

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

SAMUEL BARBOSA CAMARGO

**POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO DE LINALOL COMPLEXADO À BETA-
CICLODEXTRINA: ESTUDOS DE FARMACODINÂMICA E
FARMACOCINÉTICA**

Salvador – Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO DE LINALOL COMPLEXADO À BETA-
CICLODEXTRINA: ESTUDOS DE FARMACODINÂMICA E
FARMACOCINÉTICA**

SAMUEL BARBOSA CAMARGO

Orientadora: Profa. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de
Vasconcelos

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação de Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a obtenção do
título de Doutor.

**Salvador - Bahia
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C172p Camargo, Samuel Barbosa.
Potencial anti-hipertensivo de linalol complexado à beta-ciclodextrina:
estudos de farmacodinâmica e farmacocinética. / Samuel Barbosa Camargo. -
2020.
109 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos,
Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Endócrino e Cardiovascular.
Tese (Doutorado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Hipertensão. 2. Ciclodextrinas. 3. Complexo de Inclusão. 3.
Cardiovascular. I. Título.

CDU 616.12-008.331.1

* POTENCIAL ANTI-HIPERTENSIVO DE LINALOL COMPLEXADO A B-CICLODEXTRINA:
ESTUDOS FARMACODINÂMICO E FARMACOCINÉTICO.*

SAMUEL BARBOSA CAMARGO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 09 de março de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Cesar Ghedini
Professor Associado
UFG



Dra. Ana Leonor Pardo Campos Godoy
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Simone Garcia Macumbira
Professor Associada
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESB - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

**Dedico tal conquista à minha avó Nivalda Oliveira Barbosa.
Por toda sua luta em minha criação.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a criação de minha avó **Nivalda Oliveira Barbosa**, que me fez o homem de bem que sou hoje. Todos os seus esforços não foram em vão... Te amo!!!

Minha mãe, **Cláudia Oliveira**, por ter me dado esta grande oportunidade de viver e ser feliz com os que amo. **Minhas tias, tios, primas e primos**, pela torcida de sempre em ver meu crescimento pessoal e profissional, sou extremamente feliz por tê-los como minha família.

Minha mãe científica, minha inspiração, eu tenho muita admiração por suas conquistas. Tão jovem e tão dedicada em suas coisas. A melhor orientadora que eu poderia ter. Prof.^a Dra. **Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**, muito obrigado por me aceitar como seu aluno, em uma situação que nunca havia lhe acontecido e por sempre me incentivar a crescer e continuar trabalhando como sempre trabalhei. Você merece colher os melhores frutos e este é apenas um dos muitos que colheremos juntos. Você é espetacular!!!

À **Letícia Oliveira Simões e Carla Fiana de Azevedo**, que me ensinaram muitas coisas, assim como me acompanharam em TUDO que está neste trabalho. Essa conquista também é de vocês!!! Obrigado por tudo!!!

Aos colegas e amigos do LAFPEC!!! Vocês são demais!!! Obrigado pelo acolhimento. À coordenação, aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pela ajuda e empenho de sempre em melhor conduzir meus passos, em especial Lumara e Simone, mas sem esquecer a maravilhosa Noelia Santos, que desde o primeiro dia esteve comigo, com conselhos, apoio, e sempre um sorriso no rosto e braços abertos pra me receber e resolver meus problemas. Agradeço ainda aos queridos funcionários da Biblioteca, em especial à sua coordenação na pessoa da Sra. Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, muito prestativa e eficiente.

**“Eu só preciso de pés livres,
de mãos dadas e de olhos bem abertos.”**

Guimarães Rosa

CAMARGO, Samuel Barbosa. Potencial anti-hipertensivo de linalol complexado à beta-ciclodextrina: estudos de farmacodinâmica e farmacocinética. 2020. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A hipertensão arterial (HA) é importante problema de saúde pública e apresenta difícil controle e tratamento. Alternativas terapêuticas precisam ser encontradas e a pesquisa com produtos naturais é bastante promissora. Os óleos essenciais apresentam efeitos biológicos sobre o sistema cardiovascular e o monoterpeneo linalol (LIN) tem sido estudado como anti-hipertensivo. Os monoterpeneos apresentam dificuldades de solubilidade devido às suas características lipofílicas e a formação de complexos de inclusão principalmente com ciclodextrinas (CDs) demonstram ser de fácil síntese e utilização para estabilização e melhoria na farmacocinética e farmacodinâmica. **OBJETIVO:** avaliar a ação de linalol puro e do complexo de inclusão contendo linalol em β -ciclodextrina (LIN/ β -CD) sobre os parâmetros cardiovasculares de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos Wistar. **MATERIAL E MÉTODOS:** Protocolos realizados de acordo à literatura e sinalizados na próxima sessão. **RESULTADOS:** Nos estudos de farmacocinética, o complexo LIN/ β -CD foi capaz de aumentar a absorção, a biodisponibilidade de linalol na corrente sanguínea em cerca 20 vezes, assim como houve aumento da área sobre a curva de concentração sanguínea em relação ao tempo, demonstrando que uma vez complexado, LIN permanece por muito mais tempo na corrente sanguínea. Nos estudos para medida direta de PA e FC, administrações i.v. de LIN e LIN/ β -CD (50 mg/kg) demonstraram ser capazes de induzir hipotensão em ratos SHR. Após administração oral, foi possível averiguar hipotensão e bradicardia por parte do grupo LIN/ β -CD (50 mg/kg) quando comparado ao LIN especialmente nas 3 últimas horas. A administração de LIN e LIN/ β -CD por via orogástrica de maneira subcrônica durante 21 dias (50mg/kg) em SHR induziu manutenção dos níveis pressóricos iniciais e apresentou um efeito anti-hipertensivo superior ao LIN e estatisticamente significativa a partir do 15º dia, perdurando até o 20º dia, já o grupo LIN alcançou diminuição da pressão arterial apenas no último dia do tratamento. Adicionalmente, LIN/ β -CD foi capaz de promover aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10; foi capaz também de impedir o desenvolvimento de hipertrofia, com diminuição significativa do índice de massa do coração, quando comparado ao grupo tratado com LIN. Em estudos de reatividade vascular com artéria mesentérica superior, houve vasorrelaxamento induzido por NPS (10^{-13} - 10^{-5} M) sem alterações significantes em relação aos controles. A curva em resposta à Phe (10^{-10} - 10^{-6} M) apresentou uma diminuição significativa da potência farmacológica do grupo LIN/ β -CD em relação ao grupo veículo. Com relação ao tratamento crônico de 60 dias o grupo LIN/ β -CD apresentou efeito anti-hipertensivo importante, desde 15 dias de tratamento, perdurando durante todo o tratamento de 60 dias, aproximando-se dos animais normotensos sadios. O grupo LIN apresentou, em menor proporção, efeito anti-hipertensivo aproximando-se do grupo veículo. Com relação aos estudos de hipertrofia do coração, após 60 dias de tratamento, apenas o grupo tratado com o complexo LIN/ β -CD apresentaram diminuição do índice de massa cardíaca quando comparado ao grupo veículo. Em estudos de reatividade vascular, após 60 dias de tratamento a curva concentração resposta à Phe apresentou efeito reduzido com deslocamento da curva para esquerda, sendo estatisticamente significativa no grupo tratado com LIN/ β -CD, quando comparado ao grupo veículo, sendo que o grupo linalol também apresentou esta diminuição da reatividade vascular, porém em menor proporção. Nas curvas de relaxamento, foi possível observar alterações estatisticamente significantes para o relaxamento induzido por Ach e NPS com relação ao grupo tratado com LIN/ β -CD em comparação as artérias de animais hipertensos tratados com veículo. Com relação aos estudos morfológicos, a histologia demonstrou que os grupos tratados com LIN e LIN/ β -CD apresentaram características semelhantes ao grupo wistar sadio, sem sinais de injúrias. **CONCLUSÃO:** Os resultados em conjunto, sugerem que o complexo de inclusão LIN/ β -CD tem promissor potencial de aumento da biodisponibilidade de LIN e melhora dos seus efeitos sobre o sistema cardiovascular com efeito hipotensor e anti-hipertensivo.

Palavras-chave: Hipertensão; Linalol; Ciclodextrinas; Complexo de Inclusão; Cardiovascular.

CAMARGO, Samuel Barbosa. Antihypertensive potencial of linalool complex with beta-cyclodextrin: pharmacodynamic and pharmacokinetics studies. 2020. 109 f. Tesis (Doctorate in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Arterial hypertension (AH) is an important public health problem and its control and treatment have been increasingly difficult. Therapeutic alternatives need to be found and the search for new drugs with natural products is very promising. Essential oils have biological effects on the cardiovascular system and monoterpene linalool (LIN) has been studied as an antihypertensive. Despite the associated biological effects, monoterpenes have difficulties in solubility due to their lipophilic characteristics. These problems can be overcome with the formation of inclusion complexes with cyclodextrins (CDs). There is stabilization and improvements in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these unstable substances.

AIM: to evaluate the action of pure linalool and the inclusion complex containing linalool in β -cyclodextrin (LIN/ β -CD) on the cardiovascular parameters of blood pressure (BP) and heart rate (HR) of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive wistar. **METHODS:** All the scientific protocols onwards. **RESULTS:** Pharmacokinetic studies, LIN/ β -CD was able to increase the bioavailability of linalool in the bloodstream by about 20 times, an increase in the area on the blood concentration curve in relation to time, demonstrating that a Once complexed, LIN remains in the bloodstream much longer; the excretion and elimination of complexed linalool was also lower when compared to LIN, data obtained through the clearance of substances. In studies for direct measurement of BP and HR, intravenous administrations of LIN and LIN/ β -CD (50 mg/kg) have been shown to be able to induce hypotension in SHR This effect was associated with bradycardia when applied to pure linalool and tachycardia without statistical differences when applied to the inclusion complex and compared to the vehicle group. After oral administration and observation of direct effects for 6 hours, it was possible to ascertain hypotension and bradycardia by the LIN/ β -CD group (50 mg/kg) when compared to LIN especially in the last 3 hours. The administration of LIN and LIN/ β -CD via orogastric subchronic for 21 days in SHR induced maintenance of initial blood pressure levels and had an antihypertensive effect superior to LIN and statistically significant from the 15th day lasting until the 20th day, the vehicle group showed a significant increase until the end of the treatment; the LIN group achieved a decrease in blood pressure only on the last day of treatment. In addition, complexed linalool was able to promote an increase in the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The treatment with LIN/ β -CD was able to prevent the development of cardiac hypertrophy, with a significant decrease in the heart mass index, when compared to the group LIN. In studies of vascular reactivity with superior mesenteric artery, there was vasorelaxation induced by SNP (10^{-13} - 10^{-5} M) without significant changes in relation to controls. The curve in response to PHE (10^{-10} - 10^{-6} M) showed a significant decrease in the pharmacological potency of the linalool group in relation to the vehicle group. Regarding the chronic treatment of 60 days, the LIN/ β -CD group had an important antihypertensive effect, since 15 days of treatment, lasting throughout the 60-day treatment, approaching healthy normotensive animals. The LIN group had, to a lesser extent, an antihypertensive effect approaching the vehicle. Regarding studies of heart hypertrophy, after 60 days of treatment, only the group treated with the LIN/ β -CD complex and the wistar animals showed a decrease in the cardiac mass index when compared to the vehicle SHR group. In vascular reactivity, 60 days of treatment concentration curve response to Phe showed a reduced effect with shift of the curve to the left statistically significant in LIN/ β -CD group, when compared to vehicle, and the LIN also presented this decrease in vascular reactivity, but to a lesser extent. In the relaxation curves, it was possible to observe statistically significant changes for the relaxation induced by ACH and SNP in relation to the group treated with LIN/ β -CD compared to the vehicle. Regarding morphological studies, histology has shown that the groups treated with LIN and LIN/ β -CD showed similar characteristics to the healthy Wistar group, with no signs of injuries. **CONCLUSION:** These results together suggest that the LIN/ β -CD inclusion complex has a promising potential for increasing the bioavailability of LIN and improving its effects on the cardiovascular system.

Keywords: Hypertension; Linalool; Cyclodextrins; Inclusion Complex; Cardiovascular

Lista de Figuras

Figura 1.	Medicamentos anti-hipertensivos de primeira linha, utilizados na medicina atual para manejo e controle da pressão arterial.	17
Figura 2.	Estrutura química de (-)-Linalol e (+)-Linalol.	22
Figura 3.	Estrutura química da β -ciclodextrina e estrutura em 3 dimensões demonstrando sua forma de cone truncado.	25
Figura 4.	Representação esquemática da formação típica do complexo de inclusão com a β -ciclodextrina.	28
Figura 5.	Região de incisão cirúrgica para cateterismo da artéria e da veia femoral. Desenho esquemático demonstrando procedimento cirúrgico e disposição dos cateteres utilizados.	38
Figura 6.	Aparelho para medida indireta de pressão arterial e frequência cardíaca. Pletismógrafo de Cauda – Insight – São Paulo – Brasil.	41
Figura 7.	Esquema representando protocolo de reatividade vascular. Os anéis passaram por troca do meio de tyrode por KCL60 para despolarização das células e tornar possível alcançar os melhores resultados de contração e relaxamento.	44
Figura 8.	Gráfico de concentração plasmática média vs tempo do linalol administrado na forma livre em ratos wistar por via i.v. na dose de 50 mg/kg (n=6).	48
Figura 9.	Gráfico de concentração plasmática com a média vs tempo do linalol administrado na forma livre e complexado com β -ciclodextrina em ratos wistar por via oral na dose de 100 mg/kg (n=6).	50
Figura 10.	Modelo farmacocinético de análises por 2 compartimentos.	52
Figura 11.	Gráfico de verificação dos valores preditos (VPC, visual predictive check). Em Y eixo de distribuição do fármaco versus o tempo. Os pontos azuis representam os dados observados. As linhas roxas os ajustes individuais. As linhas verdes os ajustes populacionais. As áreas indicam o intervalo predito de 95% dos dados simulados. Os números representam os animais testados (n=6).	55
Figura 12.	Correlação entre concentração plasmática observada e concentração plasmática populacional no primeiro quadro e individual predita no segundo quadro, da esquerda para direita.	56
Figura 13.	Distribuição homogênea dos resíduos em relação ao tempo no primeiro quadro e distribuição homogênea dos resíduos em relação à concentração plasmática predita no segundo quadro.	56
Figura 14.	Gráfico de verificação dos valores preditivos para linalol complexado. Os pontos azuis representam os dados observados. As linhas roxas os ajustes individuais. As linhas verdes os ajustes populacionais. Concentração vs Tempo, com intervalo e área de 95%, dos valores preditos e simulados.	58
Figura 15.	Gráficos de correlação entre o efeito aleatório dos parâmetros farmacocinéticos (η) e as covariáveis investigadas. k_a : constante de absorção; V: volume de distribuição; k_{12}/k_{21} : constante de distribuição.	60
Figura 16.	Registros originais dos experimentos de administração aguda. Linalol complexado e livre por via intravenosa na dose de 50mg/kg.	62
Figura 17.	Efeito hipotensor de LIN e LIN/ β -CD. Gráficos em barras (A) %PAM (mmHg) e (B) %FC (bpm) após administração i.v. Veículo (n = 5), LIN/ β CD (n = 5) ou LIN (n = 5).	63

Figura 18.	Efeito hipotensor após administração oral de LIN\β-CD. Em (A) gráfico em linha PAM (mmHg) e em (B) gráfico em linha FC (bpm) após administração orogástrica, com LIN ou LIN\β-CD (n = 6).	64
Figura 19.	Efeito do tratamento subcrônico com LIN/β-CD sobre o consumo de ração, água e ganho de peso corporal. Em valores brutos, em (A) consumo de ração (mg) em (B) consumo de água (mL) e em (C) valores em % do ganho de peso corporal. Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) ou LIN/β-CD (n = 7).	66
Figura 20.	Efeito anti-hipertensivo de LIN\β-CD. Em (A) PAM (mmHg) e (B) FC (bpm) de SHR tratados por 21 dias com administração orogástrica. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN\β-CD (n = 7).	68
Figura 21.	Efeito de LIN\β-CD no índice de massa cardíaca após 24 horas de secagem em estufa. Animais SHR tratados por 21 dias. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN\β-CD (n = 7).	69
Figura 22.	Efeito de LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 21 dias. Em (A) contração em % com concentrações cumulativas de Phe; em (B) relaxamento em % com concentrações cumulativas de NPS. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN/β-CD 50 mg (n = 7).	71
Figura 23.	Níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no sangue de ratos SHR submetidos ao tratamento subcrônico. Na resposta de captura de ELISA realizada em triplicata, os níveis de citocinas inflamatórias foram mensurados, em diferentes grupos: para IL-1β veículo (n = 4), linalol (n = 5) e complexo (n = 4); para IL-10 veículo (n = 4), linalol (n = 7) e complexo (n = 6).	73
Figura 24.	Efeito do tratamento crônico de 60 dias com LIN/β-CD sobre o e ganho de peso corporal. Em valores brutos ganho de peso corporal dos animais wistar e SHR tratados.	74
Figura 25.	Efeito do tratamento crônico de 60 dias com LIN/BCD sobre os níveis de pressão arterial e frequência cardíaca. Em valores brutos PAM e FC. Veículo (n=5), linalol 50 mg (n=6), LIN/BCD (n=6) e Wistar (n=5).	76
Figura 26.	Efeito de LIN/β-CD no índice de massa cardíaca. SHR e wistar tratados por 60 dias. Grupos Veículo (n=5), LIN 50 mg (n=6), LIN/β-CD (n=6) e wistar (n=5).	77
Figura 27.	Registros originais das curvas concentração resposta realizadas para avaliação da reatividade vascular do tratamento de 60 dias de ratos wistar e SHR. Experimentos com agente vasocontraturante Phe e agentes vasorelaxantes Ach e NPS. Em (A) grupo wistar, em (B) grupo SHR veículo, em (C) grupo tratado com LIN 50 mg/kg e em (D) grupo tratado com LIN/β-CD 50 mg/kg.	79
Figura 28.	Efeito de LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 60 dias. No gráfico em barras, delta de contração com KCL 60 e gráfico de linhas em % de contração com concentrações cumulativas de Phe. Grupos experimentais wistar (n=11), veículo (n = 7), LIN 50 mg/kg (n=8) e LIN/β-CD 50 mg/kg (n=7).	80
Figura 29.	Efeito de LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 60 dias. Em (A) gráfico em linha com % de concentrações cumulativas de Ach. Grupos wistar (n=6), veículo (n=6), LIN 50 mg/kg (n=7) e LIN/β-CD 50 mg/kg (n=7) com símbolos (*) veículo vs wistar e (#) veículo vs LIN/β-CD. Em (B) gráfico em linha com % de concentrações cumulativas de NPS. Símbolo (*) LIN vs LIN/β-CD e (#) veículo vs LIN/β-CD. wistar (n=6), veículo (n=7), LIN 50 mg/kg (n=6) e LIN/β- CD 50 mg/kg (n=5).	81

- Figura 30.** Efeito de LIN/ β -CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 21 dias. Em (A) contração em % com concentrações cumulativas de Phe; em (B) relaxamento em % com concentrações cumulativas de NPS. 97
- Figura 31.** Ausência de alterações morfológicas em músculo cardíaco de ratos wistar e SHR tratados por 60 dias. Fotomicrografias mostrando seções longitudinais do ventrículo esquerdo de amostras dos grupos: wistar em (A), SHR veículo em (B), SHR tratado com LIN em (C) e SHR tratado com LIN/ β -CD em (D). Miocárdios normais, com fibras bem organizadas e preservação da estrutura nos tratados com LIN e LIN/ β -CD. Coloração dos cortes histológicos com hematoxilina-eosina (1) e picrosirius (2). Fibras colágenas maduras evidenciadas em vermelho e fibras colágenas jovens, coradas em verde com picrosirius. Aumento de 200X. 85
- Figura 32.** Ausência de alterações morfológicas em artéria aorta de ratos wistar e SHR tratados por 60 dias. Fotomicrografias mostrando seções longitudinais de artéria aorta de amostras dos grupos: wistar em (A), SHR veículo em (B), SHR LIN em (C) e SHR LIN/ β -CD em (D). Aortas normais com fibras bem organizadas nos grupos controle e preservação da estrutura em espécimes tratados com LIN e LIN/ β -CD. Coloração dos cortes histológicos com hematoxilina-eosina (1) e picrosirius (2). Fibras colágenas maduras evidenciadas em vermelho e fibras colágenas jovens, coradas em verde com picrosirius. Aumento de 200X. 86

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Parâmetros farmacocinéticos médios estimados após a administração de linalol na forma livre e incluso em β -ciclodextrina via intravenosa e oral nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente	51
Tabela 2.	Linalol livre - Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 1 compartimento.	52
Tabela 3.	Linalol livre - Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 2 compartimentos.	52
Tabela 4.	Linalol livre - Parâmetros estimados da população.	53
Tabela 5.	Linalol livre - Estimativas individuais dos parâmetros.	53
Tabela 6.	Linalol complexado - Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 1 compartimento.	57
Tabela 7.	Linalol complexado - Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 2 compartimentos.	57
Tabela 8.	Correlação de Pearson e/ou ANOVA entre os efeitos aleatórios (η) e as covariáveis.	58
Tabela 9.	Linalol complexado em SHR - Verossimilhança e critérios de informação de Akaike após adição das covariáveis.	59
Tabela 10.	Linalol complexado em SHR - Parâmetros estimados da população.	59
Tabela 11.	Efeito hipotensor e bradicárdico de linalol complexado após administração aguda por via oral	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	ANIMAIS	33
5.2	OBTENÇÃO DO COMPLEXO LIN/ β -CD	34
5.3	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	35
5.4	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	35
	<i>Estudos Farmacocinéticos Plasmáticos e Modelagem Populacional através de Metodologia de Quantificação do Linalol por CLAE/UV</i>	
5.4.1		38
	<i>Investigação do efeito de LIN/β-CD na hemodinâmica de animais SHR</i>	
5.4.2		39
	<i>Investigação subcrônica e crônica do potencial anti-hipertensivo de linalol complexado com β-CD em SHR e wistar.</i>	
5.4.3		39
5.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	42
5.5.1	<i>Preparação dos tecidos e reatividade vascular de ratos SHR e wistar</i>	43
5.5.2	Avaliação dos níveis de citocinas – Testes Bioquímicos ELISA	45
5.5.3	Avaliação do índice de massa cardíaca e histopatologia do coração	45
6	PROPOSTA DE ANÁLISE	47
7	RESULTADOS	48
7.1	ENSAIOS FARMACOCINÉTICOS	48
	<i>Farmacocinética da administração intravenosa e oral de LIN e LIN/β-CD em animais wistar</i>	
7.1.1		48
	<i>Modelagem Farmacocinética Populacional da administração intravenosa e oral de LIN e LIN/β-CD de animais wistar</i>	
7.1.2		51
7.1.2.1	LIN via intravenosa em wistar	51
7.1.2.2	LIN e LIN/β-CD via oral em wistar e SHR	58

7.2	ENSAIOS FARMACODINÂMICOS	61
7.2.1	<i>Efeitos agudos da administração intravenosa de LIN e LIN\β-CD sobre parâmetros cardiovasculares de animais SHR.</i>	61
7.2.2	<i>Efeitos da administração oral de LIN e LIN\β-CD sobre parâmetros cardiovasculares de animais SHR e wistar.</i>	63
7.2.3	<i>Efeitos do tratamento subcrônico com LIN e LIN\β-CD no índice de massa corporal, ingestão de água e ração de SHR</i>	65
7.2.4	<i>Efeitos do tratamento subcrônico com LIN e LIN\β-CD na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de SHR</i>	67
7.2.5	<i>Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN\β-CD sobre o índice de massa cardíaca de animais SHR.</i>	69
7.2.6	<i>Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN\β-CD sobre a reatividade vascular de animais SHR.</i>	70
7.2.7	<i>Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN\β-CD sobre os níveis de citocinas de animais SHR.</i>	72
7.2.8	<i>Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN\β-CD no índice de massa corporal de SHR</i>	74
7.2.9	<i>Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN\β-CD na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos SHR e Wistar</i>	75
7.2.10	<i>Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN\β-CD sobre o índice de massa cardíaca de ratos SHR e Wistar.</i>	77
7.2.11	<i>Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN\β-CD sobre reatividade vascular de animais SHR.</i>	78
7.2.12	<i>Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN\β-CD sobre a morfologia e histopatologia do coração e aorta de ratos SHR e Wistar.</i>	83
8	DISCUSSÃO	87
9	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é considerada como uma condição clínica que se constitui como fator de risco para outras diversas enfermidades como infarto e acidente vascular encefálico. Representa um dos maiores desafios em saúde pública para os cerca de 600 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (ESH e ESC, 2013; ORGANIZATION, 2013; WHELTON et al., 2017). Diante deste panorama mundial, assim como, da tolerância e resistência aos medicamentos para controle da pressão arterial, é necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas e a obtenção de novos fármacos, sendo que as plantas medicinais tornam-se uma excelente fonte de novas moléculas para tratamento de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2011).

