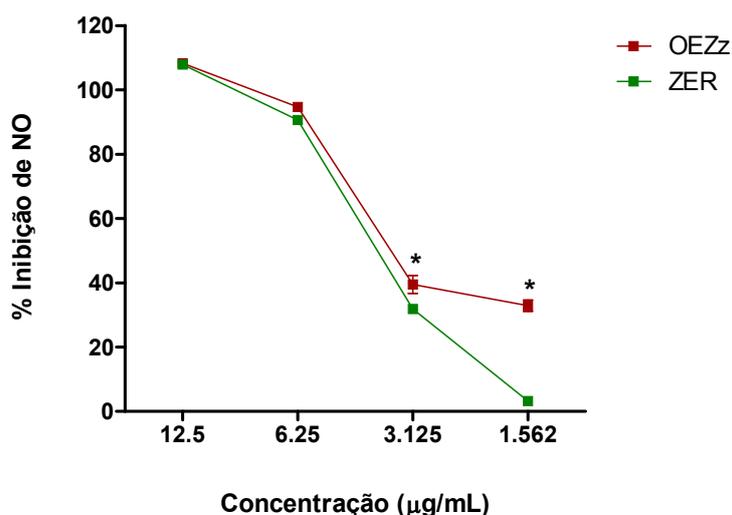


Figura 30: Efeito anti-inflamatório via inibição da produção de NO em macrófagos murinos (J774) estimulados com LPS (1µg/mL) induzidos por OEZz e Zer (12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.390 µg/mL). Células não expostas ao LPS foram utilizadas como controle positivo e células desafiadas com LPS, como controle negativo. Os dados são apresentados como média ± EPM.. *p<0,001 OEZz vs Zerumbona.

5.7. Potencial antioxidante de OEZz e Zer

O OEZz e a Zer apresentaram atividade antioxidante dependente de suas concentrações (Figura 31). OEZz demonstrou uma atividade inibitória as EROs de 95% na concentração 100 µg/mL, resultado similar ao observado para quercetina (controle positivo) na mesma concentração. Observou-se uma atividade antioxidante de 80% nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL de OEZz e de 62% na menor concentração testada. A zerumbona, por sua vez, manteve uma inibição de 80% quando utilizada nas concentrações de 100 e 50 µg/mL. Nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL sua atividade foi de 75%.

Entre as substâncias testadas, a que apresentou maior eficácia foi o OEZz, demonstrando na menor concentração uma atividade de 62%. Nesta mesma concentração, a capacidade antioxidante de zerumbona foi de 30%. Em 100 µg/mL, a eficácia da atividade antioxidante do OEZz ($95,28 \pm 2,84\%$) não foi significativamente diferente da quercetina ($100,03 \pm 0,01\%$), enquanto a Zerumbona demonstrou uma eficácia significativamente menor ($82,28 \pm 2,92\%$) que o OEZz e o controle ($p < 0,001$). As concentrações de OEZz e Zer necessárias para inibir pela metade (IC_{50}) a produção de EROs não foram significativamente diferentes, onde Zer demonstrou $IC_{50} = 7,18 \pm 0,30$ µg/mL e OEZz $IC_{50} = 2,51 \pm 1,23$ µg/mL.

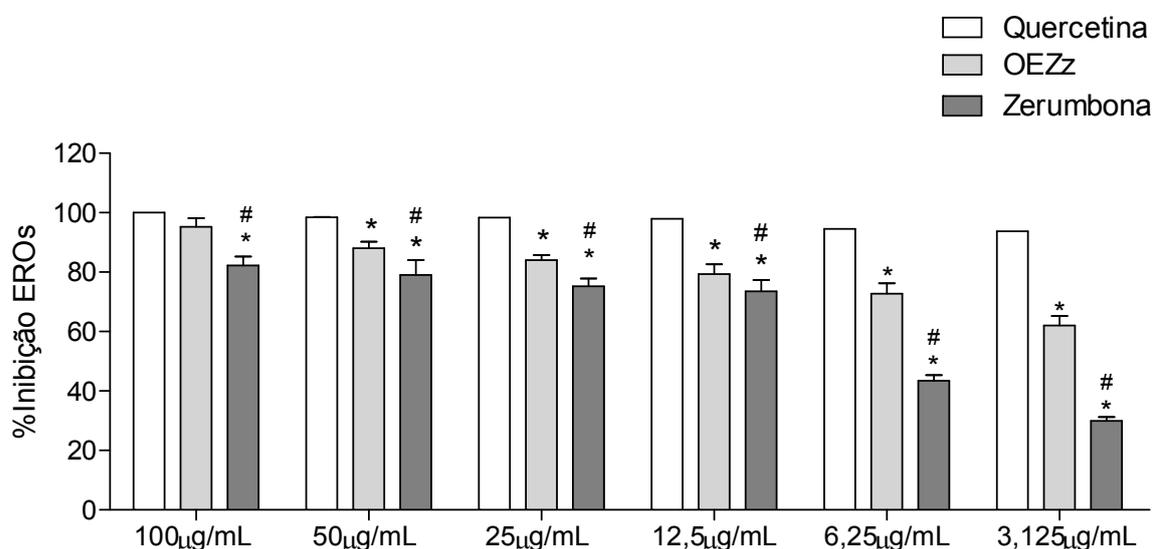


Figura 31: Inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fibroblastos humanos (MCR-5) estimulados com AAPH (600µM), promovida por OEZz e Zer (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL). Quercetina foi usada nas mesmas concentrações que as substâncias testadas, como controle positivo. Os dados são apresentados como média ± EPM. * $p < 0,001$ Tratamentos vs quercetina. # $p < 0,001$ OEZz vs Zerumbona.

6. Discussão

Este estudo demonstrou que o óleo essencial de *Z. zerumbet* e seu composto majoritário, zerumbona, promoveram vasodilatação concentração-dependente em anéis de aorta de ratos Wistar de maneira independente do endotélio vascular em preparações pré-contraídas com o análogo de tromboxano, U46619, ou fenilefrina. Resultado semelhante a este foi descrito por Cunha (2012) em experimentos de reatividade vascular utilizando o óleo essencial de *Alpinia zerumbet*, espécie da mesma família de *Zingiber zerumbet*.

Potencial vasodilatador tem sido descrito para compostos isolados de diferentes espécies da família Zingiberaceae. Ghareib e colaboradores (2016) demonstram que a zingerona, principal constituinte do *Zingiber officinale*, promove efeito vasodilatador de maneira dependente da concentração em anéis aórticos de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, que teriam sua vasodilatação endotélio-dependente prejudicada pela patologia. Os autores sugerem que o efeito vasodilatador promovido pelo composto está associado à estimulação da produção endotelial de NO e ativação da enzima guanilato ciclase expressa no músculo liso vascular. Xu e colaboradores (2007) ao estudar a curcumina, principal constituinte de *Curcuma longa*, demonstraram que a mesma promove efeito vasodilatador em artérias coronárias porcinas. Os autores observaram que a vasodilatação foi significativamente reduzida com a remoção do endotélio ou após a adição de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase endotelial -eNOS). Logo, sugere-se que a vasodilatação induzida por curcumina envolve a liberação de NO endotelial.

Em nosso trabalho, observamos que OEZz e Zer induzem vasodilatação agindo diretamente sobre o MLV, visto que a eficácia e a potência do efeito vasodilatador não foram modificadas pela remoção mecânica do endotélio nas preparações estudadas (Figura 17 e Figura 20). Este achado se faz de grande importância quando consideramos sua potencial aplicabilidade em patologias que comprometam o funcionamento vascular como a hipertensão arterial. Nesta condição, observa-se prejuízo das respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio vascular através da inibição da liberação de fatores vasodilatadores endoteliais como NO, prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) como resultado do processo de disfunção endotelial (SU, 2015).

Desta forma, a ação vasodilatadora independente do endotélio demonstrada para OEZz e Zer poderia melhorar o funcionamento vascular nessas condições patológicas, uma vez que produzem relaxamento direto do músculo liso vascular.

Vários fármacos com ação vasodilatadora independente do endotélio são utilizados para tratamento da hipertensão, entre eles o minoxidil que proporciona relaxamento por sua ação direta sob o músculo liso através do aumento seletivo da permeabilidade da membrana ao potássio; promovendo um quadro de hiperpolarização, inibindo a ativação dos canais para cálcio voltagem-dependentes e conseqüentemente a geração de um potencial de ação (PELLIZARO e PANCHENIAK, 2003).

Nossos estudos apontam semelhança entre os mecanismos vasodilatadores de OEZz e de seu componente majoritário Zer. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar seu potencial terapêutico para o tratamento de doenças do aparelho cardiovascular, tanto em modelos experimentais como em humanos.

A partir da análise das curvas concentração-efeito para OEZz e Zer em preparações pré-contraídas com o U46619, observamos que a eficácia vasodilatadora do OEZz foi significativamente maior que aquela observada para Zer. Por outro lado, Zer demonstrou potência superior ($p < 0,05$) ao OEZz em produzir vasodilatação (Figura 23). Baseados nestes resultados, pode-se sugerir que grande parte do efeito vasodilatador do OEZz seja oriundo principalmente da ação da zerumbona. Todavia, para que o efeito máximo da resposta vasodilatadora seja obtido, ocorra a necessidade de sinergismo a outros componentes presentes no OEZz.

Uma vez conhecendo o potencial vasodilatador gerado pelo OEZz e Zer, buscou-se investigar se esta vasodilatação era oriunda da redução da capacidade vasoconstritora do músculo liso vascular. Os resultados demonstram (Figura 18 e Figura 21) que a pré-incubação dos anéis de aorta com OEZz e Zer ($10^3 \mu\text{g/mL}$) foi capaz de inibir completamente a vasoconstrição induzida para fenilefrina.

Sabe-se que a resposta vasoconstritora para fenilefrina em preparações vasculares é dependente da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos (GAVIER, 1967). A ativação destes receptores resulta em última instância no aumento da

concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) via produção de segundos mensageiros: inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio das reservas endoplasmáticas e DAG, na presença de cálcio, estimula o influxo de cálcio a partir do líquido extracelular (GOLTZMAN, 2014). Este aumento na $[Ca^{2+}]_i$ promove contração do músculo liso vascular por ativar fatores que culminarão na fosforilação da cadeia leve de miosina, permitindo sua interação com os filamentos de actina (BRUNTON, 2012).

Alguns fármacos utilizados para o tratamento da hipertensão inibem, modulam ou bloqueiam esses mecanismos vasoconstritores. A prazosina, por exemplo, promove relaxamento do músculo liso vascular por sua capacidade de antagonizar os efeitos da noradrenalina sobre os receptores α_1 -adrenérgicos (KIRBY et al., 1987). Assim, OEZz e Zer demonstram promover efeitos vasodilatadores via bloqueio da vasoconstrição. Entretanto, tornou-se necessário esclarecer se o mecanismo vasodilatador era semelhante ou diferente de fármacos já conhecidos como a fenoxibenzamina e a dibenamina (ROBERTSON, 2017). Desta forma, investigamos se os efeitos inibitórios de OEZz e Zer sobre as respostas vasoconstritoras para fenilefrina seriam produto do antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos ou do bloqueio de canais para cálcio nas células do músculo liso vascular. As respostas vasoconstritoras mediadas por influxo de Ca^{2+} em anéis pré-incubados com OEZz ou Zer (1000 μ g/mL) e estimulados com Phe (10^{-7} M) ou KCl (6×10^{-4} M) foram parcialmente inibidas por OEZz (Figuras 19). Em ambos os testes, a pré-incubação com OEZz foi capaz de reduzir a potência e a eficácia da resposta vasoconstritora. Observamos, por outro lado, que Zer foi capaz de reduzir apenas a potência do efeito vasoconstritor estimulado por Phe (10^{-7} M) ou KCl (6×10^{-4} M) (Figura 22), de modo que a eficácia permaneceu inalterada. Baseado nestes resultados pode-se sugerir que o efeito vasodilatador de OEZz e zerumbona se deve à capacidade diferencial destes produtos em promover bloqueio de canais para cálcio em células de músculo liso vascular, já que tanto as respostas vasoconstritoras dependentes da ativação do receptor adrenérgico estimuladas com Phe, como as respostas independentes da ativação de receptores obtida com KCl foram inibidas.