Os recentes estudos e novas pesquisas para elucidar os efeitos biológicos das plantas medicinais e seus produtos sobre o sistema cardiovascular têm sido uma constante com objetivo de promover maior embasamento acerca do potencial terapêutico dos compostos advindos de folhas, flores, caules, raízes e frutos (CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2014; SANTOS et al., 2011). O linalol (LIN) é um metabólito secundário de óleo essencial de plantas e apresenta efeitos sobre o sistema cardiovascular (CAMARGO et al., 2018; CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2014). Entretanto as tecnologias tem direcionado a comunidade científica à pesquisa de formulações mais estáveis para sistemas de transporte de drogas, a exemplo de lipossomas, nanopartículas ou ciclodextrinas (CDs), utilizados para melhorar a ação e reduzir a toxicidade dos fármacos (RAKMAI et al., 2018; LOCCI et al., 2004; NUMANOĞLU et al., 2007).

Dentre as várias estratégias empregadas no uso de ciclodextrinas para prolongar a estabilidade de compostos, modelar a cinética de liberação e melhorar a absorção, destaca-se a formação de complexos de inclusão (RAKMAI et al., 2018; LODAGEKAR et al., 2019). As CDs por sua vez têm sido um dos principais recursos empregados na área farmacêutica devido à sua estrutura em formato de cone, que permite a liberação controlada de fármacos (LODAGEKAR et al., 2019; MARQUES, 2010) e otimização dos efeitos

biológicos de modo a propor inovação biotecnológica com produtos complexados à β -CD para utilização na terapia anti-hipertensiva

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A pressão sanguínea arterial pode ser regulada por diversos mecanismos e vias, que envolvem desde a ação majoritária dos barorreceptores à curto prazo, assim como ações do sistema nervoso autônomo, atuando na resistência periférica total, ou no tecido cardíaco, por exemplo, ou ainda regulando a ação hormonal e ajustes da função renal à longo prazo (ROBLES-CABRERA et al., 2014). Além da regulação do tônus pelo sistema simpático, o endotélio vascular também pode sintetizar agentes vasoconstritores e dilatadores em resposta à uma variedade de estímulos, incluindo estresse de cisalhamento e hormônios. Estímulos nervosos, hormonais, químicos, elétricos assim como a frequência cardíaca e resistência vascular, são fundamentais na regulação e determinação da pressão arterial (ESH e ESC, 2013; MULVANY, 2011; ROBLES-CABRERA et al., 2014).

Quando observamos a população mundial de hipertensos, desses 9,4 milhões morrem anualmente como resultado de complicações cardiovasculares, a exemplo dos acidentes vasculares cerebrais e ataques cardíacos (ORGANIZATION, 2013; WHELTON et al., 2017). Ao analisar estudos observacionais com grandes populações, esta enfermidade é considerada uma das principais causas de morte em todo o mundo (ESH e ESC, 2013). A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação e sustentação da pressão arterial com níveis à partir de 115/75 mmHg de forma linear e contínua (PICCINI, 2012). São necessárias medidas específicas e assertivas para prevenir o avanço dos quadros hipertensivos, assim como educar a população à controlar a doença e seus fatores de risco, como uma forma de evitar futuras complicações em indivíduos jovens, como a instalação de uma doença cardíaca, renal ou cerebral como órgãos alvo, causando redução da expectativa de vida (ORGANIZATION, 2013).

Trinta e quatro mortes por hora, 829 óbitos por dia e mais de 302 mil óbitos no ano de 2017. Esse é o retrato das doenças cardiovasculares no

Brasil, que têm como principal fator de risco a hipertensão arterial (YUGAR-TOLEDO et al, 2020). Cerca de 35% de toda a população brasileira têm hipertensão arterial, caracterizando-se como sendo mais comum entre as mulheres, com 26,9% do que entre os homens, que apresentam uma prevalência de 21,3%, além de ser possível observar ainda uma variação destes números de acordo com a faixa etária e a escolaridade. Entre os brasileiros com mais de 65 anos de idades, 59,2% se declaram hipertensos, contra apenas 3,8% na faixa de 18 a 24 anos e 8,8% de 25 a 34 anos. Em uma revisão sistemática com meta-análise de levantamentos transversais realizados no Brasil nas últimas três décadas, foram incluídos mais de 120 mil indivíduos. No geral, a prevalência foi semelhante à de países desenvolvidos, particularmente de hipertensão diagnosticada por medidas constantes da pressão arterial e com base nos critérios universais para o diagnóstico de hipertensão (PICON, FUCHS, MOREIRA, RIEGEL & FUCHS, 2012).

Cerca de 90% da população hipertensa apresenta o tipo de hipertensão essencial, aquela em que a origem ou causa não são conhecidas e por volta de 10% apresentam a forma secundária, em que um fator causal conhecido, como a obesidade, seria o principal fator desencadeante (WHELTON et al., 2017). Do ponto de vista clínico, a hipertensão ainda é considerada multifatorial e relativamente desconhecida, seja por seu desenvolvimento insidioso ou pelas mudanças estruturais nos vasos, estresse da parede arterial e destruição progressiva, do leito vascular (MULVANY, 2012; SCHIFFRIN, 2012).

Clinicamente definida por valores de pressão arterial maiores ou iguais à 130 mmHg de pressão arterial sistólica e 90 mmHg de pressão diastólica (ESH e ESC, 2013; WHELTON et al., 2017). Com prevalência de cerca de 50% da população idosa, é importante fator de risco para manifestação de doenças como insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e doenças renais que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade (PICCINI, 2012). Entre os guidelines, atualmente recomenda-se iniciar uma terapia anti-hipertensiva a qualquer tempo, gênero e idade, caso a pressão sanguínea do indivíduo seja igual ou superior à 150/90 mmHg. Diuréticos da classe dos tiazídicos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores enzimáticos da conversão de angiotensina e bloqueadores de receptores da angiotensina são medicamentos de primeira ordem (ESH e ESC, 2013; WHELTON et al., 2017).

Segundo o mais atual guia sobre hipertensão e terapia anti-hipertensiva, Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults (WHELTON et al., 2017) documento elaborado e aprovado pelo American College of Cardiology e pela American Heart Association no ano de 2017 apresenta as drogas mais atuais para controle e manejo do indivíduo com hipertensão. Na versão brasileira, apresentada na tabela abaixo, é possível averiguar um panorama dos principais anti-hipertensivos disponíveis no mercado de fármacos.

ANTI-HIPERTENSIVOS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS NO BRASIL							
Medicamentos	Posologia (mg)		Número de tomadas/dia	Medicamentos	Posologia (mg)		Número de tomadas/dia
	Mínima	Máxima			Mínima	Máxima	
Diuréticos			Bloqueadores dos canais de cálcio				
Tiazídicos			Fenilalquilaminas				
Clortalidona	12,5	25	1	Verapamil Retard***	120	480	1-2
Hidroclorotiazida	12,5	25	1	Benzotiazepinas			
Indapamida	2,5	5	1	Diltiazem AP, SR ou CD***	180	480	1-2
Indapamida SR***	1,5	5	1	Diidropiridinas			
Alça			Anlodipino 2,5 10 1				
Bumetamida	0,5	**	1-2	Felodipino	5	20	1-2
Furosemida	20	**	1-2	Isradipina	2,5	20	2
Piretanida	6	12	1	Lacidipina	2	8	1
Poupadores de potássio			Lercarnidipino 10 30 1				
Amilorida*	2,5	10	1	Manidipino	10	20	1
Espironolactona	25	100	1-2	Nifedipino Oros***	30	60	1
Triantereno*	50	100	1	Nifedipino Retard***	20	60	2-3
Inibidores adrenérgicos			Nisoldipino 5 40 1-2				
Ação central			Nitrendipino 10 40 2-3				
Alfametildopa	500	1.500	2-3	Inibidores da ECA			
Clonidina	0,2	0,6	2-3	Benazepril	5	20	1
Guanabenzol	4	12	2-3	Captopril	25	150	2-3
Moxonidina	0,2	0,6	1	Clizapril	2,5	5	1
Rilmenidina	1	2	1	Delapril	15	30	1-2
Reserpina*	12,5	25	1-2	Enalapril	5	40	1-2
Betabloqueadores			Fosinopril 10 20 1				
Atenolol	25	100	1-2	Lisinopril	5	20	1
Bisoprolol	2,5	10	1-2	Perindopril	4	8	1
Carvedilol*	12,5	50	1-2	Quinapril	10	20	1
Metoprolol e Metoprolol (ZOK)***	50	200	1-2	Ramipril	2,5	10	1
Nadolol	40	120	1	Trandolapril	2	4	1
Nebivolol**	5	10	1	Bloqueadores do receptor AT₁			
Propranolol**/ Propranolol (LA)***	40/80	240/160	2-3/1-2	Candesartana	8	32	1
Pindolol	10	40	1-2	Irbersartana	150	300	1
Alfabloqueadores			Losartana 25 100 1				
Doxazosina	1	16	1	Olmesartana	20	40	1
Prazosina	1	20	2-3	Telmisartana	40	160	1
Prazosina XL***	4	8	1	Valsartana	80	320	1
Terazosina	1	20	1-2				
Vasodilatadores diretos							
Hidralazina	50	150	2-3				
Minoxidil	2,5	80	2-3				

* Medicamentos comercializados apenas em associações com outros anti-hipertensivos. ** Dose máxima variável de acordo com a indicação médica. *** Retard, SR, ZOK, Oros, XL, LA, AP, SR e CD: formas farmacêuticas de liberação prolongada ou controlada. + Alfa-1 e betabloqueador adrenérgico. ++ Betabloqueador e liberador de óxido nítrico.

Figura 1. Medicamentos anti-hipertensivos utilizados na medicina atual para manejo e controle da pressão arterial disponíveis no Brasil.

Fonte: Adaptado de VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Capítulo 6. Tratamento Medicamentoso. Jornal Brasileiro Nefrologia 32; Supl1 (2010) S29-S43.

Os medicamentos de primeira escolha como os diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, antagonistas ou bloqueadores dos receptores do tipo AT₁, para angiotensina tipo II, assim como bloqueadores para canais de cálcio estão listados acima e devem ser utilizados inicialmente no manejo ao paciente com hipertensão (WHELTON et

al., 2017). Caso seja necessário o emprego de outros fármacos, são utilizados aqueles tidos como agentes secundários ou de segunda escolha, como diuréticos e beta-bloqueadores.

Apesar da grande quantidade de medicamentos para controle da pressão sanguínea, a hipertensão resistente tem sido relatada entre 5-30% da população hipertensa em geral segundo estudo da Sociedade Europeia de Hipertensão e Sociedade Europeia de Cardiologia (ESH e ESC, 2013), porém, inconsistências na definição e resistência ao tratamento, associado à diferenças étnicas entre populações estudadas mundialmente, elevam a taxa de prevalência relatada para hipertensão resistente aos fármacos, alcançando índices que podem chegar até 50% da população hipertensa no geral (WEBER e ANLAUF, 2014).

A hipertensão resistente é definida por falha na realização do controle e remissão dos altos níveis de pressão sanguínea com medidas adequadas de estilo de vida e alimentação, uso de diurético associado a dois outros fármacos anti-hipertensivos de classes diferentes e em doses adequadas, mas ainda assim não há redução dos valores pressóricos (WEBER e ANLAUF, 2014). A resistência vascular periférica, através das artérias de resistência, responde de maneira diferente das artérias de grande calibre, com relação à síntese e liberação de compostos vasoativos e vasorrelaxantes (MULVANY, 2012; REHO, ZHENG & FISHER, 2014) sendo que, fisiologicamente, o débito cardíaco também exerce importante modificação pelo sistema nervoso autônomo, nos receptores muscarínicos, de modo a reduzir a frequência cardíaca e conseqüentemente a pressão arterial (CAMPAGNOLE-SANTOS e HAIBARA, 2001). Em doenças como hipertensão arterial há uma mudança também na reatividade e estrutura da parede dos vasos sanguíneos, com diminuição da biodisponibilidade ou liberação de compostos vasoativos derivados do endotélio (REHO et al., 2014), alterando a modulação da resistência vascular periférica.

As disfunções cardíacas e vasculares que ocorrem no estado hipertensivo contribuem para o aumento da resistência vascular sistêmica e conduzem ao desenvolvimento do quadro de inflamação subsequente (BATLOUNI, 2001). Embora não esteja bem definido se a inflamação é uma causa ou efeito da fisiopatologia da hipertensão, já está bem descrito que

ambas cursam ou evoluem juntas no quadro hipertensivo. Outros fatores que contribuem para a hipertensão, tais como envelhecimento, também estão associados à inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Por isso, afirma-se que, medicamentos anti-inflamatórios poderiam ser usados não só para tratar a hipertensão no futuro, mas também para tratar outras doenças cardiovasculares por minimizar o estresse oxidativo e a disfunção endotelial (QIU et al., 2014; SETO et al., 2013).

Pacientes com este tipo de hipertensão resistente têm 3 vezes pior prognóstico do que aqueles com hipertensão controlada, uma vez que em muitos casos apresentam danos à órgãos alvo, de maneira a sofrer as consequências da desregulação da pressão arterial que podem variar desde tonturas até consequências mais graves como a instalação de doenças cérebro ou cardiovasculares (ESH e ESC, 2013). Os produtos naturais podem constituir uma alternativa para tratamento de doenças do sistema cardiovascular e novos estudos devem ser feitos com o objetivo de fornecer maior embasamento científico ao seu potencial terapêutico (ANJOS et al., 2013; MENEZES, BARRETO, ANTONIOLLI, SANTOS e SOUSA, 2010; MOREIRA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2010; MENEZES et al., 2010).

Os óleos essenciais são produtos naturais advindos de plantas e são constituídos principalmente de moléculas chamadas terpenos (PADUCH et al., 2016). As plantas produzem naturalmente moléculas de isopreno (C₅H₈)_n que são os principais componentes dos terpenos e a depender de sua conformação ou da organização de seus constituintes, apresentam diferentes classificações, sendo divididos em sesquiterpenos, triterpenos, monoterpenos, entre outros (SHARKEY, WIBERLEY e DONOHUE, 2008). Os monoterpenos pertencem a este diverso grupo de compostos químicos e faz parte de cerca de 90% dos óleos essenciais com enorme variedade de estruturas e funções. Em sua composição, os monoterpenos têm duas unidades de isoprenos (C₁₀) e são amplamente estudados em todo o mundo (GUIMARÃES, QUINTANS e QUINTANS-JÚNIOR, 2012; SANTOS et al., 2011; SHARKEY, WIBERLEY, e DONOHUE, 2008)

Os principais constituintes químicos dos óleos essenciais das plantas são os monoterpenos, obtidos em uma grande variedade de plantas aromáticas, por diferentes métodos de extração. Os monoterpenos apresentam

várias propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória (DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS et al., 2013), antinociceptiva e analgésica (GUIMARÃES et al., 2012), vasorrelaxante (SANTOS et al., 2011), ansiolítica, antidepressiva e sedativa (HELDWEIN et al., 2014; LINCK et al., 2010; SUGAWARA et al., 1998).

Podem ser divididos em três subgrupos: acíclico, como linalol; monocíclico, a exemplo do α -terpineol; e bicíclico, como a cânfora. A partir dessa divisão, cada subgrupo pode ainda ser classificado em hidrocarbonetos insaturados, alcoóis, aldeídos, entre outros (SANTOS et al., 2011). Entre os estudos sobre monoterpenos encontrados na literatura científica, alguns apresentam avaliação *in vivo* dos efeitos biológicos no sistema cardiovascular. A administração intravenosa em ratos normotensos e não anestesiados demonstrou que (+)-alpha-pineno, (-)-beta-pineno, (+/-)-citronellol e (+/-)-linalol (1, 5, 10, e 20 mg/kg, i.v.) foram capazes de induzir hipotensão e taquicardia (MENEZES, BARRETO, ANTONIOLLI, SANTOS e SOUSA, 2010; SANTOS et al., 2011)

Em uma revisão sobre os monoterpenos que apresentaram algum tipo de efeito sobre o sistema cardiovascular, foram encontrados 17 artigos e entre os 33 monoterpenos pesquisados com atividades cardiovasculares, apenas 16 deles foram encontrados em publicações: carvacrol, citronelol, eucaliptol, as frações de (-)-linalol e (+)-linalol, mentol, myrtenal, myrtenol, rotundifolona, sobrerol, timol, α -limoneno, α -terpinen-4-ol, α -terpineol, p-cimeno, álcool perilílico, α -pineno e β -pineno (SANTOS et al., 2011).

O linalol (LIN) é encontrado principalmente em plantas, como a bergamota (*Citrus bergamia*), jasmim (*Jasminum auriculatum*), manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e coentro (*Coriandrum sativum*), largamente utilizados na culinária brasileira (CAMARGO e DE VASCONCELOS, 2014). Denominado quimicamente por 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol **Figura 2**, o linalol é um monoterpeno alcoólico terciário de cadeia aberta (ANJOS et al., 2013), de peso molecular 154,25 g/mol, densidade de 0,862 g/mL e fórmula (C₁₀H₁₈O). Apresenta seu ponto de ebulição a 199 °C e solubilidade em água, na proporção de 1,589 g/L (LAPCZYNSKI, LETIZIA e API, 2008).

Este monoterpeno apresenta várias atividades farmacológicas promissoras, tais como antinociceptiva e anti-inflamatória (PEANA et al., 2003,

2004; PEANA, MARZOCCO, POPOLO e PINTO, 2006) e redução da alodinia em modelos de dor neuropática. Mostrou ainda apresentar atividade sedativa com modulação glutamatérgica por mecanismos centrais (BATISTA et al., 2008; PEANA et al., 2004, 2006). É possível visualizar sua estrutura química logo abaixo na **Figura 2**.

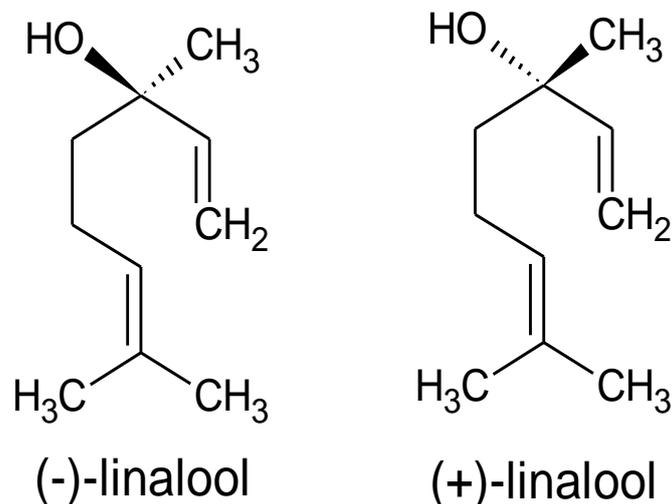


Figura 2. Estrutura química de (-)-Linalol e (+)-Linalol.

Fonte: Elaborado pelos Autores

O LIN é uma das substâncias mais importantes na indústria farmacêutica e de alimentos, usada como fixador de fragrâncias e componente de produtos de perfumaria, sendo utilizado pela medicina popular, através de raízes, caules, folhas e frutas de plantas aromáticas, para fins anti-inflamatórios, anti-nociceptivos e anti-hipertensivos (ANJOS et al., 2013; DE SIQUEIRA et al., 2014). Em relação às atividades cardiovasculares destacam-se os efeitos antitrombóticos, antiplaquetários, vasorrelaxante, hipotensor, atividade bradicárdica, além de proporcionar melhoria no fluxo coronariano (ANJOS et al., 2013; CAMARGO e DE VASCONCELOS, 2014).

Naturalmente encontrado na forma de dois estereoisômeros, 3R-(-)-Linalol e 3S-(+)-Linalol, com odores distintos e diferentes efeitos biológicos. O isômero levo-rotatório, lincareol, apresenta um aroma de lavanda e flores frescas, enquanto o dextro-rotatório, coriandrol, um cheiro herbáceo, com tons de folhas envelhecidas, frequentemente descritas com características cítricas (ALVIANO et al., 2005; PEANA et al., 2006). De maneira prevista, mas não

menos interessante, os resultados dos estudos sobre o sistema cardiovascular mostraram que os isômeros ópticos tiveram efeitos opostos.

Enquanto a fração levo-rotatória (+)-linalool apresenta efeito estimulante sobre o sistema cardiovascular, causando efeito hipertensivo e taquicardia, enquanto que a fração dextro-rotatória (-)-linalool apresenta efeito depressor, com hipotensão associada à bradicardia (MENEZES et al., 2010; SANTOS et al., 2011). A atividade hipotensora de (±)-linalol em ratos normotensos não anestesiados mostrou que este monoterpene foi capaz de induzir hipotensão associada à taquicardia, sugerindo um efeito sobre a resistência vascular periférica com consequente resposta barorreflexa (ANJOS et al., 2013).

Em um artigo de revisão, diferentes espécies de animais, foram utilizadas nos estudos, com diversas doses aplicadas, em diferentes vias de administração: oral, intraperitoneal e intravenosa e foi possível concluir que uma dose segura de linalol, sem qualquer efeito adverso associado, é administrada por via oral em quantidade inferior à 116,6 mg/kg (LAPCZYNSKI et al., 2008). Em galinhas, a dose de 100 mg/kg de linalol em cápsulas gelatinosas não causou mortes, nem efeitos tóxicos, de modo a propor que linalol parece não apresentar qualquer potencial efeito imunotóxico ou neurotóxico, mas os achados ainda precisam ser confirmados HOOD et al., 1978 apud (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Clinicamente, (-)-linalol já foi testado em estudos com seres humanos, sendo demonstrada sua atividade relaxante e calmante quando inalado (HÖFERL e KRIST, 2006). A administração do linalol foi capaz de apresentar efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais, de maneira a atenuar a dor induzida por diversos estímulos. Seu efeito antinociceptivo parece envolver a inibição da transmissão glutamatérgica, dopaminérgica e opióide, sem excluir a participação dos canais para potássio, cujo efeito anti-hiperalgésico pode resultar da estimulação indireta dessas três famílias de receptores que são acoplados à proteínas capazes de induzir a abertura de canais para K⁺ (PEANA et al., 2004).

Outros efeitos também foram listados para o linalol tais como: anti-leishmaniose (MENDONC et al., 2003) e antimicrobiano, podendo ser utilizado no combate aos microrganismos causadores de infecções hospitalares (ALVIANO et al., 2005; AZEVEDO et al., 2013). Além dessas propriedades,

ações hipotérmicas e sedativas, foram observadas quando inalado por cerca de 1h, sem trazer comprometimento nas funções motoras, comprovando que a estimulação olfatória pela inalação do chá de jasmim, rico em linalol, induz bradicardia e efeito sedativo (KURODA et al., 2005). Outros estudos também demonstraram efeito ansiolítico e sedativo de linalol após inalação, sugerindo propriedades biológicas eficientes por via inalatória (LINCK et al., 2009; LINCK et al., 2010).

O (-)-linalol tem, ainda, ação direta sobre o músculo liso vascular, sendo capaz de relaxar contrações induzidas por $PGF2\alpha$, em preparações de aorta de camundongo, induzindo vasorrelaxamento dependente de endotélio funcional, via ativação de guanilil ciclase solúvel, assim como de canais para potássio, com ação inibitória sobre o influxo de cálcio (KANG e SEOL, 2015). Além disso, linalol apresentou potente atividade espasmolítica sobre contrações induzidas por fenilefrina, em preparações *in vitro* de anéis de artéria mesentérica de ratos de modo a apresentar seu mecanismo de ação independente de endotélio funcional, envolvendo o bloqueio de canais para cálcio sensíveis a voltagem (ANJOS et al., 2013).