Adicionalmente, podemos concluir que a natureza do bloqueio produzido por OEZz e Zer é distinta. Uma vez que se observou redução da potência e da eficácia vasoconstritora em preparações pré-incubadas com OEZz, de forma que

nem mesmo a máxima concentração de cálcio foi capaz de reverter o bloqueio produzido por este produto, podemos concluir que OEZz produz bloqueio insuperável de canais para cálcio nas concentrações testadas. Por outro lado, Zer promove bloqueio superável dos canais para cálcio, uma vez que se observou redução da potência da vasoconstrição, mas a resposta contrátil máxima foi restaurada com o aumento da concentração de cálcio no meio.

Assim, acreditamos que o bloqueio de canais para cálcio promovido por OEZz seja em parte pela ação da zerumbona. Todavia, é possível que para o OEZz produzir bloqueio insuperável destes canais, seja necessária a participação de outros de seus constituintes como o carveol, cuja ação sinérgica poderia estar envolvida no bloqueio irreversível de canais para cálcio, resultando na atividade vasodilatadora independente do endotélio descrita anteriormente (TEIXEIRA, 2013).

A indústria farmacêutica comercializa várias classes de anti-hipertensivos, dentre eles estão os bloqueadores de canais para cálcio (BCC) que impedem o influxo de cálcio para o espaço intracelular. Geralmente, os BCC são subdivididos em duas classes: os diidropiridínicos e os não diidropiridínicos. Os diidropiridínicos bloqueiam os canais para cálcio dependente de voltagem no MLV, como o felodipino, manidipino, nicardipino, nifedipino, entre outros. Já os não diidropiridínicos, promovem bloqueio seletivo dos canais para cálcio dependente de voltagem no miocárdio, afetando a contratilidade e a condução cardíaca, a exemplo do verapamil e diltiazem. (BOMBIG, 2009).

Nossos resultados com zerumbona, corroboram os achados de Fusi e colaboradores (2015), que demonstraram que anéis aórticos de ratos pré-incubados com diferentes concentrações de zerumbona reduzem, de maneira inversamente proporcional, a contração induzida por adições cumulativas de Ca^{2+} quando estimuladas com KCl (60mmM). Os autores sugerem que a atividade vasodilatadora de zerumbona possa ser, em parte, atribuída ao bloqueio de canais para cálcio dependente de voltagem. Não foram encontrados outros estudos que avaliem o potencial do OEZz sob a reatividade vascular.

A identificação da atividade vasodilatadora de OEZz e seu componente majoritário, zerumbona, justificados por sua capacidade de promover bloqueio de canais para cálcio no músculo liso vascular, é de grande importância, posto que

tais substâncias podem ser úteis no tratamento de distúrbios vasculares associados à hipertensão arterial, diabetes mellitus, ou outras vasculopatias que comprometem a função vascular.

Várias intervenções têm sido criadas para auxiliar no tratamento de vasculopatias, dentre estas, o stent farmacológico. Esta intervenção surgiu como alternativa ao stent convencional (não-farmacológico), uma vez que o uso deste foi associado à proliferação de células do tecido vascular e a reestenose (ALTMANN, 1996). Diferentemente do convencional, os stents farmacológicos são sistemas de administração de fármacos, que liberam o medicamento localmente, através de seu revestimento com uma camada polimérica que permite ao fármaco ser liberado de forma controlada, evitando assim a toxicidade sistêmica e maximizando seu potencial em inibir quadros de reestenose (GUÉRIOS, 1998).

Após sua validação, diversos fármacos foram analisados para serem associados a esta intervenção (LEMOS, 2003). Várias categorias de agentes farmacêuticos foram utilizadas para revestir os stents, entre eles estão o paclitaxel e sirolimo. Semelhantemente, estes compostos inibem a proliferação das células vasculares, inibindo o quadro de fibrose e consequente reestenose, além de sua atividade imunossupressora refletida em sua capacidade de inibir a ativação de células T e células B (KASTRATI, 2005; GALLØE, 2017). Tendo em vista a ação vasodilatadora do OEZz e zerumbona sobre o MLV, suas atividades anti-inflamatórias e a capacidade do OEZz em promover aumento no volume da aorta, seriam estes, possíveis alvos terapêuticos para que em associação com stent farmacológico, possam promover melhora sob a doença coronariana.

Uma vez demonstrada a ação vasodilatadora do OEZz *in vitro* e sua potencial aplicabilidade no tratamento de distúrbios cardiovasculares, buscou-se avaliar os efeitos sistêmicos de sua administração, averiguando a segurança de seu uso por via oral. Para isto, ratos Wistar foram tratados por 21 dias com OEZz nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia e foram avaliadas a estrutura vascular e renal, bem como mecanismos relacionados à função renal e ao metabolismo.

As análises estereológicas da aorta torácica de ratos tratados com OEZz (100mg/Kg/dia) demonstram aumento no volume total da aorta, isto é, considerando o espaço intraluminal e a parede da aorta. Os vasos sanguíneos são constituídos basicamente por três túnicas: túnica íntima, túnica média e túnica

externa ou adventícia (KIERSZENBAUM, 2016). Investigamos se o aumento no volume total da aorta seria decorrente de hipertrofia das túnicas, aumentando assim a parede destes vasos. Os dados obtidos demonstram não haver nenhuma modificação quanto ao volume das túnicas, o que sugere que o tratamento não ocasione dano à parede vascular, não promovendo nenhuma forma de remodelamento.

Quando analisado o espaço intraluminal, observou-se um aumento no volume do lúmen dos ratos tratados com OEZz (100mg/Kg/dia), mas não para os tratados com OEZz (50mg/Kg/dia). Assim acreditamos que a dose de 100mg/Kg/dia seja capaz de modificar o volume da aorta torácica pelo aumento de espaço intraluminal promovido por sua capacidade vasodilatadora, já observada *in vitro*, sem induzir qualquer tipo de remodelamento vascular ou alterar a camada de células endoteliais.

Parâmetros metabólicos, como o consumo de água e ração, massa corporal e fluxo urinário devem ser analisados em estudos pré-clínicos para investigação da toxicidade de uma substância, haja vista que estes parâmetros revelam a ação do tratamento sobre o sistema gastrointestinal (BATISTA, 2014). A análise dos parâmetros metabólicos: massa corporal, consumo de água e ração dos animais tratados com OEZz não demonstraram modificação quando comparados ao controle. Dessa maneira, nossos resultados demonstram que o tratamento não modifica o funcionamento do sistema gastrointestinal, de forma que sob esse sistema seu uso, nas doses testadas (50 e 100mg/Kg/dia), demonstra-se seguro.

Sabe-se que organismos saudáveis possuem mecanismos de compensação em curto e longo prazo para regulação da pressão arterial. Segundo Guyton e Hall (2017), a pressão arterial é determinada pelo produto da resistência vascular e do débito cardíaco. Em resposta à vasodilatação, a resistência vascular é reduzida, o que pode repercutir em redução da pressão arterial. Fisiologicamente, os valores de pressão arterial são finamente regulados através de mecanismos centrais que modulam a atividade simpática e parassimpática, de modo que modificações na RVP em geral são contrapostas por alterações de frequência e débito cardíacos para que a pressão arterial não se altere (BRESSIANI, 2017). Outro mecanismo que contribui para conduzir a pressão arterial à normalidade é a

produção de mediadores neurais – reflexo barorreceptor, e mediadores hormonais – sistema renina-angiotensina-aldosterona (MARTELLI, 2015).

Ao avaliarmos a pressão arterial (PAS, PAD e PAM) de ratos tratados com OEZz, observamos que o tratamento não promoveu modificação significativa de seus valores. Este resultado *in vivo*, entretanto, não se contrapõe aos achados *in vitro*, uma vez que, sob os animais tratados, a vasodilatação promovida por OEZz poderia ativar mecanismos compensatórios que culminariam no retorno da pressão arterial à normalidade. No entanto, novos testes são necessários para investigar se a atividade simpática estaria aumentada no grupo tratado como forma compensatória à vasodilatação induzida por OEZz.

De maneira distinta ao que observamos para o tratamento de ratos Wistar com OEZz, estudos com o extrato hidroalcoólico obtidos das folhas de *Alpinia zerumbet*, espécie da mesma família que o gengibre amargo, demonstram que o tratamento com 10 a 30 mg/Kg/dia do extrato, foi capaz de induzir efeito hipotensor de forma dependente de suas doses em ratos com hipertensão DOCA-sal (DE MOURA, 2005). A divergência entre nossos estudos é explicada pelo uso de modelo animal diferente, posto que organismos acometidos com distúrbios cardiovasculares, como a hipertensão arterial, desenvolvem comprometimento em seus mecanismos de compensação, a exemplo da atenuação da sensibilidade barorreflexa (KOUGIAS,2010) ou mesmo hiper-responsividade a estímulos vasoconstritores como para a endotelina, angiotensina II ou noradrenalina. Assim, no modelo utilizado por De moura e colaboradores (2005), os mecanismos vasodilatadores observados para *Alpinia zerumbet*, superariam o efeito hipertensor observado naquele modelo animal. Assim, testes que investiguem a ação do tratamento com OEZz em modelos de hipertensão arterial e diabetes mellitus são necessários para caracterizarmos sua ação frente a situações patológicas sobre o sistema cardiovascular.

Níveis plasmáticos de LDL elevados e HDL reduzidos representam a principal causa de doença arterial coronariana. O colesterol total e LDL elevados têm sido correlacionados com alterações nas túnicas íntima e média da parede dos vasos, assim como da complacência arterial (MÁRQUEZ et al., 2009).No presente estudo, avaliamos o perfil lipídico dos animais tratados com o OEZz e observamos(Tabela 8) que houve aumento significativo no nível de colesterol

total, bem como das lipoproteínas HDL e LDL. Porém, os níveis de colesterol VLDL e triglicerídeos não foram modificados. Resultados semelhantes foram descritos para *Zingiber officinale* (gengibre), espécie congênera de *Z. zerumbet*, onde ratos tratados com o extrato aquoso de gengibre demonstraram níveis aumentados de colesterol total e triglicerídeos (SOARES, 2005).

Grande parte do colesterol endógeno é proveniente de incrementos na síntese hepática, da mobilização a partir do tecido adiposo ou derivados da dieta, sendo chamado colesterol exógeno neste último caso (SILVA, 2017). Observamos aumento no nível de colesterol e lipoproteínas nos animais tratados com OEZz em nosso trabalho. Entretanto, considerando que o consumo de ração e peso corporal não foram alterados pelo tratamento, estudos adicionais ainda necessitam ser realizados para averiguar se mecanismos hepáticos ou produzidos no tecido adiposo estariam envolvidos nos efeitos hipercolesterolemiantes observados para OEZz, bem como o comportamento destes mecanismos em modelos de hipertensão arterial, diabetes e obesidade.

Srinivasan e Sambaiah (1991) demonstraram que o tratamento com gengibre, *Zingiber officinale*, aumentou significativamente os valores de colesterol plasmático. Entretanto, o gengibre não apenas propiciou o aumento na síntese hepática como também no catabolismo das moléculas de colesterol, de modo que se observou aumento na secreção de ácidos biliares por estimulação da enzima 7- α -hidroxilase, enzima responsável pela conversão de colesterol em ácidos biliares. Assim, os autores sugeriram que o aumento no colesterol observado seria resultante da estimulação hepática e este efeito estaria associado à estimulação do catabolismo do colesterol e sua eliminação na forma de ácidos biliares.

Para confirmar a hipótese de que o tratamento com OEZz possivelmente produz ativação de síntese hepática e esteja envolvida no catabolismo das moléculas de colesterol, novos experimentos precisam ser realizados, como mobilização lipídica em células adiposas e investigação dos efeitos de OEZz sobre a atividade de lipases ou enzimas hepáticas envolvidas na regulação da síntese de colesterol.

Entre os métodos utilizados para avaliar a função renal, as dosagens bioquímicas e a determinação do ritmo de filtração glomerular (RFG) continuam

sendo as mais utilizadas. O RFG é determinado, entre outros fatores, pela dosagem da creatinina plasmática e urinária, onde o aumento da creatinina plasmática resulta diretamente na redução do RFG (SIROTA et al., 2011; PAKULA et al., 2015). No presente estudo, observou-se aumento de creatinina e uréia plasmáticas de animais tratados com OEZz, enquanto os valores de excreção urinária desses marcadores foi diminuída, demonstrando consequentemente uma redução no RFG. Este achado está de acordo com os estudos de Neto (2012), onde ratos Wistar tratados por via oral com 6-gingerol, um dos principais componentes do *Zingiber officinale*, desencadeou aumento relevante nos valores séricos de creatinina e uréia, resultando na diminuição do ritmo de filtração glomerular. Porém, não foram evidenciados quais os mecanismos envolvidos nessa elevação de creatinina e uréia sérica.