Apesar dos óleos essenciais extraídos de plantas e os monoterpenos nele presentes apresentarem uma variedade imensa de ações biológicas, algumas limitações em relação às suas ações são observadas pelo fato de apresentarem importante volatilidade e acentuada lipossolubilidade (SANTOS et al., 2011). A partir deste raciocínio, sistemas de liberação controlada, têm sido utilizados há décadas para melhorar as propriedades biológicas de muitas substâncias e compostos, principalmente através das CDs.

Do ponto de vista da entrega de medicamentos por via oral, as CDs aumentam a concentração de princípios farmacêuticos e atingem a circulação sistêmica a partir do sistema gastrointestinal. O que se espera de uma formulação como as ciclodextrinas é o fornecimento oral de alta carga de fármaco, garantia de uma liberação controlada ou direcionada do fármaco em questão e modular uma redução nos efeitos colaterais (SZEJTLI, 2004). Consideradas macromoléculas naturais e cíclicas, as CDs podem ser obtidas por degradação enzimática do amido e apresentam um número de unidades de glicose compreendidas entre 6 e 8, denominando-se respectivamente, α -, β - e

γ -CD (JIANXIANG, ZHANG e PETER, 2014; PINHO, GROOTVELD, SOARES e HENRIQUES, 2013).

O tamanho e forma da cavidade em cone, em combinação com o tamanho, polaridade e potencial de polarização do hóspede são os principais determinantes para a utilização como hospedeiros (SERAFINI et al., 2012). A constituição com interior de caráter hidrofóbico e hidroxilas livres na periferia, lhes conferindo caráter hidrofílico, possibilita a estes oligossacarídeos sua utilização na formação de complexos de inclusão (DE AZEVEDO et al., 2011) e ainda representam um grande avanço na área da ciência, principalmente no que diz respeito à melhora da efetividade de terapias farmacológicas. Como um dos principais e mais importantes efeitos, o aumento da biodisponibilidade, permitindo que a substância hóspede alcance concentrações terapêuticas nos fluidos biológicos (CEBORSKA, ASZTEMBORSKA, LUBORADZKI, e LIPKOWSKI, 2013).

As CDs são capazes de proteger as moléculas hóspedes da degradação do meio externo, reduzir a volatilidade e conferir estabilidade química e física sendo que ainda podem levar ao aumento ou otimização das atividades e propriedades terapêuticas, com redução de efeitos colaterais e reações adversas. Outro importante efeito é promover uma adequação quanto ao número de administrações necessárias para um tratamento biologicamente eficaz com o fármaco ou princípio ativo a ser complexado neste sistema de liberação controlada (BHANDARI, D'ARCY, e PADUKKA, 1999)

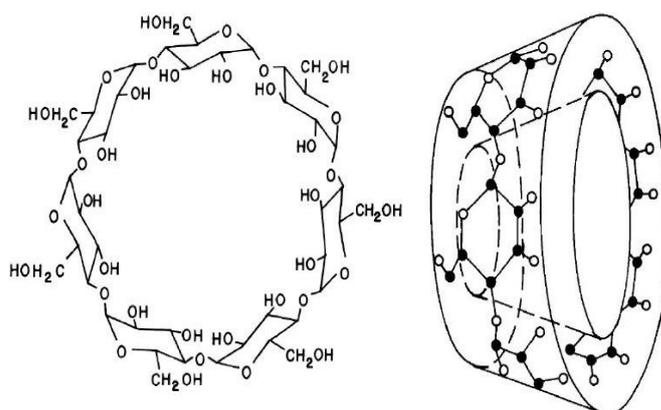


Figura 3. Estrutura química da β -ciclodextrina e estrutura em 3 dimensões demonstrando sua forma de cone truncado. Adaptado de Loftsson, Jarho, & Järvinen, 2005.

Fonte: LOFTSSON T., JARHO P., MÁSSON M. & JÄRVINEN T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion Drug Delivery*. v. 2, n. 2, 2005.

Devido a sua cavidade hidrofóbica, na qual substratos podem ser aprisionados para formarem complexos de inclusão, as ciclodextrinas podem hospedar distintos compostos, cuja proporção mais usual é 1:1. A química do fenômeno de inclusão molecular demonstra um sistema de complexidade estrutural no qual a ciclodextrina é o hospedeiro e o substrato é o hóspede, os quais se mantêm juntos principalmente através de forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (NUMANOĞLU et al., 2007; RAJESWARI, ALKA, JAVED, e KHA, 2005).

Segundo Lima, a formação do complexo de inclusão facilita em alguns casos, a solubilização de substâncias pouco solúveis e em outros, precipita algum componente em solução ou suspensão. Em solução, a molécula hóspede vai estar inteira ou parcialmente, dentro da cavidade da ciclodextrina (LIMA et al., 2016). No estado cristalino, a molécula hóspede pode estar localizada dentro da cavidade, mas também nos espaços intersticiais formados pela rede do complexo. Além destas habilidades, há potencial para proteger, controlar e sustentar a entrega de compostos bioativos. Em adição aos benefícios terapêuticos, os principais desafios relacionados ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada incluem a combinação apropriada com a molécula hospedeira e habilidade para controlar sua concentração (DAVIS e BREWSTER, 2004; JIANXIANG ZHANG e PETER, 2014).

As CDs são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e na agricultura como agentes estabilizantes de substâncias voláteis ou instáveis (APPL e CYCLODEXTRIN, 2004, MORIWAKI, MAZZER, e PAZZETTO, 2009). Entre os requisitos necessários à complexação, a compatibilidade de tamanhos e geometrias entre a cavidade da ciclodextrina e a molécula hóspede são importantes sendo que há casos em que apenas uma parte da estrutura do hóspede fica incluída na cavidade (MARQUES, 2010).

Os sistemas de administração de fármacos aumentam o potencial das substâncias como os óleos essenciais, de forma a tornar mais potentes os princípios ativos dos constituintes (MENEZES et al., 2014; MENEZES et al., 2012; MOREIRA et al., 2016; TRINDADE et al., 2019). No Brasil, o amido de mandioca é utilizado como substrato para a produção de CDs, pois tem um

baixo custo de produção e alto rendimento (MORIWAKI et al., 2009). Do ponto de vista estrutural, as ciclodextrinas podem alterar as propriedades físicas e químicas da molécula hóspede. Métodos de complexação foram relatados para melhorar as características dos fármacos, tais como solubilidade e biodisponibilidade com redução de efeitos colaterais (JIANXIANG ZHANG & PETER, 2014; MENEZES et al., 2012)

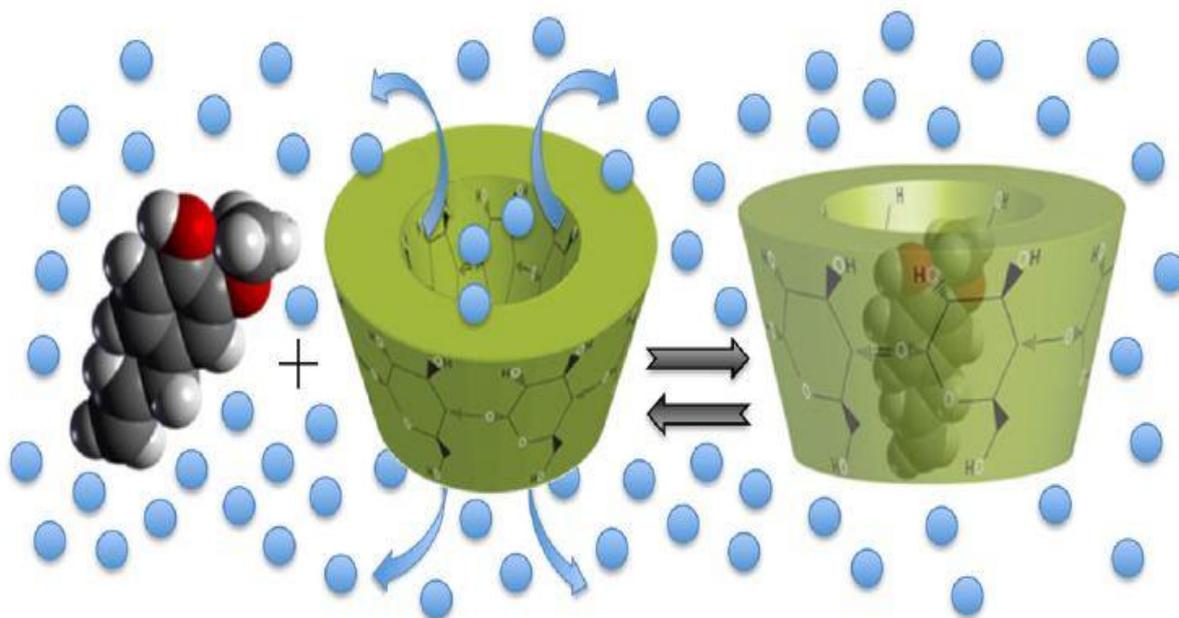


Figura 4. Representação esquemática da formação típica do complexo de inclusão com a beta-ciclodextrina. Adaptado de MURA, 2014.

Fonte: MURA P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 2014.

As ciclodextrinas podem ser administradas em seres humanos ou animais, fazendo parte de medicamentos ou alimentos, seja na forma livre ou como complexos de inclusão. Se a ciclodextrina é administrada por via oral, fazendo parte do complexo, ocorre sua dissociação no trato gastrointestinal, degradadas em açúcares absorvíveis no cólon intestinal e finalmente excretadas como dióxido de carbono e água, sendo processos separados, a absorção da molécula hóspede e da ciclodextrina (RAKMAI et al., 2018).

Em estudos sobre a atividade antinociceptiva do (-)-linalol e linalol complexado em β -ciclodextrina (LIN- β CD), ambos apresentaram atividade antinociceptiva no modelo animal de hiperalgisia muscular crônica inflamatória,

em todas as doses testadas, tendo o LIN- β -CD atividade prolongada em relação a substância isolada, sugerindo que a complexação produziu uma melhoria significativa na ação terapêutica (COELHO ET AL., 2013; NASCIMENTO, CAMARGO, e DESANTANA, 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013). Usadas principalmente para aumentar a solubilidade em água de materiais lipofílicos, aumenta a estabilidade física e química das moléculas hospedeiras (RAKMAI et al., 2018), o que as protege contra decomposição, oxidação ou hidrólise e fornece a liberação controlada de princípios ativos e da absorção de compostos na pele, assim como estabiliza emulsões e suspensões (NUMANOĞLU et al., 2007).

Para muitos fármacos, o tamanho da cavidade de α -CDs é insatisfatório e os γ -CDs são mais caros. Assim entre as ciclodextrinas, a β -ciclodextrina (β -CD) que apresenta 7 unidades de glicose em sua constituição, é a que melhor se adapta diante da complexação (ADEOYE e CABRAL-MARQUES, 2017) e quando administradas por via oral, as ciclodextrinas são consideradas seguras e praticamente sem toxicidade. Após a descoberta de propriedades promissoras das CDs, foi possível estudar novas formulações de fármacos anti-hipertensivos. Embora existam poucos estudos correlacionando formulações de β -CD em doenças cardiovasculares, demonstramos que o linalol e o complexo de inclusão contendo este monoterpeneo é capaz de melhorar as atividades farmacológicas e anti-hipertensivas em animais espontaneamente hipertensos SHR (CAMARGO et al., 2018).

A farmacocinética é de suma importância para entender as possibilidades e variedades que um fármaco apresenta, esteja ele em sua forma livre ou complexado (SHI, ZHAO, FIREMPONG e XU, 2016). Para melhor entender toda a dinâmica corporal do fármaco, os parâmetros farmacocinéticos individuais e médios geralmente são observados. Dados como a meia vida ($t_{1/2}$) que representa o tempo gasto para que a concentração plasmática ou a quantidade original de um fármaco no organismo se reduza à metade, o conhecimento desta constante permite a manutenção de um platô ou faixa de concentração terapêutica constante, por reposição da parte do fármaco que está sendo eliminado. Há também estudos sobre os índices ou constante de absorção (k_a), que é uma variável que define a absorção de um fármaco, que se desloca do seu local de administração e alcança o fluxo

sanguíneo, e constante de eliminação (k_e) que é o fluxo ou fração do fármaco eliminado em função da variável tempo de exposição, que equivale às curvas ou linhas de concentração descendentes nos gráficos.

O clearance (CL), também é um parâmetro de suma importância nos estudos farmacocinéticos já que é a capacidade do rim ou do fígado de eliminar do sangue circulante, substâncias derivadas do metabolismo do fármaco administrado; volume de distribuição (Vd), em que o fármaco se distribui do fluxo sanguíneo para outros tecidos. A velocidade de transporte das substâncias para esses locais varia conforme a constante ou velocidade de distribuição que sofre interferência de fatores fisiológicos como a perfusão sanguínea e características físico-químicas do fármaco, assim como estudo do tempo de residência médio (MRT), tempo de absorção médio (MAT), área sob a curva (ASC) e índices como biodisponibilidade absoluta (Fabs) e biodisponibilidade relativa (Frel) precisam ser estimados, uma vez que a biodisponibilidade é a fração do fármaco inalterado que alcança a circulação sistêmica e pode indicar também a velocidade e a extensão com que o fármaco atinge a circulação, tendo em vista a formulação do perfil farmacocinético de um fármaco (KAISER, JOHANSSON, TONI, OLIVEIRA, e DALLA, 2010).

Diante do exposto, o potencial farmacológico dos produtos naturais no tratamento da hipertensão e doenças cardiovasculares tem cada vez mais impacto na sociedade e com base nos resultados já encontrados na literatura e na ausência de pesquisas científicas específicas sobre o possível efeito de linalol e seu complexo com β -ciclodextrina (LIN- β CD) como potencial anti-hipertensivo houve então a motivação para realização deste trabalho.

3 HIPÓTESE

Diante do exposto, hipotetizamos que o monoterpeno linalol quando em complexo de inclusão associado à beta-ciclodextrina (LIN/ β -CD), apresenta seus efeitos biológicos no sistema cardiovascular superiores àqueles apresentados por linalol puro (LIN), com potencial terapêutico anti-hipertensivo otimizado quando incluído em sistema de liberação controlada.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a farmacocinética e o potencial anti-hipertensivo do monoterpeno linalol quando em complexo de inclusão com a β -ciclodextrina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia analítica por HPLC ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção ultravioleta para dosagem do linalol livre e complexado à ciclodextrinas em plasma de ratos;
- Determinar as concentrações totais de linalol livre e complexado à β -ciclodextrina no plasma de ratos após administração oral;
- Calcular os parâmetros farmacocinéticos do linalol livre e complexado à β -ciclodextrina;
- Investigar as influências hemodinâmicas de linalol livre ou complexado, após administração aguda, através de medida direta da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos com hipertensão essencial (SHR);
- Avaliar os efeitos do tratamento subcrônico por 21 dias em animais SHR com linalol para investigar seu potencial anti-hipertensivo e comparar os resultados obtidos com os obtidos na forma complexada à β -CD;
- Observar as alterações no índice de massa cardíaca de animais hipertensos após tratamento subcrônico por 21 dias com linalol, bem como sua forma complexada à β -CD;
- Observar as alterações na reatividade vascular em artéria mesentérica superior de animais hipertensos após tratamento subcrônico de 21 dias com linalol, bem como sua forma complexada à β -CD;
- Mensurar a produção e expressão de citocinas inflamatórias através das técnicas de ELISA em ratos submetidos a tratamento subcrônico por 21 dias com linalol livre e encapsulado à β -CD.
- Avaliar o potencial anti-hipertensivo de linalol livre e complexado a β -CD após tratamento crônico por 60 dias em animais hipertensos e normotensos;

- Analisar a reatividade vascular de artéria mesentérica superior isolada rato SHR e wistar submetidos à tratamento crônico por 60 dias com linalol livre e complexado.

- Avaliar a morfologia cardíaca e de tecidos isolados de animais normotensos e hipertensos tratados cronicamente com linalol livre ou complexado por 60 dias.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) entre 8^a e 16^a semanas de vida, pesando entre 150 e 300g, assim como animais normotensos wistar, também entre 8 e 16 semanas, com pesos variando de acordo ao crescimento, entre 150 e 450g. Para os experimentos de administração aguda, seja via intravenosa ou oral, foram utilizados animais SHR a partir de 12 semanas de vida, uma vez que estes já apresentam a hipertensão instalada. A diferenciação entre os usos dos animais pode ser mais bem entendida no esquema abaixo **Figura 5**. Através da literatura científica, é possível observar que as primeiras alterações cardiovasculares dos animais espontaneamente hipertensos são relacionadas à frequência cardíaca e ocorrem por volta da 4^a semana de vida.

Os níveis pressóricos destes animais começam a aumentar por volta da 6^a semana, sendo considerados pela literatura como pré-hipertensos quando alcançam a 8^a semana de idade e a partir da 12^a semana, a hipertensão encontra-se estabelecida (FAZAN et al., 2006). Dessa forma, diante do exposto, os animais foram submetidos ao tratamento a partir deste período, mais especificamente a partir da 9^a semana de vida visando avaliar se o tratamento seria capaz de evitar o estabelecimento da hipertensão e quando falamos no tratamento subcrônico os animais finalizavam as administrações dos compostos com 12 semanas de vida.

Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências, alocado no Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Estes animais foram constantemente mantidos em caixas sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (06:00 – 18:00 horas), tendo livre acesso à alimentação e água, e condições controladas de consumo, quando em tratamento subcrônico. Estes protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, alocado no Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, sobre o protocolo CEUA-ICS UFBA No. 085/2015.



Figura 5. Desenho esquemático demonstrando os tipos de ensaio realizados em nossos experimentos, com informações das idades dos animais e início dos tratamentos. Protocolos subcrônicos e crônicos utilizaram animais a partir de 8 semanas de vida para observar o início e evolução dos níveis pressóricos ao longo dos tratamentos.

5.2 OBTENÇÃO DO COMPLEXO LINALOL/ β -CD

O ácido acético, β -CD ($\geq 97\%$ de pureza), LIN ($\geq 97\%$ de pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A obtenção do complexo foi realizada segundo (MENEZES et. al., 2013). Os complexos de inclusão foram preparados por três procedimentos diferentes. Uma mistura física que foi preparada pela adição de (-)-linalol a uma argamassa contendo β -CD em pó, sobre agitação manual. O complexo de inclusão (-)-linalool/ β -CD manteve sua relação molar e a preparação por mistura mecânica foi armazenada em recipientes de vidro hermeticamente fechados.

A complexação de pasta foi realizada por homogeneização de β -CD (1.135 mg) com água (1,2:4, p/v, mg / mL) e em segundo passo, uma massa de 154 mg de (-)-linalol (1:1) foi adicionado à pasta de β -CD sob uma agitação manual constante. Subsequentemente, o material foi seco à temperatura

ambiente em um dissecador até formar uma película de vidro, que foi removida por trituração manual e armazenada em recipientes de vidro.

A etapa final de complexação de lama foi realizada pela adição de água em um meio contendo 1,135 mg de β -CD (3:4, p/v,mg/mL). Novamente 154 mg de (-)-linalol, que é 1:1 molar em proporção com o hospedeiro, foi adicionado à pasta e agitou-se por 36 h por um dispositivo de agitação magnético a 400 rpm (QuimisQ 261A21, Brasil).

Posteriormente, a mistura foi transferida para outro recipiente, passando por um processo de secagem em um dissecador assim como liofilização. Após todos estes procedimentos e o complexo de inclusão ter sido preparado, foi submetido aos testes de estabilidade da preparação como publicado em (MENEZES, 2013). O complexo foi gentilmente cedido para experimentação pela Universidade Federal de Sergipe, em colaboração com os professores Dr. Adriano Antunes e José Lucindo Quintans-Júnior.

5.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Para avaliar o potencial anti-hipertensivo do monoterpene linalol puro e complexo formado entre e LIN/ β -CD foram utilizadas duas diferentes formas de abordagem, uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais com hipertensão essencial SHR e normotensos wistar assim como outras abordagens *in vitro*, utilizando vasos sanguíneos, sangue e plasma assim como tecidos isolados destes animais.

5.4 ENSAIOS *IN VIVO*

5.4.1 *Estudos Farmacocinéticos Plasmáticos e Modelagem Populacional através da Metodologia de quantificação do linalol por CLAE/UV*

Foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica para analisar as doses de linalol e complexo que foram testadas por via oral e intravenosa em amostras de plasma de ratos, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com quantificação no Ultravioleta (CLAE/UV-Vis) de acordo com as normas da Resolução RDC nº 27 de 2012 (BRASIL, 2012).

O equipamento utilizado foi cromatógrafo da marca PerkinElmer, modelo Flexar™ HPLC, com injetor VI Flow e bomba binária de solventes. A fase estacionária composta de coluna de fase reversa (Nucleosil C-18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, Macherey - Nagel, Alemanha) protegida por uma pré-coluna (Hypersil BDS C-18, 10 mm, 5 µm, Thermo Scientific, EUA) em uma temperatura de 50°C.

O volume de amostra injetado no sistema foi de 20 µL e a fase móvel foi composta por água: acetonitrila (70:30, v/v), modo isocrático em fluxo de 1 mL/min. O linalol foi detectado em comprimento de onda de 210 nm com um tempo de corrida de 18 minutos. O método foi linear, preciso e exato na faixa de 5 - 100 µg/mL com as amostras de controles de qualidade baixo, médio e alto nas concentrações de 7, 30 e 70 µg/mL, respectivamente.

As amostras foram preparadas em microtubo plástico de 2,0 mL contendo 90 µL de plasma e 10 µL de solução de linalol previamente preparadas. A precipitação de matrizes biológicas é realizada através da adição de 300 µL de acetonitrila. As amostras são agitadas em vórtex durante 3 minutos, e centrifugadas a 13000 RCF por 15 minutos, a 8°C. O sobrenadante é retirado e analisado por CLAE. Foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do linalol e complexo em ratos wistar sadios após a administração dos compostos nas doses de 50 mg/kg via i.v. e 100 mg/kg por duas vias a i.v. e oral.

No dia do experimento, os animais receberam LIN nas doses supracitadas através da veia lateral caudal ou por gavagem oral. Seis animais foram avaliados por grupo. Essa amostra foi determinada a partir de dados contidos na literatura (JOHANSSON, TERESA, e COSTA, 2014; KAISER et al., 2010) Após a administração dos compostos, as amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal em tempos pré-determinados e processadas sendo que o plasma congelado à -20°C para posterior análise.

Os modelos farmacocinéticos populacionais foram obtidos utilizando os dados observados em três grupos: 6 ratos após administração *i.v. in bolus* do linalol livre, 6 ratos após administração oral de linalol livre, 6 ratos após administração oral de linalol complexado. Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados usando abordagem populacional através do software Monolix® Suite 2019R1 (Lixoft®, Antony, França).

Foram avaliados os modelos estruturais de 1- e 2- compartimentos com os dados de concentração plasmática após administração i.v. de linalol livre e oral com linalol livre e complexado, cuja absorção é de primeira ordem e eliminação linear. Esses dados foram descritos utilizando uma distribuição log-normal. Os modelos foram parametrizados em volume de distribuição (V), constante de absorção (ka), constante de eliminação (k), e as constantes de distribuição (k1-2 e k2-1). Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados utilizando a aproximação estocástica que é uma ferramenta probabilística de estimativas, que aproxima variáveis aleatórias representando a evolução de um sistema de valores com relação ao tempo.

Diferentes modelos de erros foram analisados para explicar a variabilidade do erro residual incluindo modelo de erro constante, proporcional e combinado. Os modelos foram comparados considerando os valores de verossimilhança, representados por $-2 \times \log\text{-likelihood}$ (-2LL), e dos critérios de Akaike (AIC). Foram estabelecidos o modelo base para a administração i.v. e para a administração oral. Para o linalol oral, após estabelecer o modelo base, novos modelos adicionando as covariáveis categóricas investigadas no estudo foram desenvolvidos. A análise dos gráficos e testes estatísticos por correlação de Pearson e ANOVA foram realizados para verificar se há alguma relação entre os efeitos aleatórios dos parâmetros (η) e as covariáveis que poderia contribuir para melhorar o modelo.

A adição da covariável foi considerada estatisticamente significativa quando resultou em uma redução de 3,84 do valor de -2LL (χ^2 , $P \leq 0,05$, graus de liberdade= 1) e redução de 2 no valor de AIC (Mould; Upton, 2013). Durante o desenvolvimento dos modelos base até a obtenção dos modelos finais, os gráficos diagnóstico que mostram o ajuste dos dados observados ao modelo desenvolvido também foram avaliados. Portanto, foram avaliados os gráficos que correlacionam as concentrações plasmáticas observadas com as concentrações plasmáticas individuais ou populacionais preditas; gráficos de distribuição dos resíduos individuais (IWRES). Além disso, para avaliar se simulações realizadas a partir do modelo desenvolvido são capazes de reproduzir a mediana e a variabilidade dos dados observados foi gerado um gráfico para verificação dos dados preditos (VPC) visual predictive check.

5.4.2. Investigação do efeito de LIN/ β -CD na hemodinâmica de animais SHR

Este protocolo foi realizado para avaliarmos os efeitos hemodinâmicos induzidos pela administração aguda, por via intravenosa e por via oral, de LIN e LIN/ β -CD em ratos espontaneamente hipertensos SHR. Foram avaliados os efeitos agudos sobre a pressão arterial bem como as alterações na frequência cardíaca, após administração dos compostos. Para tal finalidade, inicialmente, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina e foi realizado um procedimento cirúrgico para inserção de cateteres de polietileno.

Um segmento de PE-10 foi fixado à um segmento de PE-50 de modo que através da artéria femoral e veia femoral foram implantados para acessar a aorta abdominal para aferir os parâmetros cardiovasculares e a veia cava inferior para administração das drogas respectivamente, como é possível visualizar na imagem abaixo, **Figura 5**.

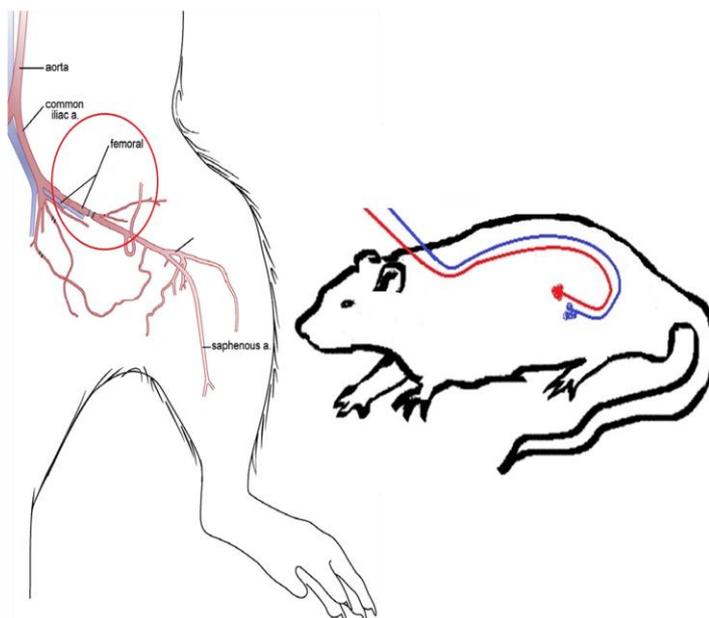


Figura 5. Região de incisão cirúrgica para cateterismo da artéria e da veia femoral. Desenho esquemático demonstrando procedimento cirúrgico e disposição dos cateteres utilizados.

Fonte: Adaptado de Ziegler, M. A., DiStasi, M. R., Miller, S. J., Dalsing, M. C., & Unthank, J. L. (2016). Novel method to assess arterial insufficiency in rodent hind limb. *Journal of Surgical Research*, 201(1), 170-180.

Após a inserção e fixação, os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente através de uma incisão na região cervical posterior do animal

para evitar sua retirada e tornar possível a realização do experimento com o animal sem anestesia, movimentando-se espontaneamente. Após 24 horas da realização dos procedimentos cirúrgicos, a pressão arterial foi monitorada continuamente durante todo o tempo do protocolo, através do cateter arterial conectado a um transdutor de pressão arterial (ADInstruments) cujo sinal foi amplificado e gravado digitalmente por uma interface analógico para digital (Power/Lab 8-35, requerimento de aquisição de dados, LabChart, New South Wales, Austrália) e gravação (1 kHz) para posterior análise. Após os parâmetros cardiovasculares terem se estabilizado por 30 minutos, os valores de PA e FC foram registrados como valores controle, aferidos após os primeiros 30 min. e valores teste, em tempos aleatórios de acordo à dose aplicada no animal.

A seguir, foi administrada uma solução de nitropussiato de sódio (NPS), na cânula intravenosa, de modo a observar a hipotensão do animal, como teste para observar o sucesso da cirurgia e viabilidade do experimento com a posterior administração intravenosa de linalol. Após o período de restabelecimento dos níveis pressóricos e lavagem da cânula com solução salina fisiológica, foi então iniciada a administração da injeção da dose de 50 mg/Kg do LIN ou linalol ou Linalol/ β -CD em animais diferentes e experimentos em momentos distintos.

A administração por via oral também foi realizada e Linalol e complexo Linalol/ β -CD, na dose de 50 mg/Kg previamente estabelecida. O protocolo desenvolvido baseia-se na administração da dose teste e observação dos parâmetros cardiovasculares durante a primeira hora e nos tempos de 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração dessas substâncias, sendo que os efeitos observados em SHR e wistar com relação ao linalol e seu complexo foram comparados.

5.4.3 Investigação subcrônica e crônica do potencial anti-hipertensivo de linalol complexado com β -CD em SHR.

Com relação aos ensaios subcrônicos e crônicos, foram utilizados animais com 8 semanas de vida para treino e período de adaptação de uma semana. Após este período, foram iniciados os tratamentos subcrônico e

crônico, com os animais apresentando 9 semanas de idade. O potencial anti-hipertensivo de linalol complexado a β -CD foi avaliado em animais com hipertensão essencial SHR, submetidos ao tratamento subcrônico de 21 dias com LIN e LIN/ β -CD como foi possível observar nos protocolos experimentais estabelecidos em nosso grupo de pesquisa (SIMÕES et al, 2016).

O Tratamento crônico também foi realizado, por um período de 60 dias, em que objetivamos avaliar os parâmetros cardiovasculares após estabelecimento dos níveis de hipertensão arterial e levando em consideração o caráter crônico da hipertensão e o uso de anti-hipertensivos de maneira contínua por grandes períodos de tempo por via oral (WHELTON et al., 2017). Assim sendo, quando utilizamos o protocolo de tratamento crônico, os animais finalizavam as administrações dos compostos com 18 semanas de vida, período em que a hipertensão já está bem estabelecida e se iniciam as lesões à órgãos alvo como coração, artérias e cérebro.

Os experimentos foram divididos em subcrônico e crônico e os animais em grupos de 6 cada um, submetidos ao tratamento por via oral diariamente e medidas de pressão arterial e frequência cardíaca divididos de 5 em 5 dias após período adaptativo. Os grupos foram aleatoriamente selecionados com ratos saudáveis wistar e hipertensos SHR em uma disposição descrita no organograma abaixo:

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Controle Negativo WISTAR Normotenso Salina	Controle Negativo SHR Veículo	SHR Linalol Subcrônico 21 dias	SHR Linalol Crônico 60 dias	SHR Complexo LIN/ β -CD Subcrônico 21 dias	SHR Complexo LIN/ β -CD Crônico 60 dias
-	-	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg

Durante os 21 ou 60 dias, a pressão arterial dos animais foi monitorada através de medida indireta de pressão arterial e frequência cardíaca, com a

utilização de um pletismógrafo de cauda, a cada cinco dias durante todo o tratamento **Figura 5**.



Figura 6. Aparelho para medida indireta de pressão arterial e frequência cardíaca. Pletismógrafo de Cauda – Insight – São Paulo – Brasil. **Fonte:** Foto realizada pelos autores.

O peso corporal dos animais foi também monitorado por balança (Toledo – modelo 9094 – TI – São Paulo – Brasil) diariamente antes da administração dos compostos, assim como o consumo de água e ração, disponibilizados nas respectivas quantidades de 100ml e 100 mg quando em tratamento subcrônico. No final do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e então coletados sangue, a artéria mesentérica superior e aorta, assim como, o coração desses animais que foram minuciosamente removidos.

Com os vasos sanguíneos, foram realizados experimentos de reatividade vascular. Com o coração foi realizada rápida pesagem e foram colocados em estufa (Olidef CZ) a 60 graus para secagem por 24 horas e composição do índice de massa cardíaca, para observar a possibilidade de remissão da hipertrofia cardíaca quando realizado tratamento por 21 dias; os corações dos grupos de tratamento de 60 dias foram acondicionados e fixados

em solução de paraformaldeído a 4% para posteriores ensaios de histologia e anatomia histopatológica.

5.5. ENSAIOS *IN VITRO*

Os ensaios farmacológicos foram realizados com objetivo de investigar os efeitos dos compostos de linalol puro e complexado à β -CD em tecidos vasculares isolados, bem como as diferenças existentes entre os resultados obtidos com animais espontaneamente hipertensos e em normotensos. Além disso, estes ensaios serão importantes para avaliação dos efeitos biológicos em tecidos cardiovasculares determinantes da pressão arterial e em seguida serão comparados aos dados obtidos com o monoterpeneo complexado à β -CD.

Para a preparação das soluções fisiológicas de Tyrode e KCL60 foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (VETEC), cloreto de potássio (KCl) (VETEC), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (VETEC), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (VETEC), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (VETEC), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (VETEC), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (VETEC) e fosfato de potássio (KH_2PO_4) (VETEC), HEPES (USB corporation), EGTA (Sigma).

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Endócrina e Cardiovascular do ICS/UFBA coordenado pela professora Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos, assim como no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, na Fiocruz Bahia.

5.5.1. *Preparação dos tecidos vasculares e reatividade vascular de ratos SHR e Wistar*

Os ratos eutanasiados em câmara de CO_2 tiveram através de uma incisão no abdômen suas artérias mesentéricas superiores removidas, limpas do tecido conjuntivo e adiposo e seccionadas em anéis de 2 mm. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução fisiológica de Tyrode a 37°C e gaseificada com uma mistura carbogênica de 95% de O_2 e 5% de CO_2 , suspensos por linhas de algodão e fixados a um transdutor de força o qual

estará acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das contrações isométricas.

Cada anel foi submetido a uma tensão constante ideal a ser observada e estabilizada por um período de 60 min. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. Com o objetivo de prevenir a provável interferência de metabólitos na realização dos experimentos de contração e relaxamento vascular associado à receptores muscarínicos e alfa – 1 adrenérgicos, por exemplo. Posteriormente uma contração tônica submáxima a Felinefrina (Phe) 10 μ M, se estabiliza em torno de 15 minutos e a presença de endotélio funcional então foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10 μ M de acetilcolina (ACh).

Foram considerados com endotélio, os anéis de SHR tratados com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contração com fenilefrina. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, serão considerados sem endotélio funcional. As alterações na reatividade vascular são vastamente descritas no estado hipertensivo, assim sendo, para avaliarmos se os tratamentos subcrônico e crônico com linalol complexado proporciona alguma mudança benéfica nos tecidos vasculares, realizamos ensaios para investigar possíveis mudanças de responsividade à agentes vasorelaxantes e contracturantes, caracterizando a reatividade vascular dos animais SHR e Wistar submetidos ao tratamento com Linalol e Linalol/ β -CD.

Os segmentos de artéria mesentérica foram isolados como anteriormente descrito e uma curva concentração resposta para agentes vasoconstritores foi obtida em cada grupo experimental tratado anteriormente e após estabilização de 40 minutos serão adicionadas concentrações cumulativas de vasodilatadores como nitroprussiato de sódio (NPS) para avaliar a reatividade vascular à compostos relaxantes, como é possível visualizar no esquema abaixo **Figura 7**.

Os efeitos alcançados durante os protocolos de contração e relaxamento da artéria mesentérica superior destes ratos foram avaliados em anéis com sem a presença de endotélio funcional, quando tratado por 21 dias e na presença e ausência de endotélio quando do tratamento crônico de 60 dias. Após a obtenção das curvas concentração resposta, foram realizadas

avaliações estatísticas, assim como analisados os valores de pD2 (-log CE50) e Emax (efeito máximo) das curvas individuais para cada grupo experimental.

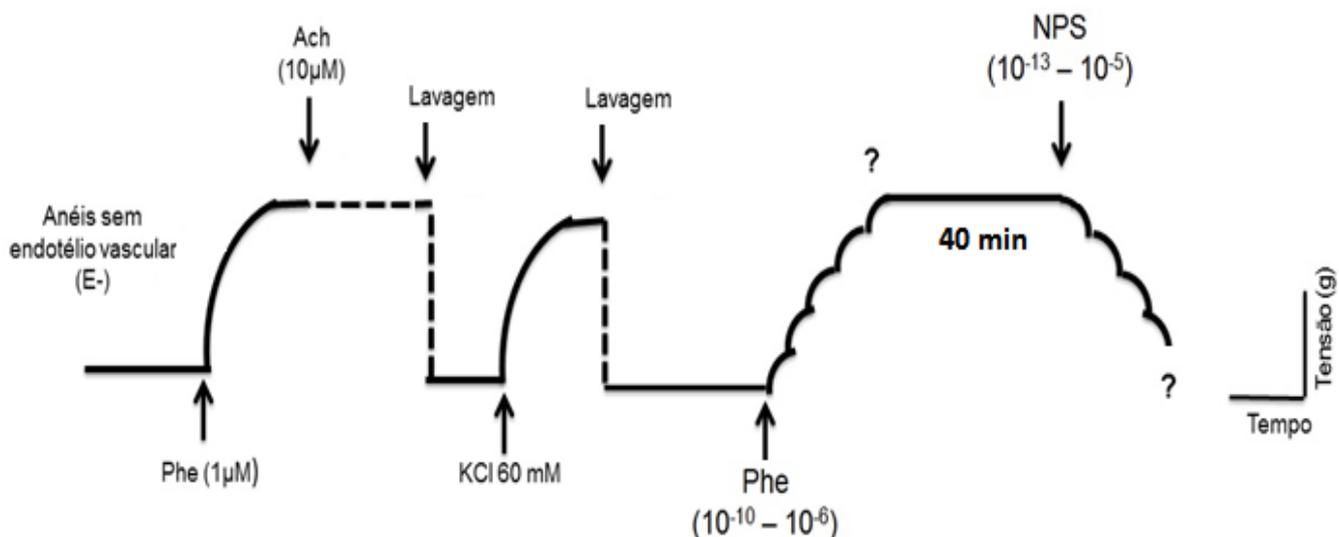


Figura 7. Esquema representando protocolo de reatividade vascular. Os anéis passaram por troca do meio de tyrode por KCL60 para despolarização das células e tornar possível alcançar os melhores resultados de contração e relaxamento em meio ótimo para o protocolo.

Fonte: Elaborado pelos autores

5.5.2. Avaliação dos níveis de citocinas – Testes Bioquímicos ELISA

Para avaliar se o tratamento sub-crônico de animais com hipertensão essencial com o monoterpene escolhido e sua forma complexada à β -CD poderia restabelecer os níveis de citocinas inflamatórias alteradas no estado hipertensivo nestes animais (PEETERS et al., 2001; TANASE et al., 2019) experimentos de dosagem de citocinas foram realizados.

Para a avaliação dos níveis de citocinas, o sangue coletado, cerca de 2 ml por animal, foi acondicionado em gelo durante todo processo de retirada e tão logo quanto possível foi realizada centrifugação a -4°C durante 10 minutos, a 13000 rpm (Hetich - Zentrifugen - Rotanta 460 R). Os sobrenadantes foram recolhidos em tubos, identificados e congelados a -30°C, para posterior realização dos testes bioquímicos de dosagem de citocinas.

A produção de fator de Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-10 (IL-10), foi dosada por análise de imunabsorbância por ligação enzimática ELISA de captura, com emprego dos kits para detecção de citocinas (DuoSet ELISA development system ReD Systemns), de acordo com as instruções do fabricante para avaliação dos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias evidentes no estado hipertensivo

5.5.3 *Avaliação do índice de massa cardíaca e histopatologia do coração*

Após o término dos tratamentos subcrônico e crônico, os animais SHR e Wistar foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram seus corações meticulosamente retirados. Com os animais SHR tratados por 21 dias fizemos o seguinte protocolo: após limpeza e retirada de tecidos adiposo e conjuntivo, os corações foram pesados em balança analítica, e colocados em estufa a 60 graus para secarem por 24 hrs.

Já com relação aos animais tratados por 60 dias, retiramos os corações, removemos o tecido adiposo adjacente e tronco vascular, foi realizada a pesagem em balança analítica, realizado o índice de massa de acordo ao peso do animal no dia do sacrifício e os ventrículos esquerdo e direito foram colocados em solução de formolaldeído a 4% para fixação e posterior realização de ensaios histopatológicos.

O coração e artéria aorta foram removidos e tais amostras fixadas em solução de 4% de formaldeído tamponada em fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 sendo que posteriormente as amostras foram lavadas em água corrente e submetidas à desidratação em um gradiente crescente de concentrações de etanol diluído em água destilada até chegar-se ao etanol absoluto. A seguir, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina.

Os espécimes incluídos em parafina foram cortados de forma a obter secções seriadas de 5 μ m por um micrótomo (RM2125RT, Leica®, Alemanha), montados em lâminas de vidro e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE), assim como com Picrosirius, uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas e permite a

diferenciação principalmente das fibras tipo I e tipo III. O estudo morfológico descritivo das secções coradas por HE compreendeu a avaliação das regiões contendo secções da artéria aorta e o miocárdio ventricular esquerdo e direito.

As lâminas foram avaliadas por patologista, com análise às cegas, com descrição detalhada da presença ou ausência de inflamação com regiões de infiltrado inflamatório ou hemorragia no tecido conjuntivo e de alterações celulares como diminuição do volume celular, presença de fibras musculares onduladas, ausência de estriações transversais, granulação sarcoplasmática, faixas de contração, alterações nucleares e perda de continuidades entre fibras musculares, sinais estes sugestivos de injúria.

As imagens das secções histológicas foram capturadas através de um sistema formado por uma câmera digital (DP71, Olympus, Japão), acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Japão), processado por um notebook (Dell, Intel core™ i5) com auxílio do software Analysis Get It.

6 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) ou média (intervalo de confiança). As curvas concentração-resposta, os valores de Emax (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) e o CE50 (concentração de uma droga responsável por 50% do Emax) foram obtidos por regressão não linear.

As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t de Student ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Os programas utilizados para análise dos dados foram Graph PadPrism 5.0® (La Jolla, CA, EUA).

7 RESULTADOS

7.1 ENSAIOS FARMACOCINÉTICOS

7.1.1 Farmacocinética da administração intravenosa e oral de LIN e LIN β -CD em animais Wistar

Como é possível observar nas figuras a seguir, foram feitas curvas de concentração do LIN no plasma de ratos wistar ao longo do tempo, após a administração de uma dose de 50 mg/kg deste, na forma livre, por via intravenosa (i.v.) *in bolus* **Figura 8**. Os tempos de observação após a aplicação dos compostos foram de 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos, assim como, 2, 4 e 8 horas após o início das experimentações.

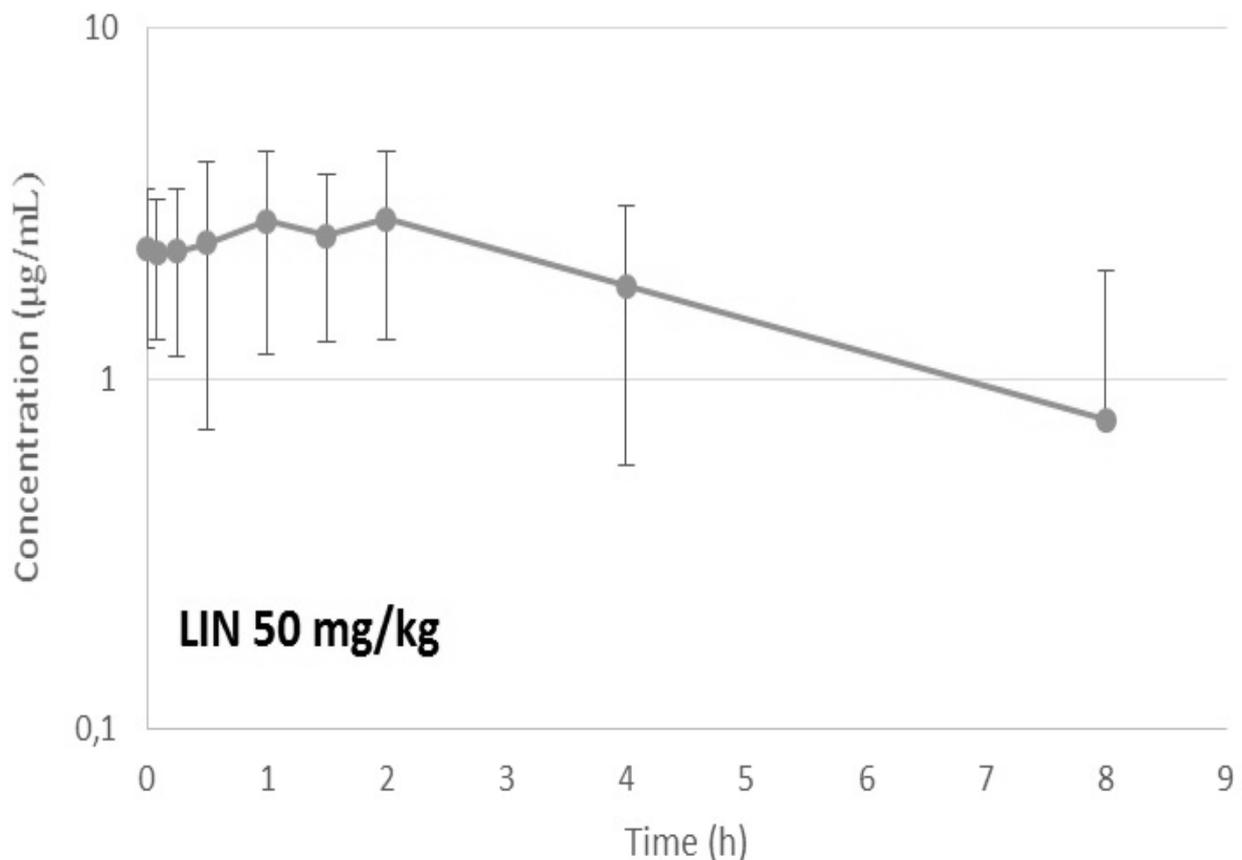


Figura 8. Gráfico de concentração plasmática média vs tempo do LIN administrado na forma livre em ratos wistar por via i.v. *bolus* na dose de 50 mg/kg (n = 6).

Após a observação da distribuição farmacocinética do monoterpeneo LIN puro administrado de forma intravenosa (i.v.), foi realizada também a administração por via oral (v.o.) de uma dose de 100 mg/kg do LIN puro e do composto incluso em β -ciclodextrina (LIN/ β -CD), como é possível observar na **Figura 9** (n = 6/grupo). Na administração por via oral, foram observados os tempos após a aplicação dos compostos em 5, 15, 60 e 90 minutos, assim como, 2, 4, 6 e 8 horas para estimativa dos parâmetros farmacocinéticos.

Os parâmetros farmacocinéticos médios estimados estão dispostos na **Tabela 1** de modo que foi possível observar que uma vez o linalol incorporado em β -ciclodextrina, há uma relação de LIN/ β -CD ($19,53 \pm 7,42$) de aumento em biodisponibilidade da molécula hóspede na corrente sanguínea, sendo considerado como índice de Frel que representa biodisponibilidade relativa, dado que sequer foi captado no HPLC quando testamos o linalol puro.

Outro resultado importante presente na Tabela 1 é a área sobre a curva de concentração sanguínea em relação ao tempo (ASC 0-t) cuja unidade de medida é (ug*h/ml). Este dado nos mostra que o resultado com LIN/ β -CD ($90,34 \pm 34,36$ ug*h/ml) apresentou um número muito superior ao LIN ($0,04 \pm 0,02$ ug*h/ml), ambos administrados por via oral, nos sugere que uma vez em sistema de liberação de fármaco, o LIN/ β -CD circulante na corrente sanguínea se faz presente em volume e concentração por muito mais tempo do que enquanto administrado na forma livre, podendo atuar das mais diferentes formas nos compartimentos farmacocinéticos.