A uréia, assim como a creatinina, é um preditor da função renal. Assim, sua excreção renal deve igualar-se à sua produção. A uréia passa livremente pela barreira de filtração, porém, é reabsorvida passivamente pela porção proximal dos túbulos urinários (SCHMITTE, 2014). Analisando em conjunto os dados de função renal e estereológicos, observamos que o OEZz é capaz de promover efeito vasodilatador sobre os capilares glomerulares e peritubulares dos ratos tratados com OEZz, demonstrado pelo aumento significativo na densidade volumétrica dessas estruturas. Em contrapartida, observou-se redução na densidade volumétrica do espaço de Bowman, o que sugerimos ser decorrente do aumento de volume dos capilares glomerulares.

Segundo Guyton e Hall (2017), a filtração glomerular (FG) é determinada pela pressão líquida de filtração (resultado da soma das pressões hidrostáticas e coloidosmótica que agem sobre os capilares glomerulares) e pelo coeficiente de filtração dos capilares glomerulares (determinada pelo produto da permeabilidade pela área de superfície dos capilares). Tomando o quadro de vasodilatação promovida pelo OEZz sob os capilares glomerulares, infere-se que a pressão líquida de filtração esteja diminuída nestes animais, todavia, pelo aumento da área de superfície destes capilares e do aumento na permeabilidade, a vasodilatação culmina no aumento do coeficiente de filtração. Assim, esses fatores determinantes para a FG se comportam de forma inversamente proporcional resultando na manutenção do RFG.

Porém, além destes fatores, outro fator determinante para a FG é a pressão na cápsula de Bowman. A elevação desta pressão pode reduzir a FG, posto que a pressão hidrostática no interior da cápsula se opõe à filtração (GUYTON e HALL, 2017). Assim, considerando que animais tratados com OEZz tem seu espaço de Bowman diminuídos, sugerimos que este fator possa aumentar a pressão no interior da cápsula, promovendo uma redução na FG e, conseqüentemente, diminuindo a excreção urinária de creatinina e uréia além de aumentar os níveis de creatinina e uréia plasmáticos. No entanto, novos testes precisam ser feitos para confirmar essas hipóteses.

Outro mecanismo envolvido na regulação da FG é o feedback arteriolar eferente, mecanismo no qual por meio da modificação na resistência arteriolar pode-se promover aumento ou redução na FG (ICHIKAWA, 1980). Em condições vasodilatadoras da arteríola eferente ocorre uma redução em sua resistência arteriolar, culminando na redução na pressão hidrostática glomerular, tendendo, assim, na redução do FG (GUYTON e HALL, 2017). Este efeito foi observado por Kon e colaboradores (1993) na administração de bradicinina, um conhecido vasodilatador, em ratos Wistar. Os autores demonstram que a utilização de bradicinina gera vasodilatação renal, inclusive sobre a arteríola eferente, o que produz diminuição na pressão capilar glomerular e conseqüente redução no RFG. Dessa forma, podemos sugerir que este seja outro mecanismo pelo qual o tratamento com OEZz poderia reduzir o RFG, tendo em vista sua ação vasodilatadora sob os capilares glomerulares e peritubulares e em leitos de condutância. Logo, a diminuição do RFG poderia também ser reflexo da vasodilatação da arteríola eferente gerada por OEZz.

Vale ressaltar que a redução no RFG foi observada em animais saudáveis tratados com OEZz. Entretanto, considerando quadros patológicos como a hipertensão e diabetes mellitus onde a FG é reduzida pelo espessamento das membranas dos capilares glomerulares, a ação vasodilatadora do OEZz poderia gerar grandes benefícios, uma vez que assim como vasodilatadores endógenos, a exemplo das prostaglandinas, poderia reverter o quadro de vasoconstrição excessiva, reduzindo a resistência vascular renal e promovendo aumento na filtração glomerular e fluxo sanguíneo renal (GUYTON e HALL, 2017).

Alguns trabalhos foram descritos com extratos obtidos de *Zingiber zerumbet* ou espécies próximas como *Zingiber officinale* relataram potencial renoprotetor dessas espécies sob distúrbios renais.

Segundo Tzeng e colaboradores (2013), o tratamento com o extrato etanólico de *Zingiber zerumbet* produz efeitos renoprotetores em ratos com nefropatia diabética induzida por estreptozotocina. Em seu estudo, os ratos diabéticos foram tratados oralmente com gengibre ou metformina por oito semanas. Após o tratamento, observou-se redução semelhante da hiperglicemia e da disfunção renal nos ratos diabéticos tratados com *Zingiber zerumbet* ou metformina e aumento da expressão protéica de nefrina e podocina, proteínas que constituem a barreira de filtração glomerular. Estes resultados foram corroborados por Rodrigues e colaboradores (2013) que, utilizando [6]-gingerol, composto isolado de *Zingiber officinale*, demonstraram reverter a redução do clearance de creatinina induzido por gentamicina em rato, melhorando a função glomerular e tubular após cinco dias de tratamento.

No presente trabalho, demonstrou-se que dentre os animais tratados com OEZz não houve alterações na excreção de proteínas, como a albumina, nem mesmo no nível de proteínas plasmáticas totais. Este dado nos permite sugerir que o tratamento não promove dano à barreira de filtração glomerular. Estudos futuros são necessários frente a modelos associados a patologias renais.

Sabe-se que proteínas, em condições homeostáticas, são retidas pela membrana basal glomerular. A albumina, porém, possui peso molecular muito próximo ao limiar de filtração, o que permite que somente uma pequena quantidade seja filtrada em rins saudáveis e posteriormente reabsorvida nos túbulos (EATON e POOLER, 2015). Logo, uma vez que o nível de filtração de proteínas não sofreu modificação, sugerimos que o tratamento com OEZz não promoveu dano as barreiras de filtração.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram a capacidade vasodilatadora independente do endotélio do OEZz e zerumbona *in vitro* e *in vivo*, de forma que sua ação parece estar associada ao bloqueio de canais para cálcio. Em animais saudáveis, o tratamento com OEZz demonstrou reduzir o ritmo de filtração glomerular, o que não parece estar associado a distúrbios nas barreiras de filtração renal.

Vários mecanismos, além das contribuições locais, podem contribuir para a regulação do tônus vascular, entre eles, destacam-se a atividade anti-inflamatória e antioxidante. A presença de mediadores inflamatórios como NO, IL-6, TNF α e EROs contribuem para o comprometimento vascular em modelos patológicos por reduzir a atividade vasodilatadora local. Neste cenário, o quadro de inflamação pode gerar um processo de disfunção endotelial e comprometer o funcionamento vascular (SOUZA, 2008; TEIXEIRA, 2014).

Sabe-se que a inflamação participa da progressão de vários fatores que contribuem para o desenvolvimento de DCV, como na aterosclerose e hipertensão arterial (CAILLON e SCHIFFRIN, 2016). Em decorrência disto, vários marcadores inflamatórios como citocinas, contagem total de leucócitos, proteína C-Reativa, entre outros, vem sendo avaliados como indicadores de DCV (TEIXEIRA, 2014).

Os macrófagos são um dos principais leucócitos atuantes no estado inflamatório (CORRÊA-CAMACHO, 2007). Luz e colaboradores (2013) afirmam que estas células estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento e evolução da doença endotelial, principalmente no processo aterogênico. Estudos como o de Mikolajczyk e colaboradores (2016) apontam que em patologias como a hipertensão, o nível de citocinas inflamatórias é aumentado em consequência da maior infiltração de leucócitos no tecido perivascular. Todavia, quando a infiltração foi inibida, reduzindo assim o nível de mediadores inflamatórios, desenvolveu-se uma proteção contra a disfunção endotelial induzida por angiotensina II.

Assim, posto que a inflamação contribui para disfunção endotelial e subsequente comprometimento da função vascular, infere-se que a atividade anti-inflamatória pode ser um mecanismo indireto de manutenção do tônus vascular, uma vez que inibir a inflamação resulta em redução dos níveis de mediadores inflamatórios e proteção de modificações patológicas de células endoteliais.

Nesse sentido, realizou-se neste estudo testes para avaliar a atividade anti-inflamatória, mensurada pela capacidade de OEZz e Zer de inibir a produção de NO por macrófagos murinos. OEZz, bem como zerumbona, demonstraram atividade anti-inflamatória de maneira dependente de suas concentrações. Na concentração de 12,5 μ g/mL, ambos demonstraram 100% de inibição na produção de NO.

Estudos realizados por Chien e colaboradores (2008) apontam para o possível efeito anti-inflamatório de constituintes extraídos dos rizomas de *Z. zerumbet*, como zerumbona e 3-o-metil-campeferol. Seus estudos demonstraram que a inibição na produção de NO por macrófagos da linhagem RAW 264.7 é oriunda da capacidade destes compostos em suprimir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção massiva de NO em condições inflamatórias.

Estudos *in vivo*, como o de Zakaria e colaboradores (2011), mostram a ação anti-inflamatória do OEZz em modelos de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina) e crônica (testes de formação de granuloma induzido por grânulos de algodão) em ratos tratados com OEZz nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg/dia. Nestes animais, o tratamento foi capaz de inibir a formação dos edemas e granulomas, além de apresentar atividade antinociceptiva mensura pelo teste de formalina.

Em 2010, Sulaiman e colaboradores também usando modelos de inflamação aguda e crônica, como descritos a cima, demonstraram atividade anti-inflamatória promovida por zerumbona em ratos que foram tratados por via intraperitoneal com zerumbona nas doses de 5, 10,50 e 100mg/Kg/dia, onde o tratamento inibiu a formação do edema e suprimiu o aparecimento de granulomas, de forma dependente da dose administrada.

A partir de estudos *in vitro*, Kim e colaboradores (2017), analisaram amostras de macrófagos da linhagem THP-1 pré-incubados com zerumbona (1-10 μ M) e estimulados com LPS. Nestes ensaios, os autores demonstraram que o tratamento com zerumbona foi capaz de reprimir a secreção de marcadores pró-inflamatórios, como ciclooxigenase-2 (COX-2), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e expressão do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Em conjunto, o tratamento inibiu significativamente a expressão da proteína e do mRNA do receptor do tipo Toll (TLR) 2 e 8, bem como a expressão do gene MyD88. Assim, afirmaram que a ação anti-inflamatória promovida por zerumbona é reflexo da sua capacidade em inibir os TLR 2/4, NF- κ B e reduzir a secreção de mediadores inflamatórios.

A utilização de alguns fármacos como as estatinas (inibidores da HMG-CoA redutase) têm sido associados com expressiva diminuição da morbidade e

mortalidade cardiovascular em pacientes em prevenção da doença coronariana (FONSECA, 2005). Estudos como o de Ascer e colaboradores (2004) demonstram que as estatinas possuem atividade antiinflamatória e podem melhorar a função endotelial. Seu uso causa significativas reduções nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), além de inibir a expressão de receptores da superfície celular de monócitos, moléculas de adesão e a adesão de integrinas aos leucócitos. Segundo os autores, os efeitos hipotensores das estatinas estão, pelo menos em parte, relacionados às suas propriedades anti-inflamatórias, bem como com a melhora da disfunção endotelial.

Dessa forma, testes para avaliar a inibição de OEZz sob outros mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, Proteína C-Reativa, entre outros, assim como sua atividade in vivo, faz-se necessária. Entretanto, nossos resultados, em conjunto com o que já foi descrito para OEZz e Zer, permitem- nos sugerir que o potencial vasodilatador de OEZz e Zer possam estar associados não apenas a sua influência direta sob o músculo liso vascular, mas também à sua atividade anti-inflamatória, muito relevante se considerarmos modelos de patologia vascular como a hipertensão, que produz acúmulo de células inflamatórias nos vasos sanguíneos, mais precisamente na camada adventícia e no tecido adiposo perivascular, estando estas células relacionadas à progressão da doença (HARRISON et al., 2012; SCHIFFRIN, 2013).

Harrison e colaboradores (2011) realizaram exame histopatológico renal de pacientes com hipertensão maligna e observaram acúmulo de infiltrado de células inflamatórias. Segundo os autores, o infiltrado de macrófagos e células T nos glomérulos de animais e humanos promove danos aos rins, com lesão no endotélio vascular e nos podócitos (HARRISON et al., 2012).

Os macrófagos possuem uma participação importante na inflamação do sistema cardiovascular, não somente nos rins, mas estão também envolvidos nos processos de fibrose e remodelamento das células cardíacas (BROWN, 2013).

Desta forma, a ação anti-inflamatória de OEZz e Zer não apenas pode estar associada a sua ação sob os vasos sanguíneos, mas também a possíveis melhoras de distúrbios em órgãos-alvo e do metabolismo de animais em modelo patológico como a hipertensão. Todavia, para sustentar essas hipóteses, a execução de novos testes faz-se necessária.