Outro importante parâmetro a ser observado e comparado entre os testes é o clearance, dado em litros, por hora, por quilograma sendo possível compararmos que a capacidade do organismo em eliminar o linalol puro LIN (CL= $23,06 \pm 2,27$ L/h/kg) é muito maior quando comparada ao linalol incorporado em seu complexo LIN/ β -CD (CL= $1,27 \pm 0,55$ L/h/kg) o que tornaria o monoterpeneo passível de permanecer agindo no organismo por mais tempo, dados estes que corroboram com os resultados anteriores **Tabela 1**.

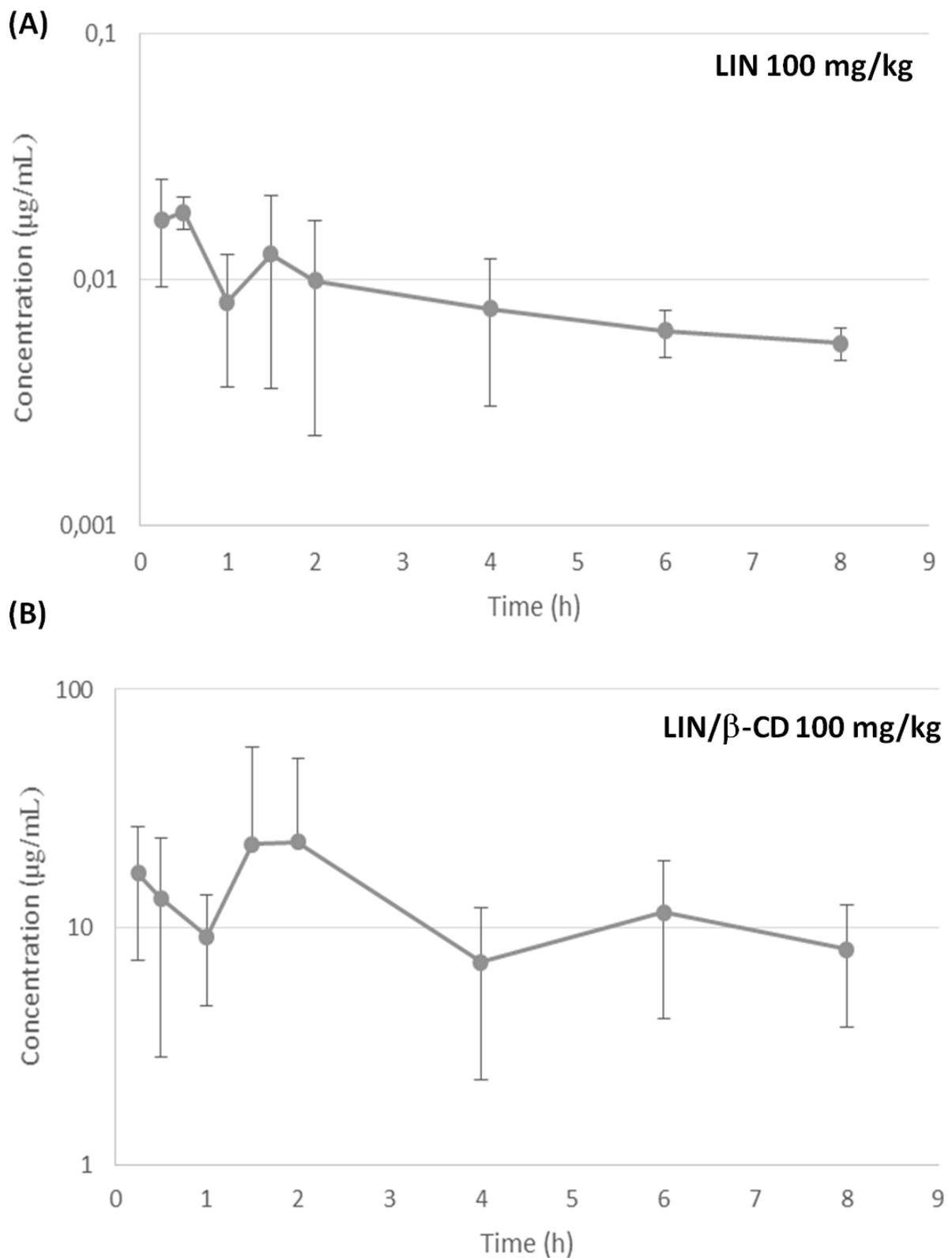


Figura 9. Gráfico de concentração plasmática média vs tempo. Em (A) grupo tratado por via oral com LIN. Em (B) grupo tratado por via oral com LIN/β-CD. Ambos os grupos de ratos wistar tratados com doses de 100 mg/kg de cada composto (n=6).

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos médios estimados após a administração de linalol na forma livre e incluso em β -ciclodextrina via intravenosa e oral nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente (n= 6/grupo).

Parâmetros	LIN Livre via <i>i.v.</i> 50 mg/kg	LIN Livre oral 100 mg/kg	LIN/ β -CD oral 100 mg/kg
ke (h⁻¹)	0,13 ± 0,06	0,09 ± 0,06	0,20 ± 0,19
t1/2 (h)	6,60 ± 4,04	8,64 ± 4,44	12,08 ± 14,27
ASC 0-t (ug*h/ml)	25,28 ± 28,65	0,04 ± 0,02	90,34 ± 34,36*
MRT (h)	8,75 ± 4,78	1,97 ± 0,65	2,20 ± 0,64
MAT (h)	-	4,69 ± 1,50	6,28 ± 0,64
ka (h⁻¹)	-	0,23 ± 0,07	0,16 ± 0,01
CL (L/h/kg)	3,03 ± 2,17	23,06 ± 2,27	1,27 ± 0,55*
Vd (L/kg)	25,19 ± 10,40	16,29 ± 10,73	17,57 ± 18,84
Fabs	-	0,003 ± 0,001	1,26 ± 0,48
Frel	-	-	19,53 ± 7,42*

Os valores são representados em média ± desvio padrão.

*Valores estatisticamente diferentes ($\alpha < 0,05$)

7.1.2 Modelagem Farmacocinética Populacional da administração intravenosa e oral de LIN e LIN/ β -CD de animais Wistar e SHR

7.1.2.1 LIN via intravenosa em Wistar

Foram testados diversos modelos e análises estatísticas e escolhidos os modelos de 1 e 2 compartimentos com erros constantes, proporcional e combinado presentes nas **Tabelas 2 e 3**. O modelo estrutural de 2 compartimentos com erro combinado 1 foi escolhido como modelo base na análise dos resultados preliminares obtidos e gráficos gerados. Este foi o que apresentou menores valores de critérios de informação de Akaike (AIC) e 2xlog-likelihood (-2LL), que são ferramentas estatísticas probabilísticas presentes no programa utilizado para análise, citado anteriormente em Métodos.

Tabela 2: Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 1 compartimento.

	Erro Constante	Erro Proporcional	Erro Combinado1
Verossimilhança (-2xlog-likelihood, -2LL)	33,44	48,62	33,27
Critérios de informação de Akaike (AIC)	43,44	58,62	45,27

Tabela 3: Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 2 compartimentos.

	Erro Constante	Erro Proporcional	Erro Combinado1
Verossimilhança (-2xlog-likelihood, -2LL)	28,51	28,87	26,39
Critérios de informação de Akaike (AIC)	46,51	46,87	46,39

Devido à vasta complexidade do corpo, a cinética de um fármaco é frequentemente simplificada por representações de compartimentos. O fármaco se distribui de forma rápida e uniforme no compartimento central, e mais lentamente no segundo compartimento. São utilizadas constantes para representar os processos de entrada e saída desse fármaco dos compartimentos (SCHARGEL; YU, 1993), como por exemplo, k_{1-2} e k_{2-1} , que comunicam reversivelmente um com o outro, dado presente na **Figura 10**

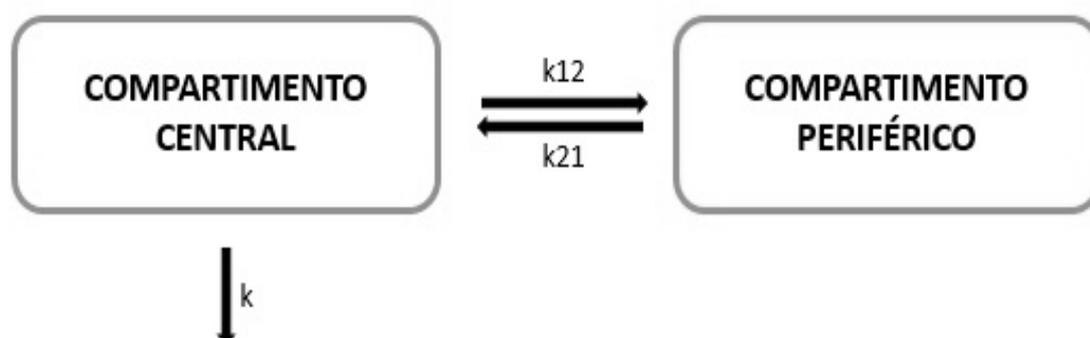


Figura 10. Modelo farmacocinético de análises por 2 compartimentos.

Fonte: Elaboração dos Autores

Com os resultados do teste de modelos, foi escolhido o modelo de 2 compartimentos, já que o linalol se distribui por dois grupos de tecidos com diferente fluxo sanguíneo e afinidade pelo fármaco. Nos dados anteriores **Tabela 2 e 3** os parâmetros numéricos demonstrados, dificilmente se aproximam de valores baixos e nunca chegam a valores próximos a zero, isso significa dizer que os resíduos de LIN puro na corrente sanguínea dos animais na passagem do compartimento 1 para o 2 e vice-versa estão bastante reduzidos, significando absorção por parte dos órgãos e tecidos.

Com esse modelo estrutural obteve-se os valores estimados da população de animais Wistar testados para cada parâmetro **Tabela 4**, e valores estimados individuais de cada rato **Tabela 5**. Os parâmetros obtidos foram volume de distribuição (V), que avalia a distribuição do fármaco em órgãos e tecidos; constante de eliminação (k) que inclui excreção renal do fármaco inalterado e/ou a formação de metabólitos e as constantes de distribuição (k1-2 e k2-1) dos compartimentos que representam as velocidades de transferência de taxa de primeira ordem para o movimento da droga do compartimento 1 para 2 (k1-2) e do compartimento 2 para 1 (k2-1) respectivamente.

Tabela 4: Parâmetros estimados da população.

Efeitos fixos	Estimativa	Variabilidade Individual	Variabilidade Populacional (%)
V pop	22.4	4.24	19
K pop	0.00362	0.0106	292
K 1-2 pop	0.461	0.409	88.8
K 2-1 pop	5.05	3.67	72.7

V: volume de distribuição; k: constante de eliminação; k12/k21: constantes de distribuição.

Tabela 5: Estimativas individuais dos parâmetros.

Ratos Wistar	V	K	K 1-2	K 2-1
1	24.76	0.00367	0.377	9.49
2	22.02	0.00371	0.502	1.15
3	11.06	0.0036	0.393	8.54
4	15.38	0.00361	0.419	6.13
5	35.74	0.00357	0.776	3.17
6	38.04	0.00361	0.540	3.81

V: volume de distribuição; K: constante de eliminação; K 1-2/K 2-1: constantes de distribuição.

Analisando a estimativa dos parâmetros populacionais encontrados temos um volume estimado de ($V= 22.4 \text{ L}$) **tabela 4**, sendo considerado bem distribuídos pelos órgãos e tecidos, estando presente em maior quantidade no compartimento periférico (2) e uma constante de deslocamento equivalente à baixa eliminação do LIN livre ($K= 0.00362 \text{ h}^{-1}$).

Com as constantes de distribuição ($k_{1-2}=0.461 \text{ h}^{-1}$) e ($k_{2-1}= 5.05 \text{ h}^{-1}$) é possível concluir que o LIN puro por via intravenosa se distribui mais lentamente para o compartimento periférico ou segundo compartimento que é composto por órgãos e tecidos mais periféricos e menos irrigados. Já com relação à velocidade de retorno do fármaco pela corrente sanguínea para o compartimento central (K_{2-1}) de forma que o mesmo seja eliminado, este parâmetro demonstra que ele permanece na corrente sanguínea e compartimento central por mais tempo.

Na **Figura 11** podemos observar os gráficos individuais de concentração versus tempo, em que cada quadrado deles é numerado como representante de um n experimental ($n=6$). A área em azul claro é a dispersão ou distribuição de resíduos ou intervalo de confiança do modelo; a linha verde indica as concentrações populacionais previstas, ou seja, aquilo que foi calculado e predito como modelo; a linha lilás representa as concentrações individuais previstas e os pontos azuis representam os pontos de coleta das concentrações obtidas com a realização dos experimentos. Os valores foram calculados com intervalo de confiança de 95%.

A correlação das concentrações plasmáticas de LIN puro por via intravenosa é observada, assim como as concentrações plasmáticas populacionais e individuais preditas com o modelo final estão presentes na **Figura 12**. Estes dados nos demonstram que o modelo predito anteriormente como base, está muito próximo do que foi indicado para acontecer individualmente, ou seja, cada rato tratado obedecendo um padrão ou perfil farmacocinético esperado, uma vez que os pontos azuis indicados no gráfico, seguem paralelamente à linha traçada no meio do gráfico. Já com relação ao padrão de comportamento populacional, a concentração plasmática de LIN puro quando observamos o grupo inteiro, apresenta maior dispersão com os pontos se afastando da curva predita **Figura 12**.

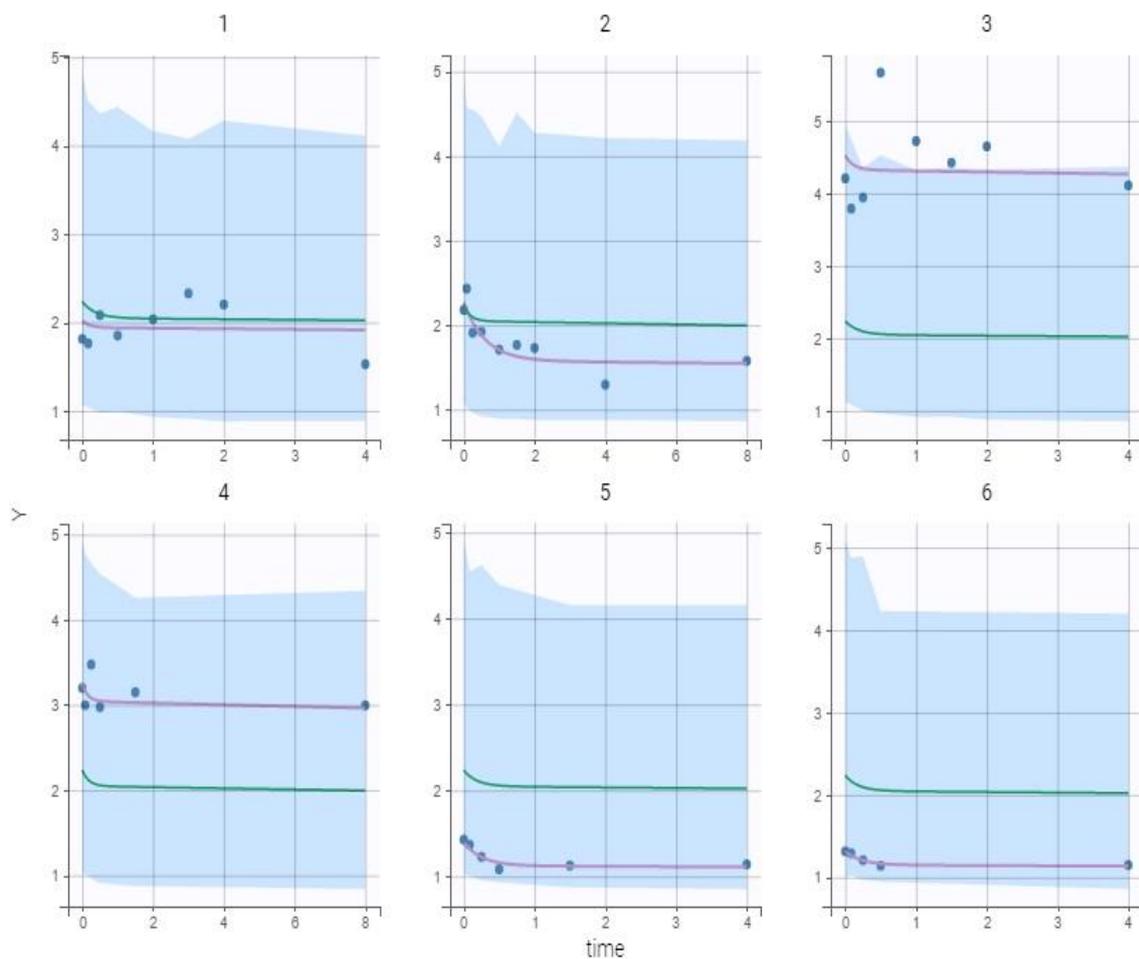


Figura 11. Gráfico de verificação dos valores preditos (VPC, visual predictive check). Em Y eixo de distribuição do fármaco versus o tempo. Os pontos azuis representam os dados observados. As linhas roxas os ajustes individuais. As linhas verdes os ajustes populacionais. As áreas indicam o intervalo predito de 95% dos dados simulados. Os números representam os animais testados (n=6).

Já a distribuição dos resíduos de forma individual após administração intravenosa de LIN em relação ao tempo e concentração plasmática predita são observados na **Figura 13**. Estes dados nos mostram que a distribuição farmacocinética dos resíduos após passagem entre os compartimentos está bem heterogênea ou bem dispersa, tanto para a variável concentração como para a variável tempo. Isto é esperado para um bom modelo farmacocinético, uma vez que o fármaco deve se distribuir pela corrente sanguínea das formas mais variadas para alcançar os mais diversos tecidos.

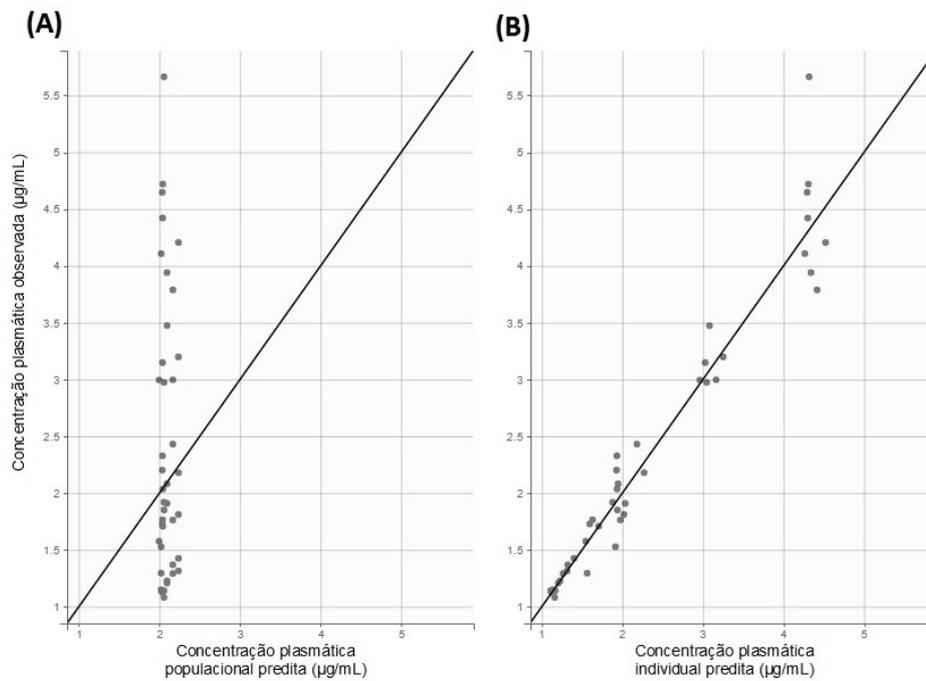


Figura 12. No eixo X em (A) há correlação entre concentração plasmática populacional predita (n=6) e em (B) concentração plasmática individual predita de cada animal testado, respectivamente, da esquerda para direita. No eixo Y é possível observar a concentração plasmática de LIN puro após administração intravenosa.

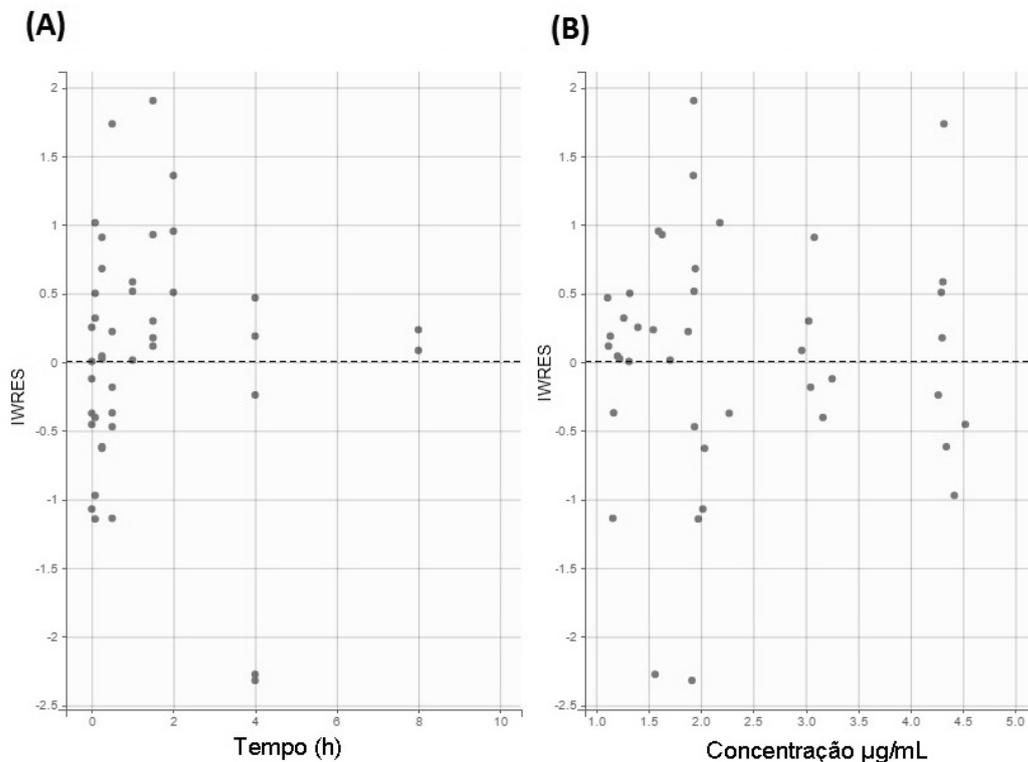


Figura 13: Distribuição dos resíduos individuais ponderados IWRES. No eixo X em (A) Distribuição homogênea dos resíduos em relação ao tempo e no eixo X em (B) Distribuição homogênea dos resíduos em relação à concentração plasmática.

7.1.2.2 LIN e LIN\β-CD via oral em Wistar e SHR

Também foram testados os modelos de 1 e 2 compartimentos com erro constante, proporcional e combinado que podem ser conferidos nas **Tabela 6** e **Tabela 7** para os dados obtidos após administração do linalol por via oral. O modelo estrutural de 2 compartimentos com erro combinado 1 foi escolhido com base na análise de resultados e gráficos.

Tabela 6: Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 1 compartimento.

	Constante	Proporcional	Combinado1
Verossimilhança (-2xlog-likelihood, -2LL)	526,04	617,64	527,46
Critérios de informação de Akaike (AIC)	540,04	631,64	543,46

Tabela 7: Verossimilhança e Critérios de informação de Akaike para o modelo de 2 compartimentos.

	Constante	Proporcional	Combinado1
Verossimilhança (-2xlog-likelihood, -2LL)	509,80	608,08	508,30
Critérios de informação de Akaike (AIC)	531,80	630,08	532,30

A partir dos resultados dos testes de correlação **Tabela 8** e da análise dos gráficos de efeitos aleatórios dos parâmetros (η) *versus* covariáveis do modelo base **Figura 14**, as covariáveis foram selecionadas para serem adicionadas ao modelo. Sendo significativo o V e k1-2 para as covariáveis linalol complexado (CPXD) e linalol complexado em SHR (CPXD SHR), como é visto pelo valor de $P \leq 0,05$.

Tabela 8: Correlação de Pearson e/ou ANOVA entre os efeitos aleatórios (η) e as covariáveis de animais wistar e SHR após administração de LIN/ β -CD

	η ka		η V		η k		η k 1-2		η k 2-1	
	r	Valor de P	r	Valor de P	r	Valor de P	r	Valor de P	r	Valor de P
CPXD	0.96	0.34	5.88	0.02	0.02	0.88	96.66	<0.0001	1.97	0.17
CPXD SHR	0.001	0.96	3.46	0.08	0.009	0.95	20.24	0.0004	2.14	0.16

η : efeitos aleatórios; r: coeficiente de correlação de Pearson; ka: constante de absorção; V: volume de distribuição (L); k12/k21: constante de distribuição.

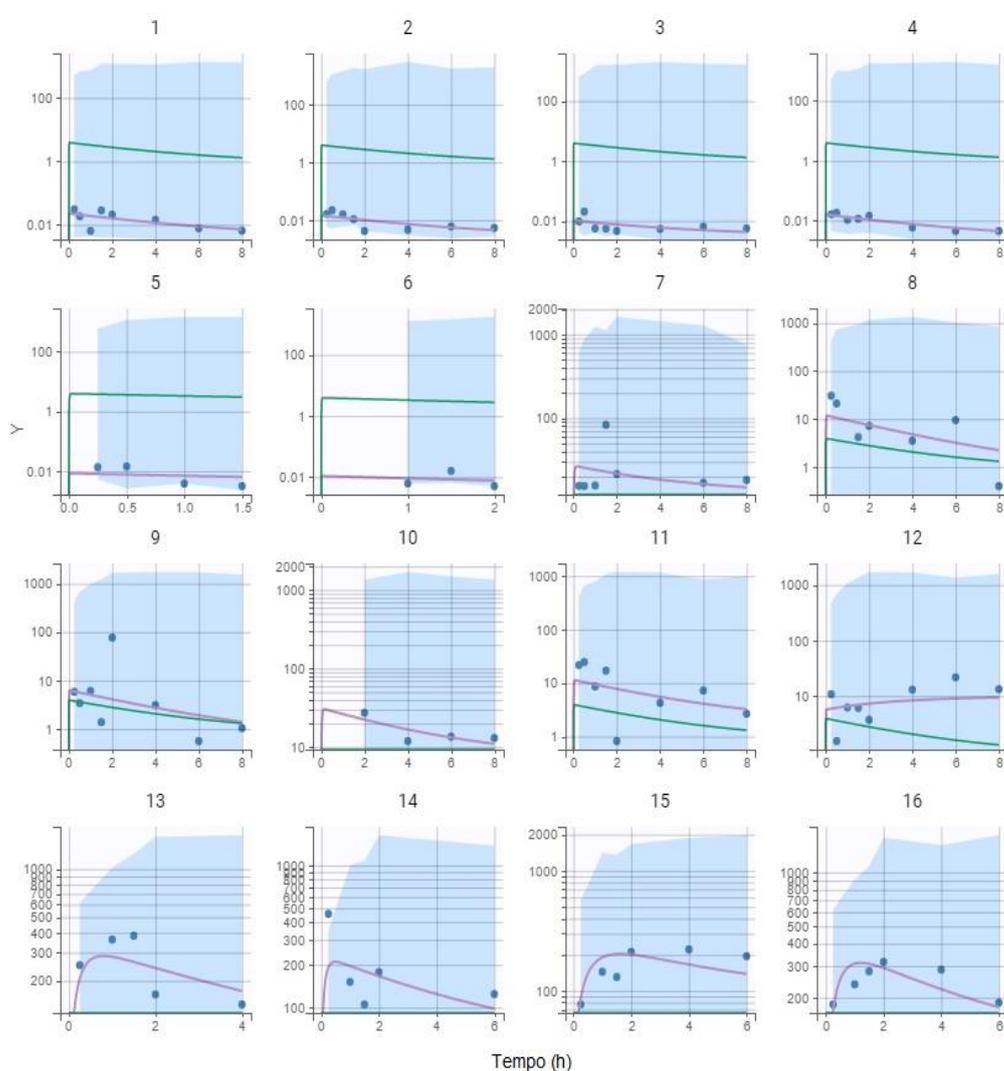


Figura 14. Gráfico de verificação dos valores preditivos de linalol complexado. Os pontos azuis representam os dados observados. As linhas roxas os ajustes individuais. As linhas verdes os ajustes populacionais. Concentração vs Tempo, com intervalo e área de 95%, dos valores preditos e simulados.

Após adicionar as covariáveis que tiveram valor de P significativo ($p \leq 0,05$), V e k1-2 no modelo base, obteve-se os valores de -2LL e AIC visíveis na **Tabela 9** com redução significativa.

Tabela 9: Verossimilhança e critérios de informação de Akaike após adição das covariáveis.

Covariável	-2LL	Diferença de -2LL	AIC	Diferença de AIC
Modelo base	617,08		631,08	
Complexo		-192,04		-174,04
Complexo SHR	425,04		457,04	

Com esse modelo estrutural obteve-se os valores estimados da população de cada parâmetro **Tabela 10**. Analisando a estimativa dos parâmetros populacionais encontrados com as covariáveis CPXD e CPXD SHR temos um ka de 0.226 h^{-1} e V de 0.0528 L/kg . Linalol complexado se manteve na corrente sanguínea, com pouca distribuição para órgãos e tecidos com uma maior k (0.0163 h^{-1}), sendo mais rapidamente eliminado do compartimento central. Com as constantes de distribuição k1-2 ($3.37e^{+4}$) e k2-1 (0.0711) é possível concluir que apesar de sua baixa distribuição, complexo vai para os tecidos e órgãos com uma maior velocidade de saída do compartimento central para o compartimento periférico.

Tabela 10: Parâmetros estimados da população.

Efeitos fixos	Estimativa	Variabilidade Individual	Variabilidade Populacional (%)
KA	0.226	0.0563	24.9
Vpop	0.0528	-	-
k pop	0.0163	-	-
K 1-2 pop	$3.37e^{+4}$	$6.67e^{+3}$	19.8
K 2-1 pop	0.0711	0.0474	66.7

Ka: constante de absorção; V: volume de distribuição; k: constante de eliminação; k1-2/k2-1: constantes de distribuição.

Assim como a distribuição dos resíduos após administração em relação ao tempo e concentração plasmática predita, podem ser observados nas imagens da **Figura 15**.

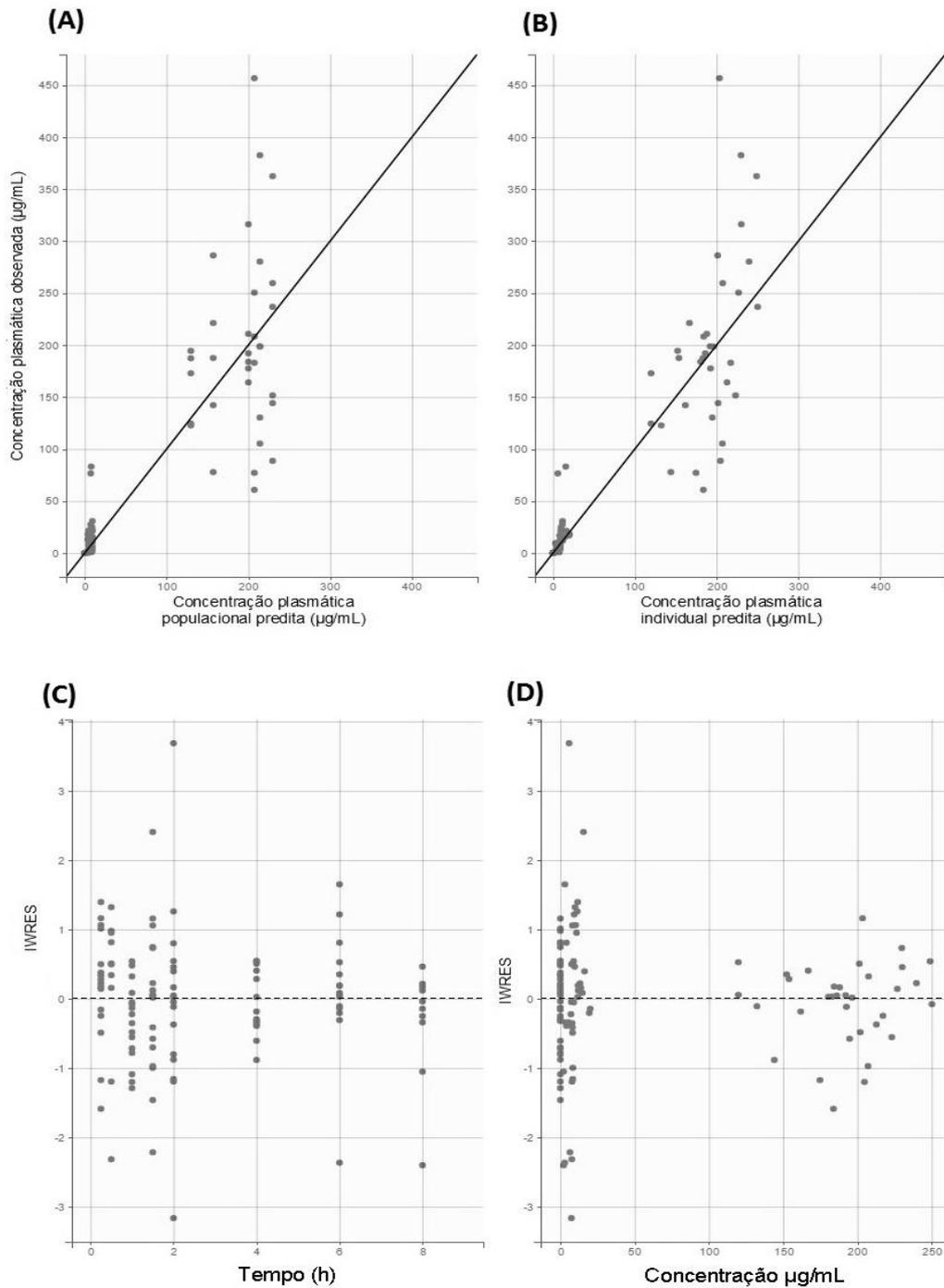


Figura 15. Distribuição de resíduos de LIN/β-CD após administração oral. No eixo X em (A) há correlação entre concentração plasmática populacional (n=6) e em (B) concentração plasmática individual predita de cada animal. No eixo Y concentração plasmática. No eixo X em (C) Distribuição homogênea dos resíduos em relação ao tempo e em (D) em relação à concentração plasmática. IWRES: resíduos individuais ponderados.

7.2 ENSAIOS FARMACODINÂMICOS

7.2.1 Efeitos agudos da administração intravenosa de LIN e LIN/ β -CD sobre parâmetros cardiovasculares de animais SHR.

Para avaliar os efeitos da aplicação intravenosa de linalol e complexo de inclusão na hemodinâmica de ratos SHR, foram realizados procedimentos com objetivo de quantificar a pressão sanguínea e frequência cardíaca. Foram administradas doses de LIN e LIN/ β -CD (50 mg/kg) em diferentes animais após período de estabilização e teste de viabilidade com solução de NPS, como citado anteriormente na parte de Materiais e Métodos.

Após administração i.v. dos compostos foram observadas alterações cardiovasculares com potencial hipotensor estatisticamente significante de linalol complexado LIN/ β -CD (%PAM: $-40,00 \pm 5,45$; %FC: $18,92 \pm 0,67$, n=5), sendo que não há alterações na frequência cardíaca, quando comparado ao controle com administração do veículo. A taquicardia presente no registro original acontece após início do efeito hipotensor e muito provavelmente como mecanismo reflexo compensatório **Figura 16**. Quando observamos o grupo de ratos tratados com linalol livre, ocorreu hipotensão e bradicardia associada LIN (%PAM: $-56,64 \pm 5,05$; %FC: $-54,54 \pm 4,84$, n=5). Resultados representados na **Figura 17**.

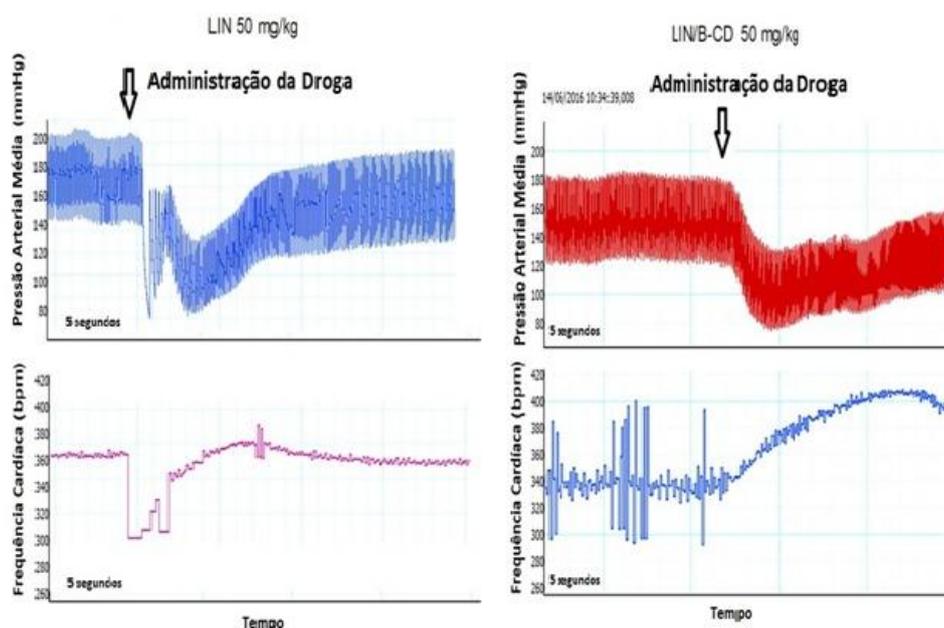


Figura 16. Efeito hipotensor induzido por LIN e LIN/ β -CD na dose de 50mg/kg após administração intravenosa. Registros originais.

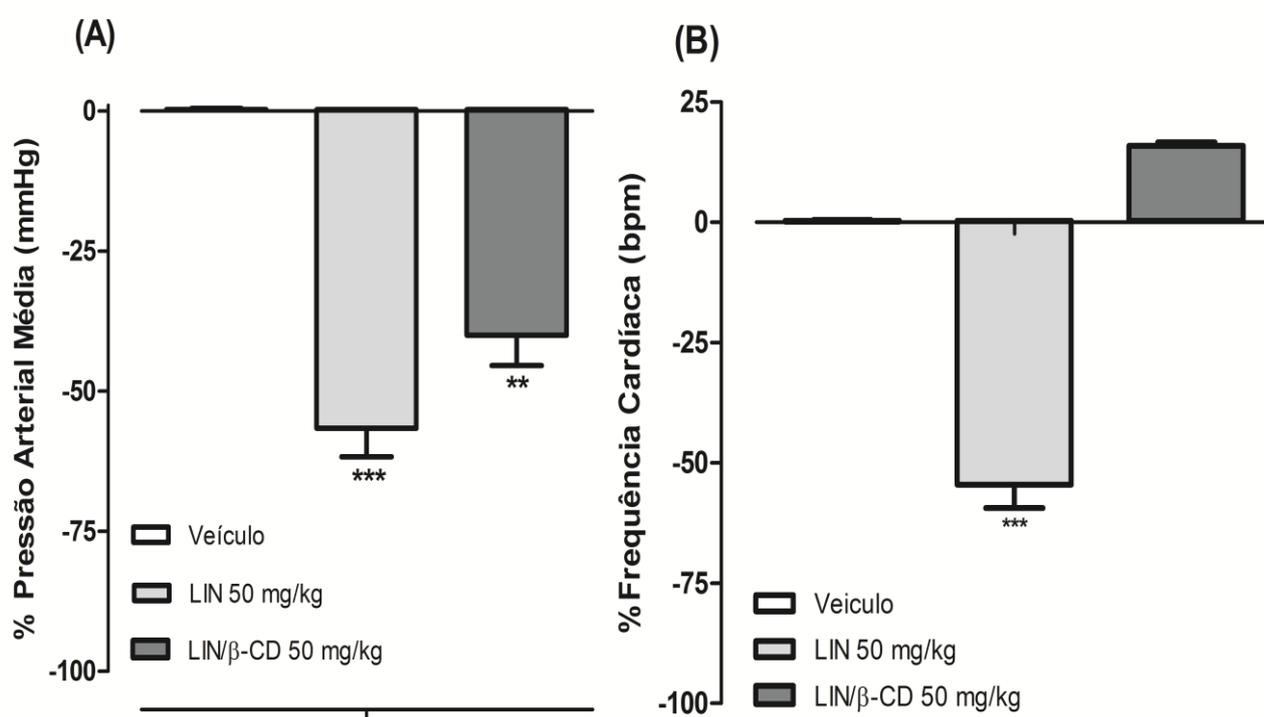


Figura 17. Efeito hipotensor de LIN e LIN/β-CD. Gráficos em barras (A) %PAM (mmHg) e (B) %FC (bpm) após administração intravenosa. Veículo (n = 5), LIN/βCD (n = 5) ou LIN (n = 5). Valores expressos em média ± S.E.M. ** p <0,01, *** p <0,001 vs. veículo.

7.2.2 Efeitos da administração oral de LIN e LIN/β-CD sobre parâmetros cardiovasculares de animais SHR e Wistar.

Após administração oral de LIN e LIN/β-CD em animais Wistar normotensos e hipertensos SHR foi observado que LIN/β-CD apresenta potencial hipotensor **Tabela 11** com diferença estatisticamente significativa após 15 minutos de administração assim como nos períodos de 4, 5 e 6 horas, quando comparados ao veículo, assim como 5 e 5 horas e 30 minutos após administração quando comparado aos valores de início do protocolo, dados representados no gráfico com o símbolo (#) **Figura 18**.

Foi possível observar ainda, um efeito bradicárdico associado ao LIN/β-CD nos períodos de 4 e 6 horas após sua administração, quando comparados ao grupo veículo dados presentes na **Tabela 11**, assim como na **Figura 18**.

Tabela 11. Efeitos da administração oral de LIN e LIN β -CD sobre parâmetros cardiovasculares de animais SHR e wistar.

Pressão Arterial Média (PAM)	Tempo zero Administração	15 min	4 horas	5 horas	6 horas
Wistar	102,28 \pm 5,69	101,40 \pm 3,57	100,23 \pm 8,16	108,64 \pm 5,59	101,15 \pm 6,20
SHR veículo	204,86 \pm 6,18	212,62 \pm 4,77	204,71 \pm 10,02	200,95 \pm 9,18	215,22 \pm 3,09
LIN	193,27 \pm 6,32	199,50 \pm 5,02	190,87 \pm 10,02	192,52 \pm 7,21	199,34 \pm 7,18
LIN β -CD	202,11 \pm 8,65	184,61 \pm 7,46*	170,63 \pm 14,46*	155,66 \pm 9,18*	175,18 \pm 7,36*

Frequência Cardíaca (FC)	Tempo zero Administração	15 min	4 horas	5 horas	6 horas
Wistar	319,39 \pm 11,58	-	369,32 \pm 21,00	-	344,51 \pm 18,81
SHR veículo	309,26 \pm 13,15	-	358,47 \pm 15,88	-	339,71 \pm 15,43
LIN	342,13 \pm 30,71	-	362,36 \pm 30,59	-	368,61 \pm 31,65
LIN β -CD	401,45 \pm 27,48	-	294,78 \pm 10,88*	-	299,20 \pm 12,87*

Os valores são representados em média \pm erro padrão da média.

*Valores estatisticamente significantes, $p < 0,05$.

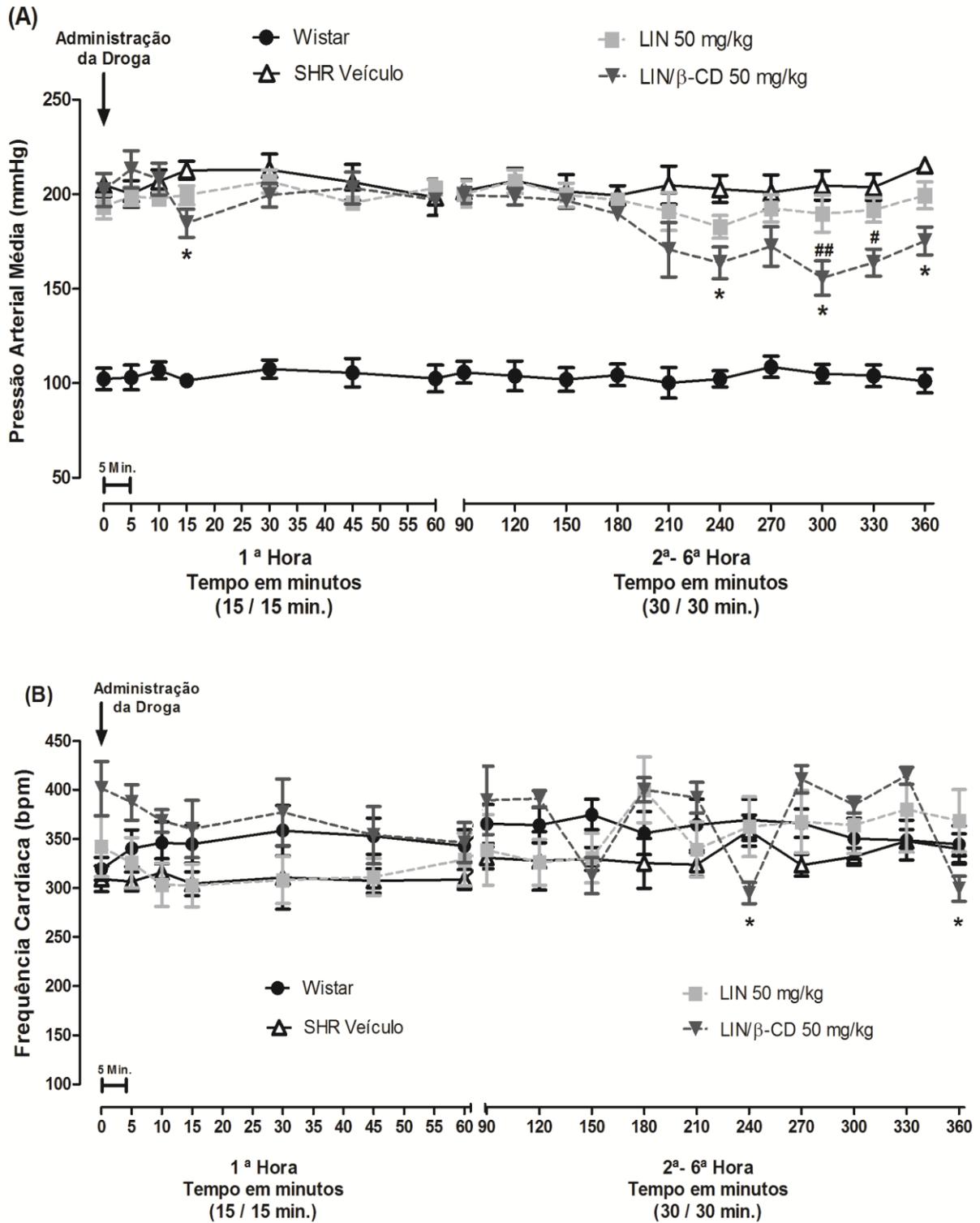


Figura 18. Efeito hipotensor após administração oral de LIN/β-CD. Em (A) gráfico em linha PAM (mmHg) e em (B) gráfico em linha FC (bpm) após administração orogástrica, com LIN ou LIN/β-CD (n = 6). Valores expressos em média ± S.E.M. * p <0,05 vs SHR Veículo e #p <0,05 ##p <0,01 vs início do tratamento.

7.2.3. Efeitos do tratamento subcrônico com LIN e LIN β -CD no índice de massa corporal, ingestão de água e ração de SHR

Para avaliar o efeito de LIN e complexo sobre o peso corporal durante o tratamento de 21 dias, os grupos experimentais de ratos SHR foram pesados diariamente para a realização da administração das drogas e o índice de massa corporal em porcentagem (%) foi obtido. Os valores brutos de ingestão de água e ração também foram mensurados.