Outro fator metabólico que pode interferir no bom funcionamento vascular, renal e metabólico é o aumento na formação de EROs, caracterizando uma condição de estresse oxidativo. As EROs, além de contribuir no processo inflamatório, são capazes de inibir a vasodilatação induzida por NO de origem endotelial, posto que diminuem a biodisponibilidade deste composto, levando a alteração no tônus e, a longo prazo, ao remodelamento vascular (HSIEH,2014).

Kadoglou e colaboradores (2007) apontam que a presença aumentada de EROs esta associada à elevação na deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento da contratilidade das células do músculo liso vascular, migração de monócitos, disfunção endotelial e apoptose. Assim, buscou-se verificar neste estudo se OEZz e Zer teriam potencial antioxidante, podendo por esse mecanismo, preservar o funcionamento vascular.

Nossos resultados revelaram o potencial antioxidante do OEZz e Zer de maneira dependente de sua concentração. OEZz (100 µg/mL) e Zer (100 µg/mL) foram capazes de inibir em 95% e 80% a produção de EROs, respectivamente. Apesar da maior eficácia antioxidante do OEZz em relação a Zer, os valores de IC₅₀ não demonstraram diferença significativas em suas potências. Assim, tanto OEZz como Zer, demonstram ser capazes de neutralizar a ação de EROs. Dessa forma, a atividade antioxidante dessas substâncias poderia promover proteção de células endoteliais, conservando a biodisponibilidade de NO e preservando o funcionamento dos mecanismos vasculares em situações patológicas.

Na literatura, observa-se descrição de diversos fármacos anti-hipertensivos com potencial antioxidantes, tais como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e os antagonistas dos receptores AT₁ de angiotensina II (Ang II). Estes fármacos inibem indiretamente o estresse oxidativo por inibir o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), uma importante fonte de EROs no endotélio (PORTALUPPI, 2004; TOUYZ, 2004).

Estudos como o de Ward e colaboradores (2004) descrevem que o mecanismo antioxidante de inibidores da ECA, como o captopril, embora de forma indireta e sem uma relação dose-resposta definida, desenvolve-se por inibição dos efeitos estimulatórios de Ang II, um potente ativador da produção de EROs via NADPH oxidase. Assim, os iECA promovem não apenas a inibição dos efeitos vasoconstritores de Ang II, mas indiretamente inibem a produção de EROs.

A ação antioxidante de antagonistas de receptores AT1 da Ang II também foi relatada em modelo de ratos hipertensos. Os grupos tratados revelaram aumento no nível de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), resultando em níveis diminuídos de EROs (SÁEZ, 2004).

Em 2001, Berkels e colaboradores descreveram o mecanismo antioxidante como um sistema de colaboração indireta para preservação do bom funcionamento vascular. Neste sentido, os autores demonstraram que o uso de nifedipina, anti-hipertensivo bloqueador de canais para cálcio, em células endoteliais em cultura produz aumento na biodisponibilidade do NO endotelial, possivelmente através de sua ação antioxidante, já que não foram observadas alteração na expressão do mRNA e da proteína eNOS, mas o nível de EROs se mostrou reduzido.

Assim, apesar de nossos testes demonstrarem o potencial antioxidante do OEZz e Zer, ainda será necessário avaliar quais os mecanismos envolvidos em sua ação antioxidante. Nossos resultados, em conjunto com os dados descritos por outros autores, permitem-nos sugerir que a atividade antioxidante do OEZz e Zer, assim como suas atividades anti-inflamatórias, podem favorecer sua ação vasodilatadora sob o músculo liso vascular. Logo, infere-se que o OEZz e a Zer exerçam efeitos vasculares através de múltiplos mecanismos, que direta ou indiretamente regulam o tônus vascular, promovendo vasodilatação.

Em virtude dos fatos mencionados, nosso trabalho demonstra que o óleo essencial de *Zingiber zerumbet*, bem como seu componente majoritário – zerumbona, possuem capacidade vasodilatadora demonstrada *in vitro* e *in vivo*. Este efeito parece estar associado à sua capacidade em promover bloqueio dos canais para cálcio em células do músculo liso vascular. Sistemicamente, em animais saudáveis, o tratamento com OEZz promoveu aumento nos níveis de colesterol total, bem como de HDL e LDL, porém não modificou peso corporal ou consumo de água e ração, dessa forma sugere-se que o tratamento com OEZz possivelmente promova ativação de síntese hepática e esteja envolvida no catabolismo das moléculas de colesterol. Além disto, o tratamento promove modificações hemodinâmicas que produzem redução no ritmo de filtração glomerular, mas não evidenciamos neste estudo e nas doses testadas prejuízos

na barreira de filtração glomerular. Adicionalmente, OEZz e Zer revelaram potencial anti-inflamatório e antioxidante, de forma que estas atividades não apenas podem contribuir com os efeitos vasodilatadores, como também são componentes essenciais na inibição de efeitos lesivos em órgãos-alvo normalmente observados em patologias do sistema cardiovascular como a hipertensão e o diabetes mellitus.

As atividades vasodilatadoras observadas para o OEZz, *in vitro*, demonstram uma eficácia maior que aquelas observadas para Zer. Resultados semelhantes foram observados para os testes anti-inflamatório e antioxidante. Sabe-se que isto é comum aos óleos essenciais, por sua rica composição, sendo possível que seus constituintes possuam atividades sinérgicas, potencializando suas atividades. Todavia, a potência de Zer, equipara-se e por vezes supera a potência de OEZz, a exemplo das análises de reatividade vascular onde a potência vasodilatadora de Zer foi maior que a observada para OEZz.

Assim, OEZz e Zer revelam-se como possíveis ferramentas terapêuticas para o tratamento de distúrbios cardiovasculares. Maiores estudos em modelos patológicos e em humanos ainda precisam ser realizados para a comprovação destas hipóteses. A potencial utilização de OEZz ou Zer como fitoterápico no tratamento de distúrbios cardiovasculares, seus efeitos sobre o sistema cardiovascular em situações patológicas, sua segurança para o uso clínico e sua funcionalidade quando em combinação com outros fármacos disponíveis ainda precisa ser avaliada, entretanto, baseado nos resultados experimentais obtidos, há evidências para sugerir benefícios clínicos quando associados aos medicamentos tradicionais ou em intervenções terapêuticas como em stents farmacológicos em pacientes que sofram de doença cardiovascular.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. et al. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—a survey of European herbals from the 16th and 17th century. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 343-359, 2009.
- ADRIANA, R. et al. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas¹. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 24, n. 1, p. 151-157, 2004.
- AHMAD, R.; JAVED, S.; BHANDARI, Uma. Antiapoptotic potential of herbal drugs in cardiovascular disorders: an overview. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 4, p. 358-374, 2010.
- AKAZAWA, N. et al. Curcumin ingestion and exercise training improve vascular endothelial function in postmenopausal women. **Nutrition research**, v. 32, n. 10, p. 795-799, 2012.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76-91, 2007.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemical**, Washington, v.20, n.4, p.470-475, 1974.
- ALTMANN, Dory B. et al. Reduction in angioplasty complications after the introduction of coronary stents: results from a consecutive series of 2242 patients. **American heart journal**, v. 132, n. 3, p. 503-507, 1996.
- AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus muell.*** 2004. 151f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- ARAUJO, A. F. O. Atividade larvívica dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* em populações de *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 24-39, 2014.
- ARAÚJO, André Luis Monteiro. Avaliação in vitro da atividade de óleos essenciais sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência. **Gerodontology**, v. 32, n. 4, p. 291-295, 2015.
- ASCER, E. et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 1, p. 161-166, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association of agricultural chemists**. 17.ed, v.2, p.684, Gaithersburg: AOAC, 2000.

AZEVEDO, L. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Beverage Preserves Antioxidant and Endothelial Protective Properties Against Inflammatory Injuries in vitro After Pasteurization and Storage. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1 Supplement, p. LB355, 2015.

BACHORIK, P. S.; RIFKIND, B. M.; KWITEROVICH, P. O. **Lipídios e dislipoproteinemias. Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, Cap.10, p. 208- 36, 1999.

BADDELEY, A.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.

BAHIA, L. et al. Endotélio e aterosclerose. **Rev Socerj**, v. 17, n. 1, p. 26-32, 2004.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. **Vitória: Edufes**, 2008.

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt e RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

BASZCZUK, A; KOPCZYŃSKI, Z.; THIELEMANN, A. Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 68, p. 91-100, 2014.

BATISTA, T. M. Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo do extrato hidroalcóólico das oartas aéreas de zornia brasiliensis vog.(fabaceae). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 6, n. 2, 2014.

BELÉM, L. F. Estudo epidemiológico da pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 443-450, 2002.

BERKELS, R. et al. Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 240-245, 2001.

BEZERRA, M. AC et al. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 549-551, 2000.

BHUIYAN, M. N. I.; CHOWDHURY, Jasim Uddin; BEGUM, Jaripa. Chemical investigation of the leaf and rhizome essential oils of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith

from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 9-12, 2008.

BIRUKOV, K. G. Estiramento cíclico, espécies reativas de oxigênio e remodelação vascular. **Antioxidantes e sinalização redox**, v. 11, n. 7, p. 1651-1667, 2009.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo. v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOMBIG, M. T. N.; PÓVOA, R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo—Antagonistas dos canais para cálcio. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 16, p. 226-230, 2009

BRANDÃO, M. G. L.; ENDRINGER, D. C. Plantas medicinais. **Programa de Educação Ambiental na Bacia do Rio Piracicaba. Belo Horizonte: UFMG**, p. 173-193, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília, 2006. 182 p.

_____. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2013. 8. ed. Brasília, 2013. 157p.

_____. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. 9. ed. Brasília, 2015. 165p.

BRESSIANI, J. G. et al. Mecanismos de regulação da pressão arterial. **Ação Odonto**, n. 1, 2017.

BROWN, N. J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 8, p. 459-469, 2013.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12.ed. AMGH Editora, pp.100-109, 2012.

BUCKER, A. et al. Evaluation of larvicidal activity and brine shrimp toxicity of rhizome extracts of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 377-380, 2013.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 5, p. 323-328, 2000.

BURKILL, I. et al. **A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula**, v. 2, n. 2nd edition, 1966.

CAILLON, A.; SCHIFFRIN, E. L. Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 3, p. 21, 2016.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

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

CEBALLOS, B. S. O. et al. Atividades antimicrobianas de produtos naturais sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas recreacionais. **Rev Bras Farm**, v. 74, p. 4-6, 1993.

CERAVOLO, G. S. et al. **Papel dos principais componentes na gênese da hipertensão arterial: endotélio vascular**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, cap, 10, p. 79-89, 511p.

CERQUEIRA, R. J. G. Acoplamento ventrículo-vascular e disfunção diastólica em ratos 2SF-1, um novo modelo de Síndrome Metabólico. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 102, n. 4, p. 327-335, 2012.

CHATTOPADHYAY, R. et al. 12/15-Lipoxygenase-dependent ROS production is required for diet-induced endothelial barrier dysfunction. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 3, p. 562-577, 2015.

CHAUNG, H. C. et al. Anti-hypersensitive and anti-inflammatory activities of water extract of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **Food and agricultural immunology**, v. 19, n. 2, p. 117-129, 2008.

CHIEN, T. Y. et al. Anti-inflammatory constituents of *Zingiber zerumbet*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 584-589, 2008.

CHONG, D. Y.; MICHEL, Thomas. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

COELHO, M. G. P. et al. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 04, p. 245-251, 2013.

CONTER, L. U. et al. Screening de plantas nativas do rio grande do sul quanto ao seu potencial citotóxico na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca kb. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 13, 2015.

CÔRREA, C. C. et al. Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. In: **46th Congress, July 20-23, 2008, Rio Branco, Acre, Brasil**. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 2008.

CORRÊA-CAMACHO, Camila Renata. **Estudo da ativação de monócitos e produção de citocinas em pacientes com aterosclerose obliterante periférica**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Natural products from plant origin potentially useful in the asthma therapy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785-797, 2008.

MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

CRUZ, M. T. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates the transcription of nuclear factor kappa B and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. **Immunology and cell biology**, v. 79, n. 6, p. 590, 2001

CRUZ-ORIVE, L. M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182-198, 1999.

CUNHA, G. H. et al. Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Contemporary clinical trials**, v. 32, n. 2, p. 153-159, 2011.

CUNHA, G. M A. et al. Atividade antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará. **Rev Bras Farm**, v. 76, p. 5-6, 1995.