Foram disponibilizados 100 ml de água filtrada e 100 mg de ração para roedores todos os dias. Como resultados, com relação ao peso corporal, houve aumento de maneira fisiologicamente compatível com o crescimento temporal ao longo do tratamento, sendo equivalente e progressivo sem diferenças estatisticamente significantes. Foi possível observar ainda que não houve variação no consumo de água e ração diários, não havendo aumento ou diminuição dos mesmos, como é possível ver na **Figura 19**.

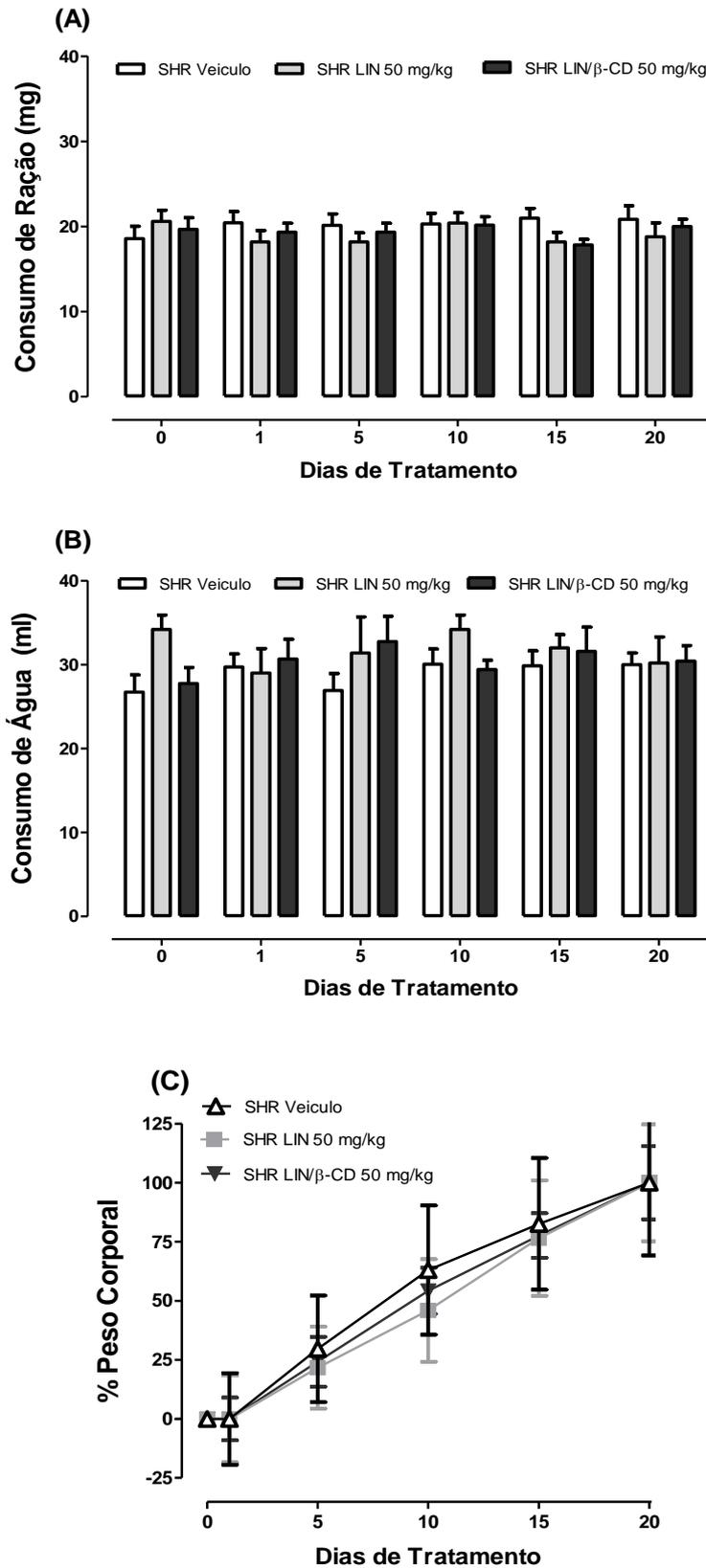


Figura 19. Efeito do tratamento subcrônico com LIN/β-CD sobre o consumo de ração, água e ganho de peso corporal. Em valores brutos, em (A) consumo de ração (mg) em (B) consumo de água (mL) e em (C) valores em % do ganho de peso corporal. Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) ou LIN/β-CD (n = 7). Valores expressos em média ± S.E.M

7.2.4 Efeitos do tratamento subcrônico com LIN e LIN β -CD na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de SHR

Na intenção de avaliar se os efeitos anti-hipertensivos do (-)-linalol poderiam ser melhorados usando um sistema de liberação controlada de fármaco, iniciamos um período de treinamento dos animais, com adaptação à gavagem, ao ambiente e à medida da pressão arterial com pletismógrafo de cauda nos períodos de 6, 3 e 1 dia antes do início do tratamento.

Após este período de adaptação, iniciamos o tratamento e foi possível observar que o grupo veículo tratado com solução salina e cremophor atingiu níveis bastante elevados de pressão arterial média ao final do tratamento de 21 dias (PAM = $188,90 \pm 2,38$, mmHg, n = 7). Já o tratamento com LIN (50 mg/kg) induziu uma diminuição significativa da pressão arterial no 20º dia de tratamento (PAM = $160,90 \pm 7,54$ mmHg, n = 8) quando comparado ao grupo veículo, enquanto que o grupo tratado com complexo LIN β -CD (50 mg/kg) apresentou uma fase estacionária ao desenvolvimento da hipertensão arterial, uma vez que foi capaz de manter e reduzir de maneira importante e estatisticamente significativa a pressão arterial destes animais, quando comparados ao grupo veículo desde o 15º dia, LIN β -CD (PAM = $151,00 \pm 5,82$ mmHg, n=7, *p<0,05), perdurando até o final do tratamento (PAM = $145,66 \pm 4,13$ mmHg, n=7, ***p<0,001) dados representados na **Figura 20**.

Foi possível avaliar também que o grupo tratado com o complexo apresentou bradicardia associada ao tratamento, especialmente no 15º dia, em que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando comparados ao veículo LIN β -CD (FC = $218,71 \pm 38,99$ bpm, n=7, *p <0,05) dados estes que são também representados na **Figura 20**.

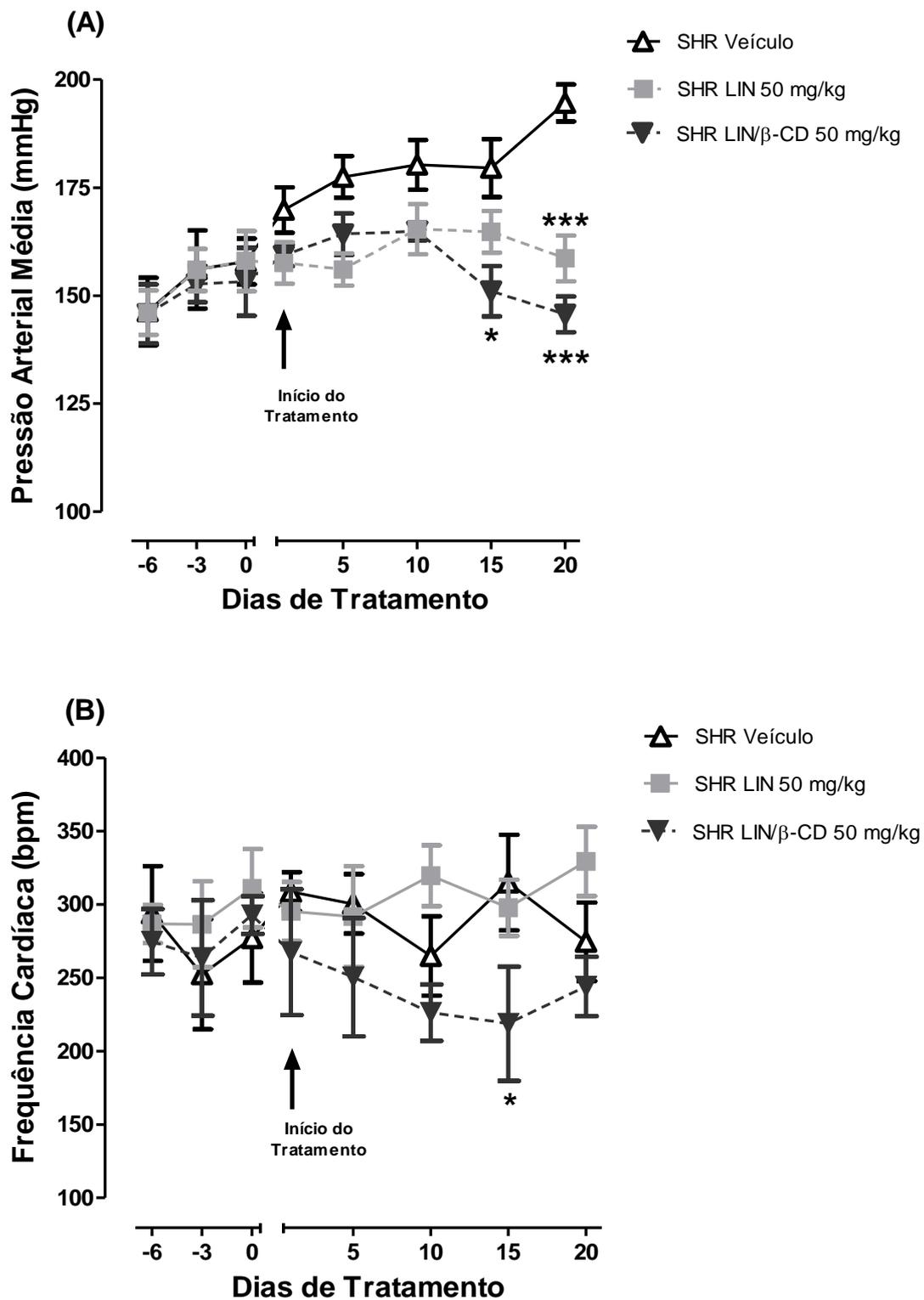


Figura 20. Efeito anti-hipertensivo de LIN β -CD. Em (A) PAM (mmHg) e (B) FC (bpm) de SHR tratados por 21 dias com administração orogástrica. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN β -CD (n = 7). Valores expressos em média \pm S.E.M. * p < 0,05, *** p < 0,001 vs. veículo.

7.2.5. Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN β -CD sobre o índice de massa cardíaca de animais SHR.

O tratamento subcrônico com LIN β -CD a 50 mg/kg resultou em uma diminuição significativa no índice de massa cardíaca ($412,59 \pm 11,87$ mg/100 g de peso corporal), após 24 horas de secagem em estufa a 60 graus, diferentemente do grupo tratado com o LIN em sua forma livre e pura ($449,59 \pm 20,40$ mg/100 g de peso corporal), que estatisticamente se assemelhou ao grupo tratado com veículo ($476,50 \pm 11,82$ mg/100 g de peso corporal), dados presentes na **Figura 21**.

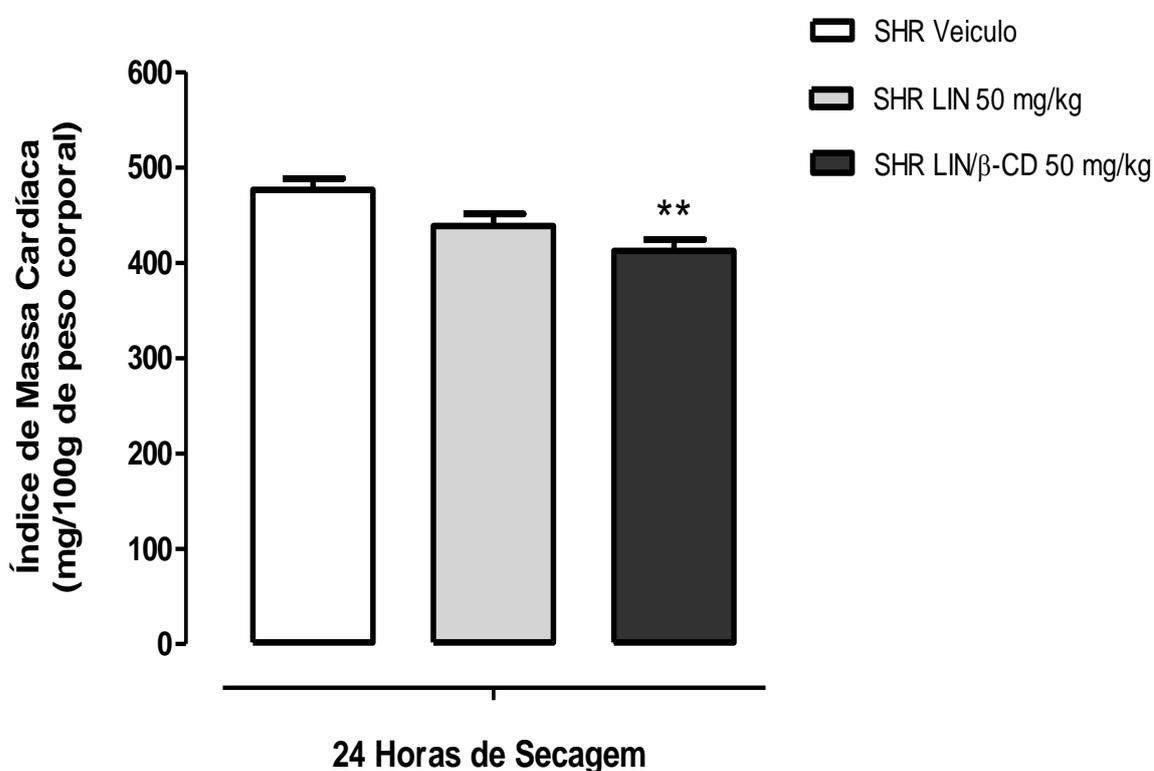


Figura 21. Efeito de LIN β -CD no índice de massa cardíaca após 24 horas de secagem em estufa. Animais SHR tratados por 21 dias. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN β -CD (n = 7). Valores expressos em média \pm S.E.M. ** p <0,01 vs. veículo.

7.2.6 Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN β -CD sobre a reatividade vascular de animais SHR.

A curva concentração-resposta para fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5} M) obtida a partir de ensaios com anéis da artéria mesentérica de animais tratados com LIN\β-CD foi deslocada para a direita, apresentando alterações estatisticamente significantes com relação à potência farmacológica, porém sem alterações com relação à eficácia ($E_{max} = 81.88 \pm 9.2$ e $pD_2 = 6.11 \pm 0,10$; $n = 6$) quando comparado à curva controle do veículo ($E_{max} = 98.4 \pm 8.8$ e $pD_2 = -5.96 \pm 0.09$; $n = 8$). O grupo tratado com a dose de LIN de 50 mg não apresentou alterações na reatividade vascular quando realizada curva concentração resposta à Phe e não alterou significativamente a eficácia farmacológica ($E_{max} = 66.20 \pm 8.43$ e $pD_2 = 5.96 \pm 0.11$, $n = 6$), quando comparado ao grupo do veículo.

Já com relação às curvas de vasorrelaxamento induzidas por NPS nas concentrações de (10^{-13} - 10^{-5} M) não houve mudanças na eficácia máxima, apesar do grupo linalol complexado parecer responder de maneira mais branda ou estar menos reativo à agente vasorrelaxante como o NPS. Veículo, ($E_{max} = -132,9 \pm 5.06$ e $pD_2 = 1.73 \pm 0.14$, $n = 8$). O LIN 50 mg ($E_{max} = -157.89 \pm 16.32$ e $pD_2 = 6.24 \pm 0.12$, $n = 6$) e Complexo de Inclusão LIN\B-CD B-CD ($E_{max} = -128.08 \pm 33.42$ e $pD_2 = 6.73 \pm 0.26$, $n = 8$) **Figura 22**.

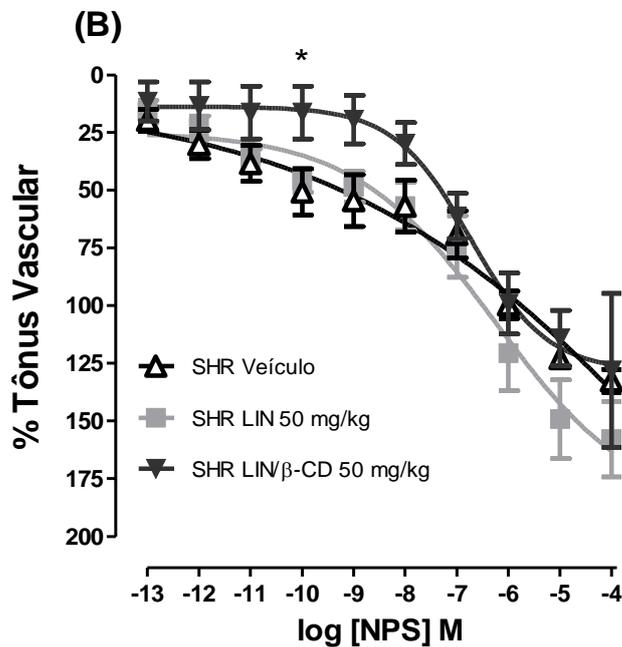
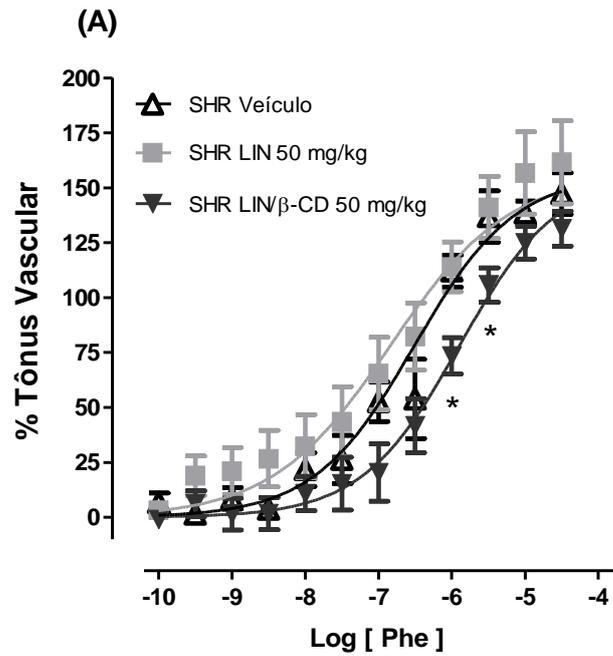


Figura 22. Efeito do tratamento com LIN e LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 21 dias. Em (A) contração em % com concentrações cumulativas de Phe; em (B) relaxamento em % com concentrações cumulativas de NPS. Grupos Veículo (n = 7), LIN 50 mg (n = 8) e LIN/β-CD 50 mg (n = 7). Valores expressos em média ± S.E.M. ** p < 0,01 vs. veículo.

7.2.7 Efeitos da administração subcrônica de LIN e LIN/β-CD sobre os níveis de citocinas de animais SHR.

Não houve diferenças estatisticamente significantes após a dosagem de citocinas nos níveis de IL-1β entre os grupos e veículo (6751,18 ± 1420,89 pg/mg, n=4), linalol (4620,06 ± 681,51 pg/mg, n=5) ou linalol complexado (4188,60 ± 1081,33 pg/mg, n=4).

No entanto, a IL-10, citocina anti-inflamatória, apresentou-se com expressão aumentada no grupo do complexo de inclusão LIN/β-CD (4046,26 ± 425,16 pg/mg, n=6) em relação ao grupo de LIN (2840,17 ± 288,05 pg/mg; n=7) e veículo (2492,25 ± 276,86 pg/mg; n=4), dados presentes na **Figura 23**.

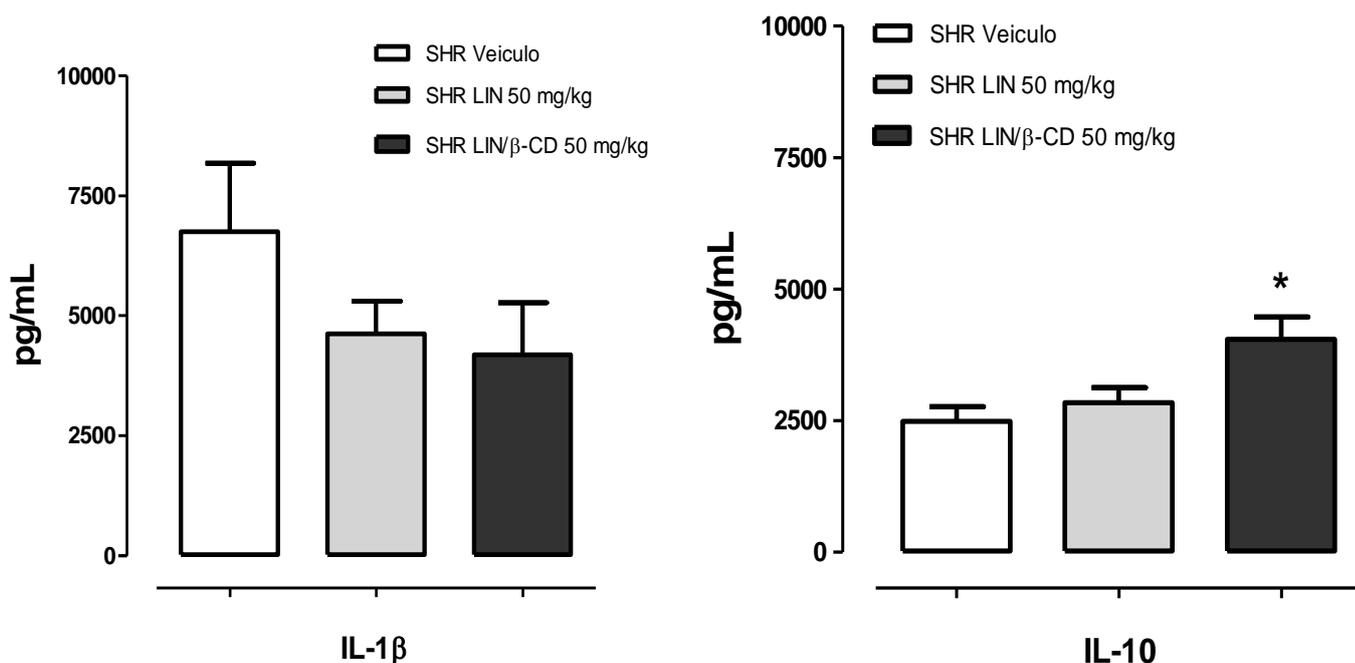


Figura 23. Níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no sangue de ratos SHR submetidos ao tratamento subcrônico. Na resposta de captura de ELISA realizada em triplicata, os níveis de citocinas inflamatórias foram mensurados, em diferentes grupos: para IL-1B veículo (n = 4), linalol (n = 5) e complexo (n = 4); para IL-10 veículo (n = 4), linalol (n = 7) e complexo (n = 6). Valores expressos em média ± S.E.M. * p <0,05.

7.2.8 Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN/β-CD no índice de massa corporal de SHR

Após a realização dos experimentos subcrônicos com LIN e complexo, decidimos aumentar o tempo de avaliação, tornando a abordagem experimental em um tratamento crônico, para observarmos à longo prazo, como estes efeitos biológicos já observados se comportariam. Acrescentamos ainda um grupo experimental de animais normotensos Wistar, como mais um controle. Como primeiro resultado desta segunda fase de abordagem experimental, avaliamos os efeitos de LIN/β-CD sobre o peso corporal. Houve aumento do peso dos animais Wistar de maneira significativa com relação aos ratos SHR, como já é cientificamente comprovado. Com relação aos animais SHR, o grupo tratado com o complexo não apresentou diferenças quanto ao crescimento sendo fisiologicamente compatível com o crescimento dos demais grupos de SHR tratados **Figura 24**.