DA CUNHA, G. H. et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 337-345, 2013.

DAHAM, S. S. et al. In vivo toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 236, 2016.

DAI, D. N. et al. Chemical constituents of the root essential oils of *Zingiber rubens* Roxb., and *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 01, p. 7, 2013.

DE MOURA, R. S. et al. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 288-294, 2005.

EATON, D.; POOLER, J. **Fisiologia renal de Vander**. Artmed Editora, 2015.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ELLESS, M. P. et al. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 181-188, 2000.

ELLIOTT, S.; BRIMACOMBE, J. The medicinal plants of Gunung Leuser National Park, Indonesia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 285-317, 1987.

FARIAS, N. M. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar. **XVI Prêmio Jovem Cientista. Edição: Saúde da população, Controle da Infecção Hospitalar**, 2000.

FLEENOR, B. S. et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 2, p. 269-276, 2013.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

AHMAD, R.; JAVED, S.; BHANDARI, U.. Antiapoptotic potential of herbal drugs in cardiovascular disorders: an overview. **Pharmaceutical biology**. v. 48, n. 4, p. 358-374, 2010.

FONSECA, F. A. H. Pharmacokinetics of statins. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 85, p. 9-14, 2005

FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. Serum tryglicerides determined colorimetrically with an enzyme of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 28, p. 2077-80, 1982.

FRANÇA, I. S. X. de et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

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

FUSI, F. et al. In vitro vasoactivity of zerumbone from *Zingiber zerumbet*. **Planta medica**, v. 81, n. 04, p. 298-304, 2015.

GALLØE, A. M. et al. 10-Year clinical outcome after randomization to treatment by sirolimus-or paclitaxel-eluting coronary stents. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 6, p. 616-624, 2017.

GALVÃO, A. L. B. et al. Importância da inflamação na hipertensão arterial: Revisão. **Nucleus Animalium**, v. 6, n. 1, p. 11, 2014.

GAVIER, W. C. A positive inotropic effect of phenylephrine mediated through alpha adrenergic receptors. **Life sciences**, v. 6, n. 13, p. 1361-1365, 1967.

GHAREIB, S. A. et al. Protective effect of zingerone on increased vascular contractility in diabetic rat aorta. **European journal of pharmacology**, v. 780, p. 174-179, 2016.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 500, 2005.

GOLTZMAN, D. 5 Parathyroid Hormone: Its Role in Calcium and Phosphate Homeostasis. **The Physiological Basis of Metabolic Bone Disease**, p. 103, 2014.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUÉRIOS, E. E. et al. Stents. Uma revisão da literatura. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 71, n. 1, p. 77-87, 1998.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1-6, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.

HALL, J. E. **Guyton e Hall Tratado De Fisiologia Médica**. 13.ed. Brasil:Elsevier, 2017.

HARRISON, D. G.; MARVAR, Paul J.; TITZE, Jens M. Vascular inflammatory cells in hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 3, 2012.

HE, X. et al. ASK1 associates with troponin T and induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 1, p. 243-251, 2003.

HENRIQUES, M. G. M. O. et al. Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 02, p. 58-66, 2013.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. 2. ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. v. p. p. 278.

HSIEH, H. J. et al. Mecanotransformação endotelial induzida por cisalhamento: a interação entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) e as implicações fisiopatológicas. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 3, 2014.

ICHIKAWA, L.; BRENNER, B. M. Importância do tom vascular arteriolar eferente na regulação da reabsorção do líquido do túbulo proximal e do equilíbrio glomerulotubular no rato. **Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 5, p. 1192, 1980.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2014.

KADOGLOU, N. P. et al. Exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 30, n. 3, p. 719-721, 2007.

KASTRATI, A. et al. Sirolimus-eluting stent or paclitaxel-eluting stent vs balloon angioplasty for prevention of recurrences in patients with coronary in-stent restenosis: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 293, n. 2, p. 165-171, 2005.

KIERNAN, J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice. **Shock**, v. 12, n. 6, p. 479, 1999.

KIERSZENBAUM, A.; TRES, L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 4ªed. Elsevier Brasil, 2016.

KIM, M.; YUN, J. Anti-inflammatory Effects of Zerumbone on Chronic Inflammation Models in Differentiated Human THP-1 Monocytes Induced by Lipopolysaccharide. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1 Supplement, p. Ib330-Ib330, 2017.

KIRBY, R. S. et al. Prazosin in the Treatment of Prostatic Obstruction A Placebo-controlled Study. **BJU International**, v. 60, n. 2, p. 136-142, 1987.

KON, V. et al. Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. **Kidney international**, v. 44, n. 3, p. 545-550, 1993.

KOUGIAS, P. et al. Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 16, n. 1, p. RA1, 2010.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.

KRESS, W.J. et al. The molecular phylogeny of *Alpinia* (zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of ginger. **American Journal of Botany**, v.92, n.1, p.167-78, 2005.

KUMAR, S. C S. et al. Síntese, atividade antibacteriana e antimutagênica de análogos de zerumbone-bicarbonilo. **Química alimentar**, v. 221, p. 576-581, 2017.

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. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, v.17, n.3, p.323-30, 2003.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. *Planta Medica*, v.68, n.12, 1097-102, 2002.

LEAL, L.; TELLIS, C.. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 4, p. 261-264, 2016.

LEAL-CARDOSO, J.H. et al. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v.11, p.549-53, 2004.

LEMOS, P. A.; SERRUYS, P. W.; SOUSA, J. E. Drug-eluting stents. **Circulation**, v. 107, n. 24, p. 3003-3007, 2003.

LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Article Details Cytotoxicity, antitumour and anticarcinogenic activity of *Curcuma longa* essential oil. **Indian drugs**. v. 51, n. 3, p. 28-34, 2014.

LIMA, E. O. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa-Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados**. 1996. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, E. O. et al. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Rev. bras. ciênc. saúde**, v. 7, n. 3, p. 251-258, 2003.

LIU, S.; LIU, I. **Extract of *Zingiber zerumbet* for relieving symptoms of diabetic retinopathy**. U.S. Patent n. 9,682,117, 20 jun. 2017.

LUZ, P. L. et al. Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, p. 131-60, 2003.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, p. 105-127, 2011.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALKOFF, J. Non-invasive blood pressure for mice and rats. **Animal Lab News, Kent Scientific Corporation**, p. 1-12, 2005.

MARMITT, D. J. et al. Revisión sistemática de las plantas de interés para el Sistema de Salud con potencial terapéutico cardiovascular. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 108-124, 2016.

MÁRQUEZ, C. E. et al. Non-pharmacological intervention as a strategy to improve antihypertensive treatment compliance. **Atencion primaria/Sociedad Espanola de Medicina de Familia y Comunitaria**, v. 41, n. 9, p. 501-510, 2009.

MARTELLI, A. Sistema renal e sua influência no controle em longo prazo da pressão arterial. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2015.

MATLUNG, H. L.; BAKKER, E. N. T. P.; VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. **Antioxidants e redox signaling**, v. 11, n. 7, p. 1699-1709, 2009.

MAYHEW, T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, v. 76, n. 5, p. 639-665, 1991.

MENEZES I. A.; MOREIRA I. J.; CARVALHO A. A.; ANTONIOLLI A. R.; SANTOS M. R. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascul Pharmacol**. 2007;47(1):41-7. 17.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 1, p. 316-20, 2005.

MIKOLAJCZYK, T. P. et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 5, p. 1987-1999, 2016.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2014.

MIRANDA, A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213, 2016.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MOREIRA, D. L. et al. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. in mice behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 33-57, 2001.

MORGAN, D. ML. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Polyamine protocols**, p. 179-184, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, R.S. et al. Antihypertensive and endotheliumdependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n.3, p.288-94, 2005.

MOUTON, P. R. **Unbiased stereology: a concise guide**. 1. ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, 2011. v. p. p.

MUKHERJEE, D. et al. Indução de apoptose por zerumbone isolada de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith em parasita de protozoários *Leishmania donovani* por estresse oxidativo. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 48-55, 2016.

MUKHERJEE, P. K. et al. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. **Planta medica**, v. 73, n. 03, p. 283-285, 2007

NETO, S. et al. **Estudo dos efeitos vasculares e renais causados pelo 6-gingerol isolado do gengibre**. 2012. Tese de Doutorado.

NEVES, M. F.; OIGMAN, W. Pré-hipertensão: uma visão contra o tratamento medicamentoso. **Rev Bras Hipertens**, v. 16, n. 2, p. 112-5, 2009.

NORULAINI, N. A N. et al. Optimization of SC–CO₂ extraction of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L) Smith. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 702-705, 2009.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.9, n.1, p.93-105, 2007.

OLIVEIRA, D. R. de et al. Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. e de seu componente majoritário, β -cariofileno. 2016.

ORIVE, L. M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15-27, 1980.

OSHIRO, M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 116-122, 2016.

PAKULA, A. M.; SKINNER, R. A. Acute kidney injury in the critically ill patient: a current review of the literature. **Journal of intensive care medicine**, v. 31, n. 5, p. 319-324, 2016.

PELLIZZARO, M. C.; PANCHENIAK, E. F. R. Assistência farmacêutica no tratamento de doenças cardiovasculares e hipertensão. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, p. 2003, 2003.

PICOLI, T. et al. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmsO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). **Science and animal health**, v. 3, n. 2, p. 159-168, 2015.

PINHO, F.S.V.A. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v.12, p.482-6, 2005.

PINTO, N. V. et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1, 8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151-1155, 2009.

PORTALUPPI, F.; BOARI, B.; MANFREDINI, R. Oxidative stress in essential hypertension. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 14, p. 1695-1698, 2004.

PROENÇA DA CUNHA, A.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos Aromáticos (Plantas aromáticas e Óleos Essenciais)'. **Fundação Calouste Gulbenkian (ed.), Farmacognosia e Fitoquímica**, 2010.

QUARESMA, A. B. et al. Estudo bioquímico do sangue de ratos após ligadura do ducto hepático direito. **Arq Catar Med**, v. 32, p. 21-32, 2003.

RANA, V. S. et al. Essential oil composition, antifungal, and seedling growth inhibitory effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* Smith. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 4, p. 320-329, 2017.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J., e HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

ROBERTSON, D.; BIAGGIONI, I. Fármacos antagonistas de adrenoceptores. **Farmacologia Básica e Clínica-13**, p. 152, 2017.

RODRIGUES, F. A. Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 1872-1878, 2013.

RODRIGUES, Vanessa Raquel Fonseca et al. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 97-103, 2014.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 801, 1993.

RUSLAY, S.; ABAS, F.; SHAARI, K. *et al.*, "Characterization of the components present in the active fractions of health gingers (*Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber zerumbet*) by HPLC-DAD-ESIMS," **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1183–1191, 2007.

SADEGHI, I. et al. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n. 1, p. 70-4, 2013.

SADO KAMDEM, S. L. et al. Effect of mild heat treatments on the antimicrobial activity of essential oils of *Curcuma longa*, *Xylopiya aethiopica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* against *Salmonella enteritidis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 1, p. 52-60, 2015.

SÁEZ, G. T. et al. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. **American journal of hypertension**, v. 17, n. 9, p. 809-816, 2004.

- SAIDA, K.; BREEMEN, C. V. Mechanism of Ca⁺⁺ antagonist-induced vasodilation. Intracellular actions. **Circulation research**, v. 52, n. 2, p. 137-142, 1983.
- SANTOS FILHO, E. X. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. **Toxicol. Rep. Article accepted**, 2015.
- SANTOS, K. T. et al. Cardiovascular effects of the essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 177-183, 2014.
- SATO, J. et al. Dietary antioxidants preserve endothelium dependent vasorelaxation in overfed rats. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 327-333, 2002.
- SAYYAH, M.; VALIZADEH, J.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 212-216, 2002.
- SCHIFFRIN, E. L. The immune system: role in hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 29, n. 5, p. 543-548, 2013.
- SCHMITTE, F.; GLAESER, J. C. Marcadores de função renal utilizados no diagnóstico laboratorial. **Revista NewsLab. Ed**, v. 124, p. 94-98, 2014.
- SCHULZ, V. et al. **Rational phytotherapy: A reference guide for physicians and pharmacists**. Springer Science e Business Media, 2013.
- SEN, P. et al. Contact dermatitis: a common adverse reaction to topical traditional Chinese medicine. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 11, p. 1255-1260, 2010.
- SHIEH, Y. et al. Zerumbone enhances the Th1 response and ameliorates ovalbumin-induced Th2 responses and airway inflammation in mice. **International immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 383-391, 2015.
- SIDAHMED, H. M. A. et al. Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti-helicobacter pylori activity of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121060, 2015.
- SILANO, M. et al. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 107-116, 2004.
- SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVA,I.; FRANCO,S.L.; MOLINARI,S.L.; CONEGERO,C.I.; MIRANDA M.H.; CARDOSO,M.L.C.; SANTIANA,D.M.G.; IWANKO,N.S. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 1995.

SINGH, C. B. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil of rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **J Pharmacog Phytochem**, v. 3, n. 3, p. 130-133, 2014.

SIROTA, J. C.; KLAWITTER, J.; EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of acute kidney injury. **Journal of toxicology**, v. 2011, 2011.

SOARES, D. et al. Estudo dos níveis lipídicos em ratos após tratamento com infusão de algumas plantas medicinais de uso popular. **Rev Bras Farm**, v. 86, n. 2, p. 71-74, 2005.

SOLZBACH, U. et al. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1513-1519, 1997.

SOMCHIT, M. N. eSHUKRIYAH, M. H. N. "Anti inflammatory property of ethanol and water extracts of *Zingiber zerumbet*," **Indian Journal of Pharmacology**, vol. 35, no. 3, pp. 181–182, 2003.

SOMCHIT, M. N. et al. Anti-pyretic and analgesic activity of *Zingiber zerumbet*. **Int J Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 277-280, 2005.

SON, Y. K. et al. The inhibitory effect of curcumin on voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 430, n. 1, p. 307-312, 2013.

SOUSA, T. et al. Lipid peroxidation and antioxidants in arterial hypertension. In: **Lipid Peroxidation**. InTech, 2012.

SOUZA, H. Paredes et al. Análise espacial de causas de morte por doenças cardiovasculares e fatores associados em uma área de implantação de um grande empreendimento. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 13, n. 24, p. 199, 2017.

SOUZA, J. R. M., OLIVEIRA, R. T., BLOTTA, M. H. S., COELHO, O. R. Serum levels of interleukin-6 (Il-6), interleukin-18 (Il-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

SOUZA, P. G. de et al. **Estudo do potencial biotecnológico do rizoma de *Zingiber zerumbet* L. Smith como adjunto na produção de cerveja artesanal**. 2015. 7f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas e nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2012

SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K. The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 61, n. 4, p. 364-369, 1991.

SRIVASTAVA, A.K. Essential oil composition of Zingiber zerumbet (L.) Sm. from India. **Journal of Essential Oil Research**. v.12, p. 595-597, 2000.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflammation and atherosclerosis. **Stroke**, v. 37, n. 7, p. 1923-1932, 2006.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World journal of cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719, 2015.

SULAIMAN, M. R. et al. Anti-inflammatory effect of zerumbone on acute and chronic inflammation models in mice. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 855-858, 2010.

SZASZ, T.; THAKALI, K.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. **Exp. Biol. Med.**, 232: 27-37; 2007.

TEIXEIRA, A. **Efeito dos monoterpenóides limoneno, carveol e álcool perílico no músculo liso vascular**. 2013. 77f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

TEIXEIRA, B. C. et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal vascular brasileiro**, v. 13, n. 2, 2014.

TIRAPELLI, C. R. et al. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 690-702, 2010.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-252, 2004.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

TUSHAR, P. et al. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 286-296, 2010.

TUSHAR, P. et al. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 286-296, 2010.

TZENG, T. F. et al. The ethanol extract of *Zingiber zerumbet* attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SILVA, H. G. V; MAYA, M. C. A.; MOREIRA, A. S. Parathyroidectomy in chronic kidney disease: effects on weight gain and on quality of life improvement. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 3, p. 263-269, 2017.

VICENTE, A. et al. Levantamento botânico. **Carvalho, CM e Vilar, JC (coords.). Parque Nacional Serra de Itabaiana–levantamento da biota. Ibama, Aracaju**, p. 15-37, 2005.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 46, n. 5, p. 514-519, 2002.

WANI, N. A. et al. Inhibition of metabolic reprogramming by zerumbone alters the tumorigenic potential of hepatocellular cancer. **Cancer Res**, v. 77, n. 13, p. 167-189, 2017.

WARD, N. C. et al. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 2, p. 226-232, 2004.

WEIBEL, E. R. Stereological methods. **Practic methods for biological morphometry**, v.4, n.2, p. 1-17, 1980.

WESELER, A. R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 3, p. 154-161, 2010.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable disease 2017**. Geneva; 2017.

XU, P. et al. The relaxant effect of curcumin on porcine coronary arterial ring segments. **Vascular pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 25-30, 2007.

YASSA, N. et al. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 175-180, 2015.

YU, F. et al. Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. **FEBS Letters**. v.582, p.565-572, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAKARIA, Z. A.; MOHAMAD, A. S.; CHEAR, C. T.; WONG, Y. Y.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. "Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber zerumbet* methanol extract in experimental model systems," **Medical Principles and Practice**, vol. 19, no. 4, pp. 287–294, 2010.

ZAKARIA, Z. A. et al. Preliminary analysis of the anti-inflammatory activity of essential oils of *Zingiber zerumbet*. **Biological research for nursing**, v. 13, n. 4, p. 425-432, 2011.

ZINKEVICH, N.a S.; GUTTERMAN, D. D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 3, p. H647-H653, 2011.

APÊNDICE

- **Artigo publicado na revista *Scientia Amazonia*.**

Macrófagos de fenótipo M1 e M2 associados à disfunção endotelial¹.

Anne Carolline dos Santos Graça² e José Wilson do Nascimento Corrêa³

Resumo

Estudos envolvendo a polarização de macrófagos têm gerado vários resultados que evidenciam a associação dos diferentes fenótipos de macrófagos com a disfunção endotelial e outras doenças cardiovasculares. Atualmente, existem dois fenótipos de macrófagos bem descritos, os macrófagos classicamente ativados (M1), também conhecidos como macrófagos pró-inflamatório e os alternativamente ativados (M2), conhecidos como macrófagos anti-inflamatórios. Estudos indicam que a presença de macrófagos do subtipo M1 aumenta a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , o que leva a uma série de alterações inflamatórias no tecido vascular. Essas alterações contribuem para a ativação do endotélio, disfunção endotelial e até mesmo com a hipertensão. Por outro lado, a presença de macrófagos M2 tem sido relacionada à melhora da disfunção endotelial, promovendo melhora da função do endotélio e redução na pressão arterial, porém, em grande número, podem promover fibrose e remodelamento tecidual. Essas informações tornam-se importantes, essencialmente pela possibilidade de proporcionar novos elementos terapêuticos no combate das doenças vasculares. Assim sendo, o objetivo desta revisão é relatar os principais avanços científicos que apontam para a relação de macrófagos M1 e M2 associados à disfunção endotelial.

Palavras-Chave: disfunção endotelial, macrófagos M1, macrófagos M2, polarização de macrófagos.

Abstract

Studies involving macrophage polarization have generated several results that show an association of the different phenotypes of macrophages with endothelial dysfunction and other cardiovascular diseases. Currently, there are two well-defined macrophages phenotypes, classically activated macrophages (M1), also known as pro-inflammatory macrophages and the alternatively activated macrophages (M2), known for its anti-inflammatory abilities. Such studies indicate that the presence of M1 macrophages increases the production of inflammatory cytokines, such as TNF- α , which leads to many inflammatory non-vascular tissue changes. These contribute to endothelial activation, endothelial dysfunction, and even hypertension. On the other hand, the presence of M2 macrophages has been associated with the improvement of endothelial dysfunction, in a way they can restore endothelial function and reduce blood pressure. However, a large population of M2 macrophages on tissues can induce fibrosis and tissue remodeling. The role of the different macrophage phenotypes in the context of cardiovascular diseases is an exciting field of investigation that can open new avenues to target vascular diseases therapeutics. Thus, this review aimed to report the main scientific advances that point a relationship between M1/M2 macrophages and the endothelial dysfunction.

Key-words: endothelial dysfunction, M1 macrophages, macrophages M2, macrophage polarization.

1. Introdução

O conhecimento sobre a polarização de macrófagos e sua relação com o endotélio está em constante progresso. Os diferentes fenótipos de macrófagos têm sido alvos de diversos estudos, uma vez que se tem demonstrado como podem estar associados com a manutenção de diferentes patologias.

A princípio, os primeiros fenótipos de macrófagos a serem descritos foram: macrófagos classicamente ativados (chamados de M1)⁴⁵ e os macrófagos alternativamente ativados (chamados de M2)⁵¹. Acreditava-se que estes seriam os únicos fenótipos de macrófago existentes, porém, posteriormente, estudos de Mosser e Edwards (2008)⁴³ observando o espectro completo de ativação dos macrófagos, relataram que M1 e M2 seriam somente as extremidades deste espectro, logo, haveriam outros fenótipos de macrófagos a serem descritos. Em 2010, novos fenótipos de macrófagos foram descobertos e descritos como M4 e Mox^{18,22}.

Inicialmente, o endotélio era conhecido apenas por ser uma monocamada de células que cobrem o lúmen vascular. Até que em 1980, Furchgott e Zawadzki⁶, relatam um fator, produzido pelo endotélio vascular, que promovia vasodilatação induzida por acetilcolina. A partir daí o endotélio deixou de ser apenas uma estrutura anatomicamente importante, para ser bioquimicamente atuante na função vascular e fisiologia do sangue. Hoje, sabe-se que ele é metabolicamente ativo e desenvolve funções como: controlar o transporte de pequenas e grandes moléculas, manter a estrutura da parede vascular, controlar a dilatação e a contração, promover angiogênese e produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte de células do músculo liso vascular^{9,50,58}. Assim sendo, atualmente atribui-se ao endotélio vários papéis importantes, tanto em eventos fisiológicos quanto

fisiopatológicos como observado no diabetes mellitus⁶, hipertensão arterial⁵, aterosclerose³³ e outras doenças cardiovasculares³².

Deste modo, a presente revisão tem como objetivo reunir e relatar os principais estudos científicos relacionados a macrófagos M1 e M2 associados à disfunção endotelial, bem como os fatores que parecem contribuir para a polarização de macrófagos entre os diferentes fenótipos.

2. Metodologia

Para elaboração desta revisão, realizou-se um levantamento bibliográfico utilizando as palavras-chave: “endothelial dysfunction”, “M1 macrophage”, “M2 macrophage”, “polarization of macrophages”, “endothelium function”, “macrophage plasticity” e “função e disfunção endotelial”. A pesquisa foi realizada nos seguintes sites de busca: Google Acadêmico, Periódicos Capes, Pubmed, SciELO, Science Direct, Scopus e Web of Science. Foram encontrados inúmeros artigos, no período de 1905a 2016, destes foram selecionados 365, dos quais 100 apresentavam o assunto de maneira mais direta ao tema proposto, dos quais 61 foram tomados como fundamento para esta revisão.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Perspectiva histórica dos macrófagos e sua polarização.

A primeira descrição para os macrófagos ocorreu em 1883, quando Eli Metchnikoff descreve pela primeira vez os fagócitos (palavra grega que significa “células que comem”) a partir da observação de células de estrelas e esponjas do mar capazes de englobar partículas e espinhos. Posteriormente, descobriu que estas células eram eficazes na eliminação de patógenos, tanto em invertebrados quanto em vertebrados³⁸.

Metchnikoff também foi o responsável pela base do conceito de

ativação dos macrófagos, quando em 1905, relatou que os macrófagos de animais infectados possuíam uma maior capacidade microbicida^{15,38}.

Por volta de seis décadas depois, o mecanismo de eliminação de patógenos pelos macrófagos foi gradativamente esclarecido, porém, ainda não era claro como os macrófagos tinham sua capacidade fagocítica melhorada frente a uma infecção.

Em 1973, estudos como o de Norte e colaboradores¹⁴, mostraram que existiam fatores celulares independentes, isto é, sem o envolvimento de agentes patogênicos, que promoveriam a ativação dos macrófagos. Davi et al.⁷ sugeriram que os linfócitos seriam as principais células responsáveis pela ativação dos macrófagos, o que aumentaria sua capacidade microbicida.

Estudos seguintes, identificaram o interferon-gama (IFN γ), secretado pelos linfócitos, como sendo o principal fator de interação com os macrófagos. Assim sendo, este seria o responsável pela ativação de macrófagos em repouso, uma vez que ao interagir com os mesmos promovia um aumento do potencial fagocítico, da secreção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores tóxicos como as espécies reativas de oxigênio (ROS)⁴⁵.

Sendo este o primeiro mecanismo de ativação descrito, macrófagos ativado desta forma passaram a ser chamados de macrófagos classicamente ativado ou macrófagos M1.

Com o avanço das pesquisas com células imunitárias, em 1989, surgiu o conceito de heterogeneidade de células T helper (Th), propondo-se o conceito de Th1 e Th2⁴².

A partir disto, investigou-se as citocinas produzidas por esses tipos de linfócitos. Abramson et al. (1990)¹⁹ descreveram a interleucina-4 (IL-4), secretada por linfócitos Th2, como sendo um fator de ativação dos macrófagos. Porém, esta nova forma de ativação induziria os macrófagos a uma polarização diferente da descrita

anteriormente, a clássica. A ativação de macrófagos por IL-4 os induziria a adquirirem um fenótipo distinto, com produção de ROS diminuída e aumento na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe 2 (MHC-2), características estas divergentes do fenótipo M1.

Estudos de Stein et al.⁵¹, corroboraram com os estudos de Abramson (1990)¹, ao descobrir que tanto IL-4 quanto IL-13 interagem com os macrófagos pelo receptor de manose 1 (MCR1), expresso na superfície celular deste. Esta interação seria a responsável pelo aumento na expressão de MHC-2, além de desenvolver características fenotípicas diferentes de M1. Sendo assim, desenvolveu-se o conceito de macrófagos alternativamente ativado, também ditos macrófagos M2.

Com o avanço das pesquisas, Mosser e Edwards (2008)⁴³ sabendo que a plasticidade dos macrófagos refletia a diferentes estímulos presente no microambiente no qual ele estava inserido, passaram a analisar o espectro completo de ativação dos macrófagos, como resultado, eles apontaram que M1 e M2 não eram os únicos

Atualmente, estudos têm colaborado para elucidação desta polarização. Em 2010, Gleissner et al. e Kadl et al. descreveram dois novos fenótipos de macrófagos denominados de M4 e Mox^{18,22}. Além disto, múltiplas descobertas têm demonstrado como esses diferentes tipos de fenótipos podem estar diretamente associados ao desenvolvimento de patologias, a exemplo da aterosclerose³², diabetes mellitus⁶, hipertensão arterial⁵, asma⁴¹, infecções por diferentes patógenos³⁰, entre outras.

3.2 Macrófagos classicamente ativado (M1).

De modo geral, os macrófagos M1 são caracterizados por participarem da resistência contra parasitas intracelulares e no desenvolvimento de tumores. São conhecidos por sua atividade pró-

inflamatória e ativados através da ação de substâncias como lipopolissacarídeos (LPS), interferon-gama ($IFN\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina-1 (IL-1)^{21,34,36}, agonistas de receptores do tipo Toll (TLR)¹⁶, especificamente agonistas dos TLR4¹¹, bem como agonistas do transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1)⁴⁷. O acoplamento do agonista ao TLR desencadeia a cascata de ativação do fator nuclear kappa B ($NF-\kappa B$) promovendo a secreção de mediadores inflamatórios característicos do fenótipo M1³. Além disso, macrófagos M1 exercem atividades citotóxicas que resultam da liberação de grande quantidade de óxido nítrico a partir da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e de espécies reativas de oxigênio (ROS)²⁸. Macrófagos M1 também podem ser identificados por possuírem uma elevada expressão de receptores com estruturas colagenosas (MARCO) e supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3), além de secretarem citocinas como $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, bem como produzirem ciclooxigenase 2 (COX2) e idoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1)⁴⁴. Desta forma, macrófagos M1 são considerados potentes células efetoras intimamente relacionadas aos processos inflamatórios em um organismo.

3.3 Macrófagos alternativamente ativados (M2)

A via da cascata Th2 produz citocinas que promovem a diferenciação de macrófagos para o subtipo M2. Estes macrófagos estão envolvidos nas respostas anti-inflamatórias e atuam na manutenção da homeostase tecidual. As principais substâncias que provocam essa diferenciação são IL-4 e IL-13⁵¹. Receptores de IL-4 presentes nos macrófagos, estimulados por seu agonista, ativam STAT6 que por sua vez ativa a transcrição de genes típicos do fenótipo M2⁴⁸. A resposta anti-inflamatória produzida por macrófagos M2 é seguida por remodelamento

tecidual funcional e angiogênese local³¹. Além disso, macrófagos M2 estão envolvidos na imunoregulação e nas reações alérgicas³⁵ através da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-13, IL-10, IL-12 e TGF- β ^{21,35,36,44}. Em geral, estes macrófagos também são caracterizados por expressar receptor de manose tipo C1 (MRC1), supressor de sinalização de citocinas tipo 2 (SOCS2), fator de regulação de interferon tipo 4 (IRF4), ligante de quimiocina (CXC) tipo 13 (CXCL13), ligante de quimiocina (CC) tipo 12 (CCL12) e ligante de quimiocina (CC) tipo 24 (CCL24)⁴⁴.

3.4 Disfunção endotelial

O endotélio representa uma camada única de células pavimentadas que recobre o interior dos vasos sanguíneos, localizando-se entre a corrente sanguínea e a parede dos vasos². As células que compõem o endotélio são chamadas de células endoteliais e são as responsáveis por proporcionar uma barreira anticoagulante, além de funcionar como uma barreira de permeabilidade seletiva⁵².

Anteriormente, acreditava-se que o endotélio era uma camada passiva na atividade vascular. Porém, com o desenvolvimento das pesquisas vasculares, observou-se que o endotélio estava associado à atividade de relaxamento promovida pela acetilcolina¹⁵. Atualmente, além da atividade do endotélio sobre a vasodilatação, aponta-se que o endotélio possui funções primordiais para o bom funcionamento vascular, uma vez que ele é capaz de detectar estímulos mecânicos e hormonais. Em resposta a estes estímulos, possui a capacidade de secretar substâncias que regulam a função vasomotora (vasoconstrição e vasodilatação), desencadeiam processos inflamatórios e afeta a hemostasia. As principais substâncias vasodilatadoras sintetizadas pelo endotélio são: o óxido nítrico (NO), as prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio¹².

Endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), tromboxano A₂ e espécies reativas de oxigênio (ROS) representam os principais vasoconstritores produzidos pelo endotélio^{31,56}. Além destas substâncias, o endotélio também é capaz de produzir moduladores inflamatórios como o próprio NO, moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1), E-selectina e NF-κB⁵⁶. A liberação adequada dessas substâncias vasoativas e da expressão dessas moléculas de adesão, na superfície das células endoteliais, mantém o estado de homeostase.

Inicialmente, a disfunção endotelial foi descrita como uma vasodilatação prejudicada, mesmo frente a estímulos específicos, como acetilcolina. Entretanto, hoje, compreende-se o termo não se restringe apenas a redução da capacidade vasodilatadora, mas refere-se também a um estado pró-inflamatório e pró-trombótico desenvolvidos pela ativação das células endoteliais¹².

A disfunção endotelial tem sido associada à progressão de doenças como a hipertensão arterial⁴⁹, a aterosclerose⁸, entre outras doenças cardiovasculares⁴.

3.5 Macrófagos M1 associados à disfunção endotelial.

Muitos estudos têm sido realizados para investigar como os fenótipos dos macrófagos, sobretudo M1 e M2, podem influenciar no desenvolvimento e na manutenção da disfunção endotelial, bem como de outras patologias.

Estudos recentes, como de Metcalf (2015)³⁷, feito com meio de cultura acondicionado (MC) a partir de macrófagos M1 e M2, postos em cocultura com células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) demonstraram aumento na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e aumento nos níveis de TNFα quando co-cultivados com MC oriundos de M1. No mesmo trabalho, é realizado o mesmo experimento com MC oriundo de macrófagos associados ao

glioblastoma e estes promovem respostas semelhantes aos M1. Em conjunto estas respostas promovem um estado pró-inflamatório sob as células endoteliais, ampliando o recrutamento de macrófagos por meio do aumento na regulação das moléculas de adesão, além de promover propriedades pró-trombóticas e o extravasamento vascular, induzindo a neovascularização do glioblastoma.

Na aterosclerose, múltiplas pesquisas têm indicado que a diferença na concentração de macrófagos com diferentes fenótipos é extremamente importante na determinação da fragilidade da placa aterosclerótica, pois o aumento da concentração do macrófago M1 produz um maior processo inflamatório, seguido por crescimento da placa, redução da estrutura fibrosa, maior chance de ruptura e de eventos tromboembólicos. Esta sucessão de eventos pode provocar a isquemia periférica de membros inferiores ou de órgãos alvos como o coração e o cérebro^{13,17,55}.

Estudos como o de Landry et al. (1997)²⁷, utilizando um modelo de lesão arterial em ratos, mostram que a presença de TNFα, que por sua vez é um dos principais produtos secretados por macrófagos M1³⁴, ativa o fator de transcrição nuclear κB (NF-κB), levando a uma série de alterações inflamatórias no tecido vascular como, por exemplo, o aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e do músculo liso vascular, possibilitando um aumento do infiltrado de macrófagos, mantendo, assim, o estado inflamatório. Essas alterações resultam em ativação endotelial que contribui para o desenvolvimento de disfunção endotelial.

Guzik et al. (2007)¹⁹, analisando a importância patofisiológica do aumento de TNF-α, tratou camundongos C57BL/6 com etanercept, um inibidor do TNFα, no modelo de hipertensão arterial por infusão de angiotensina II (Ang II). Os resultados revelaram que o tratamento com etanercept impediu o

desenvolvimento de hipertensão induzida pela Ang II, além de reduzir a produção de superóxido (O_2^-) vascular, inibindo o estresse oxidativo. Estes dados corroboram ainda mais com a relação entre a presença de macrófagos M1 (produtor de TNF- α) e a manutenção da hipertensão arterial e suas complicações.

Segundo Ferreira et al. (2013)¹⁴, o condicionamento de HUVECs com TNF α , induz ao estado inflamatório nas células endoteliais, já que nesta condição ocorre aumento na expressão de marcadores inflamatório como ICAM-1, E-selectina, MCP-1, IL-8 e IL-6, os quais podem estar associados ao desencadeamento de eventos cardiovasculares graves. Estes estudos mostram ainda que o uso de substâncias inibidoras de citocinas pró-inflamatórias como a grelina, pode reduzir o estado inflamatório de maneira concomitante à redução de IL-8, MCP-1 e inibição da ativação do NF- κ B^{29,53}.

A proteína reativa C (PCR) tem sido descrita como um marcador de risco independente na predição de doenças cardiovasculares. Assim sendo, a mesma já tem sido associada à disfunção endotelial^{54,10}. Estudos, como o de Devaraj et al. (2011)¹⁰, avaliaram como a PCR influencia na polarização de M1 e M2, interferindo assim no quadro de disfunção endotelial. Seus resultados descrevem que o tratamento com PCR resulta numa significativa polarização para M1, visto a partir da elevação de TNF α , IL-6, IL-1 β e MCP-1, condição esta que promove a manutenção do quadro de disfunção endotelial. Outro achado importante, neste mesmo trabalho, é a descrição da conversão de macrófagos M2 para o fenótipo M1 frente à incubação com PCR, corroborando o conceito de que os estímulos presentes no microambiente é quem determinarão para qual fenótipo os macrófagos irão se polarizar. Adicionalmente, os autores demonstram a plasticidade deste processo, com modificação fenotípica mesmo em macrófagos já diferenciados para um determinado fenótipo. Isto é,

observa-se a possibilidade de conversão entre um fenótipo e outro, dependendo do estímulo recebido por estas células.

Assim como os estudos anteriores, Kawanishi et al.²³(2010), em seus estudos com o tecido adiposo, demonstra que macrófagos M1 estão envolvidos na manutenção do estado inflamatório crônico, enquanto macrófagos M2 inibem este estado.

No quadro de hipertensão arterial, estudos como o de Moore et al. (2015)³⁹, demonstraram que nessa condição há acúmulo de macrófagos M2 na parede da aorta de camundongos. Já havia sido determinado por outros pesquisadores a deposição de macrófagos na aorta e como isso colabora para a fibrose e enrijecimento das artérias^{20,40,57}. Neste trabalho, o autor descreve como a polarização de macrófagos ocorre no desenvolvimento da hipertensão, demonstrando que entre 14-28 após a infusão de Ang II, os macrófagos que se acumularam nesse intervalo de tempo indicam ser M2, com base na sua expressão de MCR1, arginase-1 e na diminuição na expressão de iNOS. Porém, estudos anteriores^{25,26}, realizados nos estágios iniciais da hipertensão, entre os 7 dias iniciais após a infusão de Ang II, relataram que macrófagos M1, avaliados pela expressão de iNOS, estavam acumulados na aorta, o que promoveria a inflamação vascular através do recrutamento de células Natural Killer, aumentando a produção de INF γ e produzindo disfunção endotelial pelo desacoplamento da óxido nítrico sintase produzida pelo endotélio (eNOS).

Entende-se, a partir destes estudos que a mudança no estado de ativação dos macrófagos na parede dos vasos é dependente do tempo de desenvolvimento da hipertensão, assim sendo, no início da hipertensão a presença de M1 estaria associada a inflamação vascular e disfunção endotelial. Porém, com o progresso da doença, os macrófagos se polarizariam para um fenótipo M2, contribuindo no enrijecimento das artérias, uma vez que produzem TGF β e

fator de crescimento derivado de plaquetas, os quais influenciam na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, aumentando a produção de colágeno⁶¹.

Estudos como o de Khallou et al. (2010)²⁴, indicam que em contato com o meio acondicionado de macrófagos M2, células do músculo liso são estimuladas à proliferação, assim, o número aumentado de macrófagos M2 na parede vascular contribuiria para o remodelamento vascular.

Ter conhecimento de que fenótipo está presente no desenvolvimento da patologia, bem como compreender os diferentes fatores que produzem polarização de macrófagos é de suma importância, pois permite que mais tipos de tratamentos sejam usados, além de torná-los mais específicos, ampliando a eficácia da terapia farmacológica.

4. Conclusão

Muitos avanços foram feitos com os estudos de polarização de macrófagos e células endoteliais. Como vimos, ainda estamos em fase de descobertas. Podemos inferir que os fenótipos M1 e M2 estimulam de diferentes formas as células endoteliais. Macrófagos M1, bem como as citocinas pró-inflamatórias por eles produzidas, promovem a manutenção do estado de disfunção endotelial. Em contrapartida, a presença de macrófagos M2 e das citocinas anti-inflamatória secretadas por eles, estaria envolvida com o desenvolvimento de remodelamento vascular. Entretanto, a identificação dos fatores que promovem a polarização de macrófagos e o entendimento dos mecanismos associados à disfunção vascular associada à atividade dos macrófagos ainda necessita ser melhor investigado de forma a elucidar novas estratégias terapêuticas no combate de doenças vasculares.

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa de Mestrado concedida à Anne Caroline dos Santos

Graça e ao diligente trabalho realizado pelos colaboradores deste trabalho.

Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista Scientia Amazonia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação do artigo por meio eletrônico.

Referências

- 1- Abramson, Stuart I., and J. I. Gallin. "IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes." *The Journal of Immunology* 144.2 (1990): 625-630.
- 2- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia molecular da célula*. 4ª edição. Nova Iorque: Garland Science; 2002. Vasos sanguíneos e células endoteliais. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk26848/>
- 3- Bonizzi G, Karin M. The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-288.
- 4- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* 87.10 (2000): 840-844.
- 5- Carvalho, Maria Helena Catelli, et al. "Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções." *Rev Bras Hipertens* 8.1 (2001): 76-88.
- 6- Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 32 (1997): s54-61.
- 7- David, John R. "Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity." *New England Journal of Medicine* 288.3 (1973): 143-149.
- 8- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109.23 suppl 1 (2004): iii-27.
- 9- Deanfield J, Halcox J, Rabelink B. Endothelial function and

- dysfunction testing and clinical relevance." *circulation* 115.10 (2007): 1285-1295.
- 10- Devaraj, sridevi, and ishwarlaljalal. "c-reactive protein polarizes human macrophages to an m1 phenotype and inhibits transformation to the m2 phenotype." *arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31.6 (2011): 1397-1402.
- 11- Eaton, k. V., et al. "engineering macrophages to control the inflammatory response and angiogenesis." *experimental cell research* 339.2 (2015): 300-309.
- 12- Endemann, dierk h., and ernesto l. Schiffrin. "endothelial dysfunction." *journal of the american society of nephrology* 15.8 (2004): 1983-1992.
- 13- Farb, andrew, et al. "coronary plaque erosion without rupture into a lipid core a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death." *circulation* 93.7 (1996): 1354-1363.
- 14- Ferreira, renataproença. Interações de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e células endoteliais de veia umbilical humana (huvec).campinas: unicamp, 2013. Tese (doutorado) - programa de pósgraduação em clínica médica, faculdade de ciências médicas, universidade estadual de campinas, sp, 2013.
- 15- Furchgott, robert f., and john v. Zawadzki. "the obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *nature* 288.5789 (1980): 373-376.
- 16- Galkina, elena v., and matthew j. Butcher. "phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta." *frontiers in physiology* 3 (2012): 44.
- 17- Glass, christopher k., and joseph l. Witztum. "atherosclerosis: the road ahead." *cell* 104.4 (2001): 503-516.
- 18- Gleissner, c. A., shaked, i., little, k. M., and ley, k. (2010). Cxc chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* 184, 4810-4818.
- 19- Guzik, t.j; hoch, n.e; brown, k.a, et al. Role of the t cell in the genesis of angiotensin ii induced hypertension and vascular dysfunction. *J exp med.* 2007;204(10):2449-60.
- 20- Ishibashi, minako, et al. "critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor ccr2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling." *circulation research* 94.9 (2004): 1203-1210.
- 21- Italiani, paola; boraschi, diana. From monocytes tom1/m2 macrophages: phenotypical vs. Functional differentiation. M1/m2 macrophages: the arginine fork in the road to health and disease, p. 47, 2015.
- 22- Kadl, alexandra, et al. "identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via nrf2." *circulation research* 107.6 (2010): 737-746..
- 23- Kawanishi, noriaki, et al. "exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from m1 to m2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice." *exercimmunol rev* 16.16 (2010): 105-118.
- 24- Khallou-laschet, jamila, et al. "macrophage plasticity in experimental atherosclerosis." *plos one* 5.1 (2010): e8852.
- 25- Kossmann, sabine, et al. "inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin ii." *journal of biological chemistry* 289.40 (2014): 27540-27550.
- 26- Kossmann, sabine, et al. "angiotensin ii-induced vascular dysfunction depends on interferon- γ -driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and nk-cells." *arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33.6 (2013): 1313-1319.
- 27- Landry, deborah b. Et al. Activation of the nf-kappa b and i kappa b system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *The american journal of pathology*, v. 151, n. 4, p. 1085, 1997.

- 28- Laskin, d.l.; sunil, v.r.; gardner, c.r.; laskin, j.d. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? Annual review of pharmacology and toxicology, v. 51,p. 267-88, 2011
- 29- Lee, e.y.; shim, m.s.; kim, m.j. Et al. Angiotensin h receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. *Expmoi med.* 2004;36(1):65-70.
- 30- Liu, yan-cun, et al. "macrophage polarization in inflammatory diseases." *int j biol sci* 10.5 (2014): 520-9.
- 31- Lüscher, thomas f., et al. "vascular effects of newer cardiovascular drugs: focus on nebivolol and ace-inhibitors." *journal of cardiovascular pharmacology* 38 (2001): s3-s12.
- 32- Luz, protásio lemos da, franciscorafaelmartinslaurindo, andantôniocarlos pala34-ndri chagas. "endotélio e doenças cardiovasculares." *endotélio e doenças cardiovasculares.* Atheneu, 2003.
- 33- Luz, protásio lemos da, juliano sabino de matos, andantôniocarlospalandri chagas. "endotélio e aterosclerose." *rev. Soc. Cardiol. Estado de são paulo* 23.4 (2013): 10-17.
- 34- Mantovani, a; garlanda, c; locati, m. Macrophage diversityandpolarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arteriosclerthrombvasc biol.*2009; 29: 1419 – 1423.
- 35- Mantovani, alberto, et al. "the chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *trends in immunology* 25.12 (2004): 677-686.
- 36- Martinez, f.o.&gordon s. The m1 and m2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 prime reports*2014;6:13. Doi:10.12703/p6-13.
- 37- Metcalf, julie, kennethaldape, and gelarehzadeh. "angi-10 glioma-associated macrophages promote endothelial cell dysfunction." *neuro-oncology* 17.suppl 5 (2015): v43-v43.
- 38- Metchnikoff e. *Imunidade no infectiousdiseases.* Nova iorque: macmillan. 1905
- 39- Moore, jeffrey p., et al. "m2 macrophage accumulation in the aortic wall during angiotensin ii infusion in mice is associated with fibrosis, elastin loss, and elevated blood pressure." *american journal of physiology-heart and circulatory physiology* 309.5 (2015): h906-h917.
- 40- Moore, jeffrey p., et al. "a flow cytometric method for the analysis of macrophages in the vascular wall." *journal of immunological methods* 396.1 (2013): 33-43.
- 41- Moreira, anapaula, andcory m. Hogaboam. "macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro-and anti-inflammatory actions for disease resolution." *journal of interferon & cytokine research* 31.6 (2011): 485-491.
- 42- Mosmann, t. R., and r. L. Coffman. "th1 and th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *annual review of immunology* 7.1 (1989): 145-173.
- 43- Mosser dm, edwardsjp. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology.* 2008;8:958-69 doi:10.1038/nri2448
- 44- Murray, p. J., and wynn, t. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- 45- Nathan, carl f., et al. "identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." *the journal of experimental medicine* 158.3 (1983): 670-689.
- 46- North, robert j. "cellular mediators of anti-listeria immunity as an enlarged population of short-lived, replicating t cells kinetics of their production." *the journal of experimental medicine* 138.2 (1973): 342-355.
- 47 - Ohmori y, hamilton ta. Il-4-induced stat6 suppresses ifn-gamma-stimulated stat1-dependent transcription in mouse macrophages. *The journal of immunology.* 1997;159:5474-82
- 48- Pauleau al, rutschman r, lang r, perniss a, watowichss, murraypj. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase i

- expression. *J immunol.* 2004;172(12):7565–7573.
- 49- Perticone, francesco, et al. "prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients." *circulation* 104.2 (2001): 191-196.
- 50- Sena, cristina m., ana m. Pereira, andraquelseiça. "endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease." *biochimica et biophysica acta (bba)-molecular basis of disease* 1832.12 (2013): 2216-2231.
- 51- Stein m, keshav s, harris n, gordon s. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The journal of experimental medicine.* 1992;176:287-92
- 52- Sumpio, bauer e., j. Timothy riley, and alandardik. "cells in focus: endothelial cell." *the international journal of biochemistry & cell biology* 34.12 (2002): 1508-1512.
- 53- Teixeira, bruno costa et al . Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. *J. Vasc. Bras., porto alegre* , v. 13, n. 2, p. 108-115, june 2014.
- 54- Valleggi, simona, et al. "c-reactive protein adversely alters the protein–protein interaction of the endothelial isoform of nitric oxide synthase." *clinical chemistry* 56.8 (2010): 1345-1348.
- 55- Van der wal, ac; becker, ae; van der loos, cm, das,pk. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36–44.
- 56- Verma, subodh, and todd j. Anderson. "fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist." *circulation* 105.5 (2002): 546-549.
- 57- Vinh, antony, et al. "inhibition and genetic ablation of the b7/cd28 t-cell costimulation axis prevents experimental hypertension." *circulation* 122.24 (2010): 2529-2537.
- 58- Vita, joseph a., and john f. Keaney. "endothelial function a barometer for cardiovascular risk?." *circulation* 106.6 (2002): 640-642.
- 59- Wenzel, philip, et al. "lysozyme m–positive monocytes mediate angiotensin ii–induced arterial hypertension and vascular dysfunction." *circulation* 124.12 (2011): 1370-1381.
- 60- Wynn, thomas a. "fibrotic disease and the th1/th2 paradigm." *nature reviews immunology* 4.8 (2004): 583-594.
- 61- Wynn, thomas a., and thirumalai r. Ramalingam. "mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease." *nature medicine* 18.7 (2012): 1028-1040.

ANEXOS

- **Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animal**

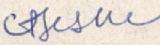
 Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA

 UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 001/2015-CEUA/UFAM, intitulado como “Avaliação da atividade biológica de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith sobre o sistema cardiovascular e renal em ratos normotensos e hipertensos” sob responsabilidade do PROFº. DR **José Wilson do Nascimento Corrêa** está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFAM) em Reunião ocorrida em 22/01/2015.

Manaus, 23 de janeiro de 2015.


Profª. Dra. Cintya Iamille Fritzh Brandão de Oliveira
Presidente da CEUA/UFAM

Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coroado, Campus Universitário, Setor Sul, atrás do Bloco C, 69077-000 – Manaus/AM
Tel.: (92) 3305-4025 e-mail: ceua@ufam.edu.br ou ceua123@gmail.com