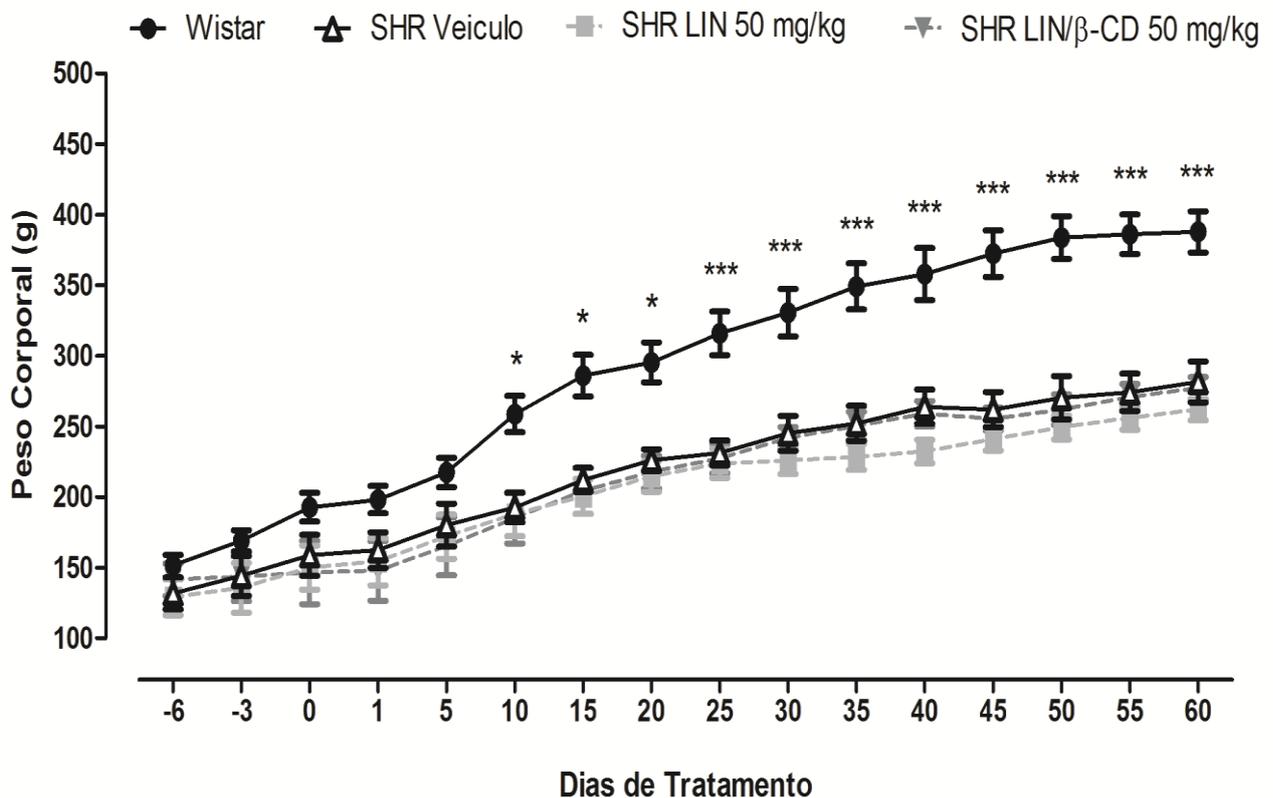


Figura 24. Efeito do tratamento crônico de 60 dias com LIN/β-CD sobre o e ganho de peso corporal. Em valores brutos ganho de peso corporal dos animais wistar e SHR tratados. Wistar (n=5), Veículo (n=5), LIN 50 mg (n=6) e LIN/β-CD (n=6). Valores expressos em média ± S.E.M.

7.2.9 Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN/ β -CD na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos SHR e wistar

Na intenção de avaliar se os efeitos anti-hipertensivos do (-)-linalol poderiam ser ainda melhores com o aumento do tempo de tratamento, resolvemos tratar os animais Wistar e SHR por 60 dias após um período de treinamento e adaptação às condições como a gavagem e medida da pressão arterial com pletismógrafo de cauda.

É possível avaliar que o grupo tratado com solução salina, sendo o grupo SHR veículo atingiu níveis de pressão arterial ao final do tratamento muito superiores aos demais animais SHR (PAM veículo = $204,00 \pm 20,00$, mmHg, n=5) sendo que os animais tratados com LIN apresentaram perfil de pressão arterial inicialmente controlada, porém acompanhando de maneira próxima o grupo veículo.

Assim sendo, o tratamento com LIN puro (50 mg/kg) induziu uma diminuição significativa da pressão arterial com 15, 20 e 25 dias de tratamento, assim como 40, 45 e 50 dias porém ao final, estabeleceu níveis pressóricos SHR LIN (PAM = $180,00 \pm 10,50$ mmHg, n=6) semelhantes ao SHR Veículo.

Interessantemente, o grupo de animais normotensos Wistar, tratados com solução salina, apresentaram níveis de pressão arterial muito estáveis do início ao final do tratamento, com pouca variabilidade, alcançando ao final do tratamento valores de pressão condizentes com sua condição clínica de animal sadio wistar (PAM = $116,80 \pm 2,41$ mmHg, n=5).

O grupo de animais sob administração do complexo de inclusão de β -ciclodextrina e LIN (50 mg/kg) impediram o desenvolvimento de hipertensão nestes animais SHR, sendo capaz também de reduzir de maneira importante e estatisticamente significativa a pressão arterial, quando comparado ao grupo do veículo, a partir do 15 dia, até o final do tratamento LIN/ β -CD (PAM = $152,00 \pm 4,00$ mmHg, n=6), acompanhando de maneira muito próxima os animais sadios normotensos, sugerindo que a complexação a longo prazo é totalmente favorável para diminuição e controle dos níveis pressóricos de maneira satisfatória, como é possível observar na **Figura 25A**.

Com relação aos níveis de frequência cardíaca, o tratamento com o complexo parece não influenciar neste parâmetro, apresentando dados semelhantes em todos os grupos tratados **Figura 25B**.

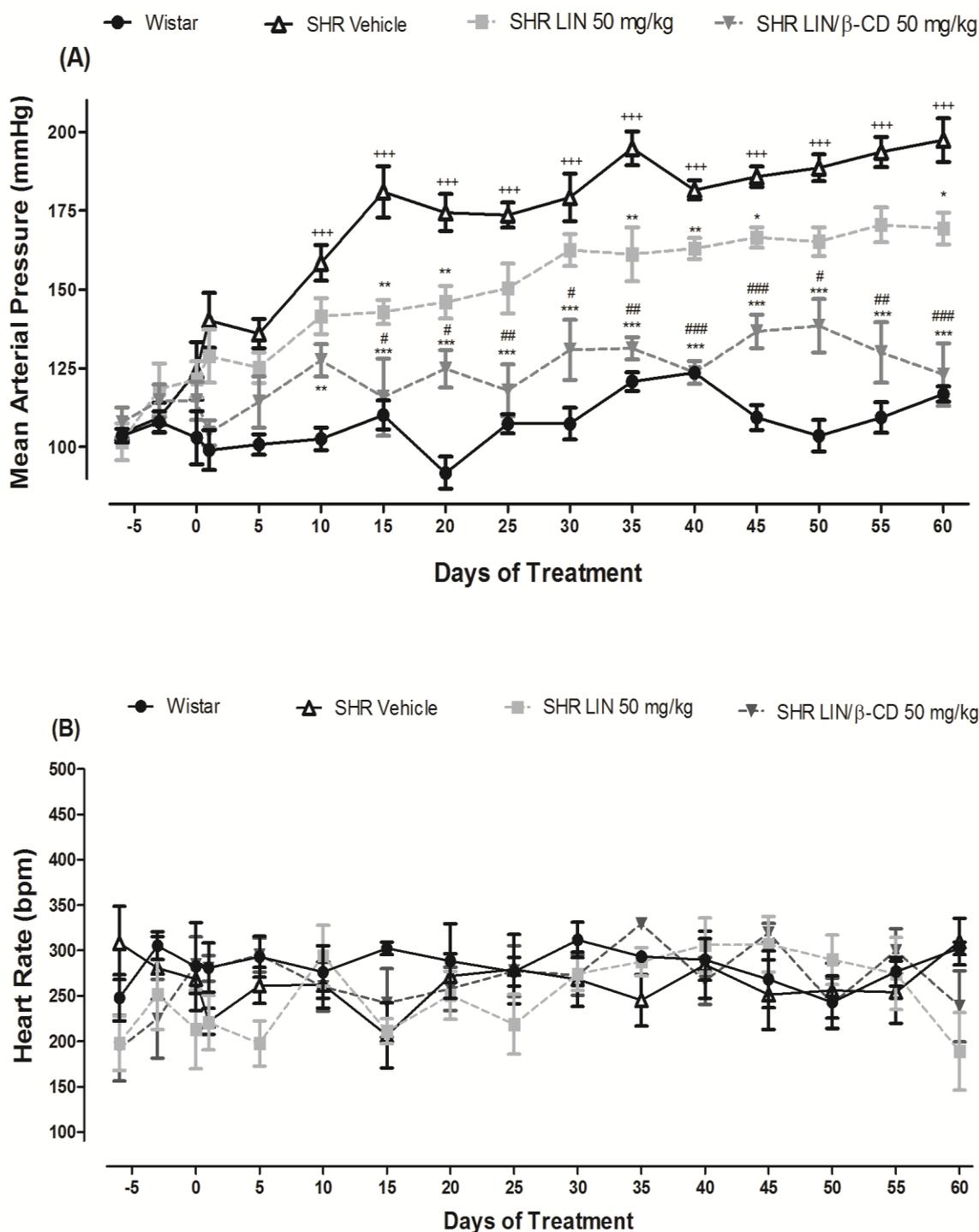


Figura 25. Efeito do tratamento crônico de 60 dias com LIN/BCD sobre os níveis de pressão arterial e frequência cardíaca. Em valores brutos PAM e FC. Veículo (n=5), linalol 50 mg (n=6), LIN/BCD (n=6) e wistar (n=5). Valores expressos em média \pm S.E.M *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs Vehicle; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs LIN and + p<0.05++, p<0.01 and +++ p<0.001 vs Wistar.

7.2.10 Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN/β-CD sobre o índice de massa cardíaca de ratos SHR e Wistar.

O tratamento crônico de 60 dias resultou em valores inferiores no índice de massa cardíaca dos animais Wistar, servindo portanto de controle e parâmetro para comparação com a linhagem SHR. Após terem sido limpos e livres de tecido gorduroso, os corações dos animais SHR pesados em balança analítica apresentaram diferenças estatisticamente significantes quanto ao índice de massa cardíaca, somente no grupo SHR LIN/β-CD quando comparado ao SHR Veículo. Dados presentes na **Figura 26**.

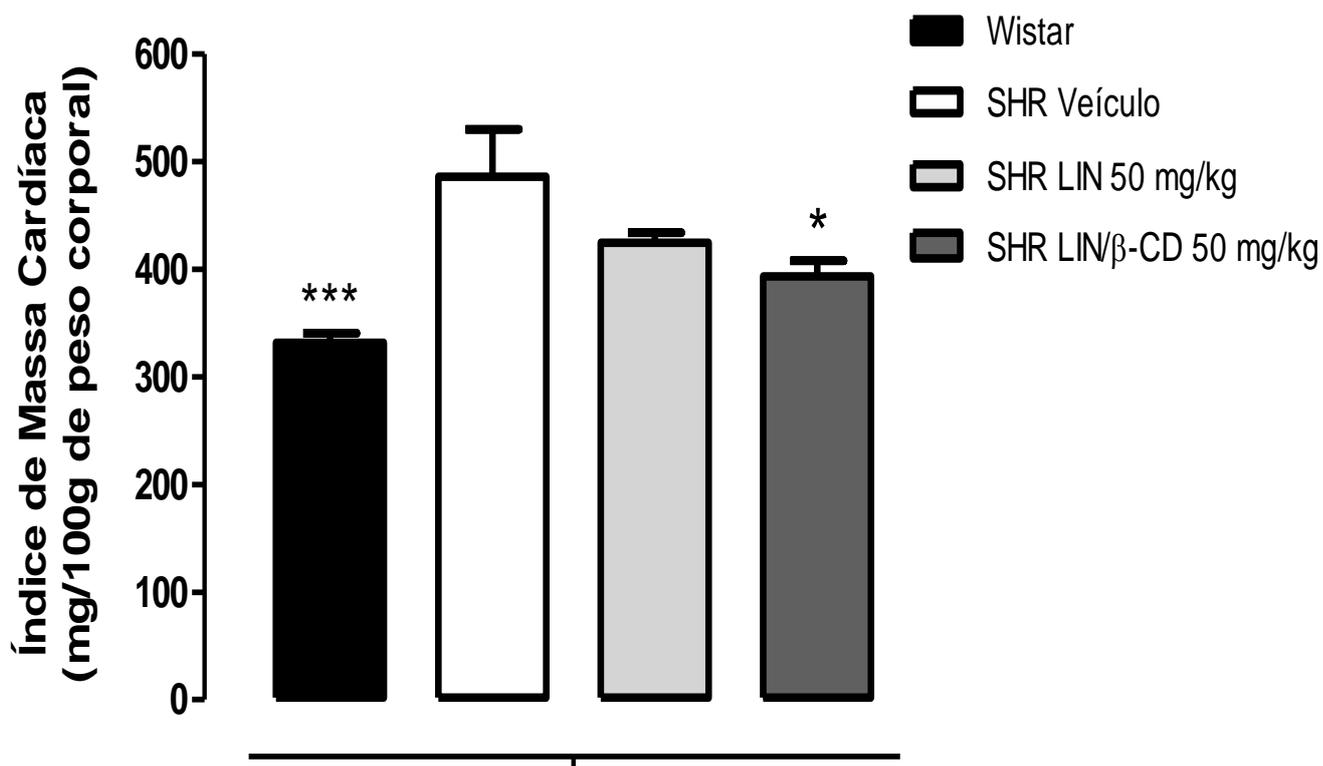


Figura 26. Efeito de LIN/β-CD no índice de massa cardíaca. Animais SHR e Wistar tratados por 60 dias. Grupos Veículo (n=5), LIN 50 mg (n=6), LIN/β-CD (n=6) e Wistar (n=5). Valores expressos em média ± S.E.M. *p <0,05 vs. veículo.

7.2.11 Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN/ β -CD sobre reatividade vascular de animais SHR.

Na **Figura 27** é possível observar os registros originais dos experimentos para curva concentração resposta para fenilefrina, assim como para acetilcolina e nitropussiato de sódio, representativos dos experimentos realizados e dos gráficos construídos. Apresentamos inicialmente os dados de variação da contração induzidos por solução despolarizante de Tyrode contendo KCl 60mM como normalizador de nossos dados, sendo possível observar que não há diferenças estatisticamente significantes entre os 4 grupos de tratamento quanto à este parâmetro. Já com relação à curva concentração-resposta para fenilefrina nas concentrações de (10^{-10} - 10^{-5} M) obtidas a partir de ensaios com anéis da artéria mesentérica de animais tratados, o grupo de tratamento com LIN/ β -CD deslocou sua curva farmacológica para a direita inferindo diminuição da reatividade vascular com diferença estatisticamente significativa com relação à eficácia respectivamente para os grupos wistar, veículo, LIN e LIN/ β -CD ($E_{max} = 161,52 \pm 8,85, n=11; 210,16 \pm 19,64, n=8; 146,72 \pm 12,34, n=7; 131,78 \pm 5,10, n=7$) **Figura 28**.

As curvas de vasorelaxamento induzidos por Ach e NPS demonstraram efeitos interessantes de vasorelaxamento com diferenças estatísticas no que diz respeito aos experimentos do grupo LIN/ β -CD. Os resultados de eficácia máxima para Acetilcolina foram respectivamente: wistar ($-91,84 \pm 11,14, n=6$); veículo ($-57,96 \pm 8,72, n=8$); linalol ($-70,52 \pm 6,80, n=7$) e complexo ($-65,29 \pm 5,22, n=8$). Já com relação aos grupos da curva com NPS, somente o grupo tratado com LIN/ β -CD apresentou diferença estatisticamente significativa no resultado, com eficácia máxima respectivamente de: wistar ($-126,31 \pm 9,24, n=6$), (veículo $-127,39 \pm 5,44, n=7$); linalol ($-121,04 \pm 10,45, n=6$) e complexo - $134,92 \pm 11,09, n=8$) **Figura 29**.

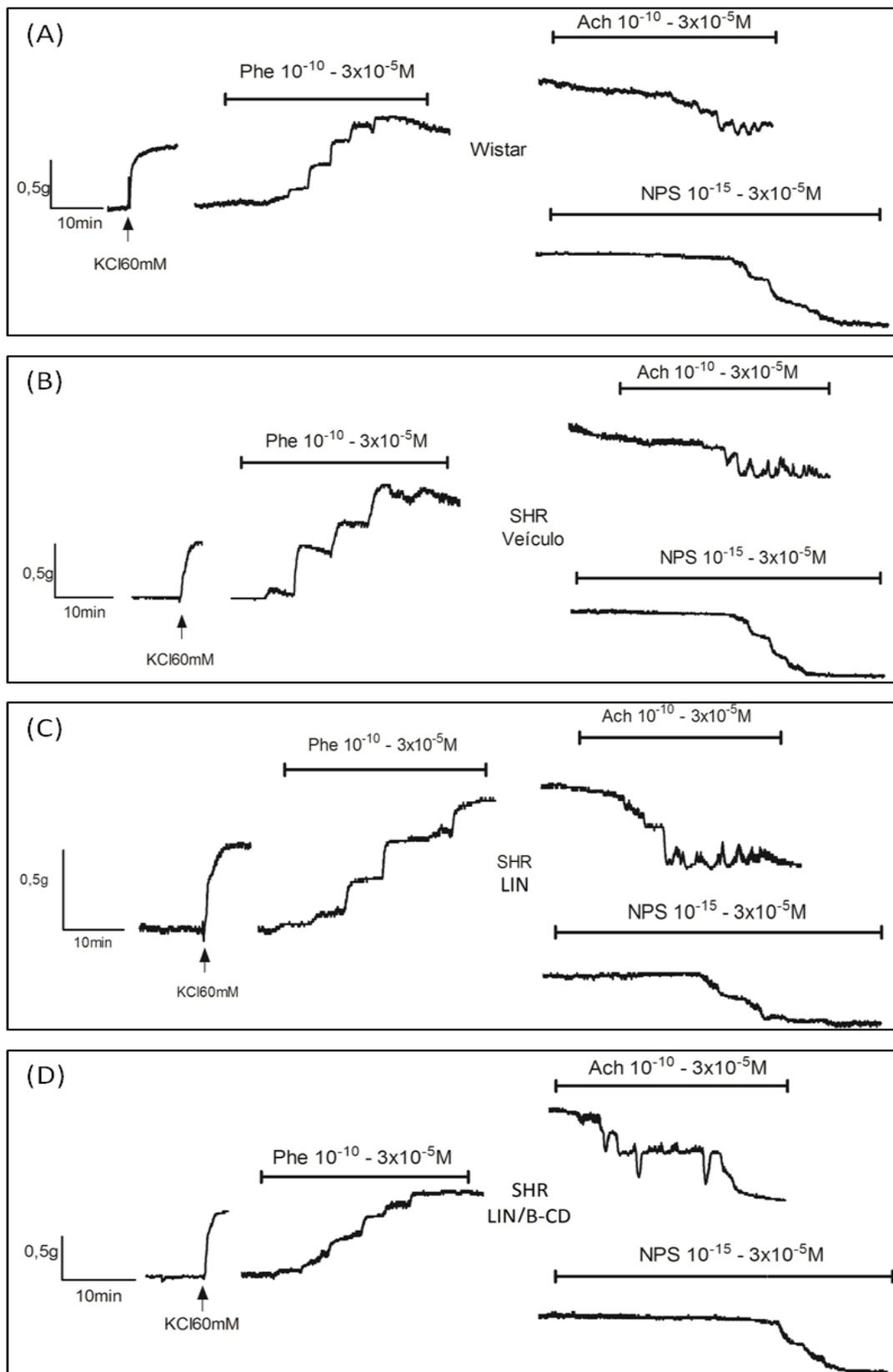


Figura 27. Registros originais das curvas concentração resposta realizadas para avaliação da reatividade vascular do tratamento de 60 dias de ratos wistar e SHR. Experimentos com agente vasocontraturante Phe e agentes vasorelaxantes Ach e NPS. Em (A) grupo wistar, em (B) grupo SHR veículo, em (C) grupo tratado com LIN 50 mg/kg e em (D) grupo tratado com LIN/ β -CD 50 mg/kg.

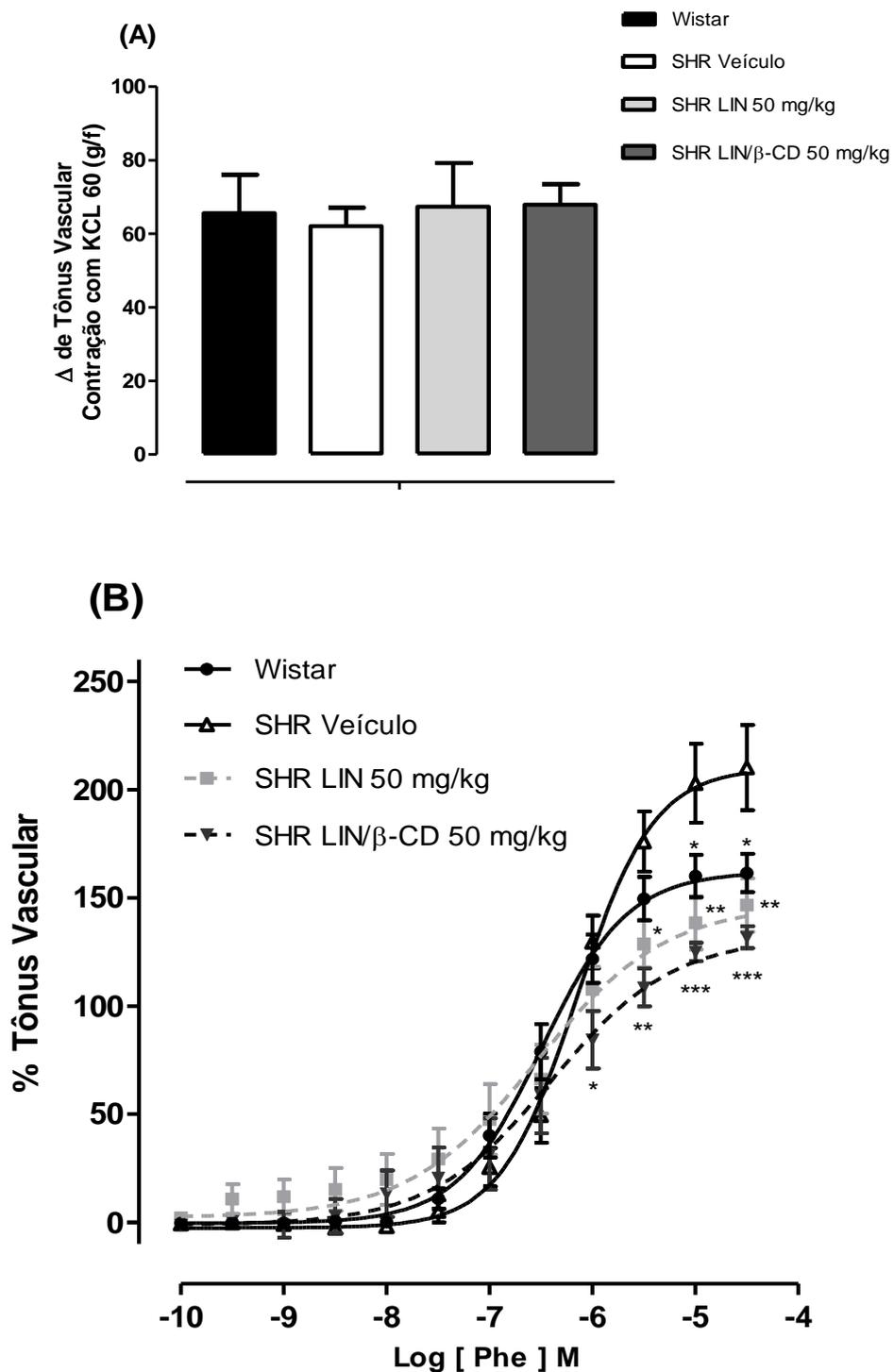


Figura 28. Efeito de LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 60 dias. No gráfico em barras, delta de contração com KCL 60 e gráfico de linhas em % de contração com concentrações cumulativas de Phe. Grupos experimentais wistar (n=11), veículo (n = 7), LIN 50 mg/kg (n=8) e LIN/β-CD 50 mg/kg (n=7). Valores expressos em média ± S.E.M. *p <0,05, **p<0,01 e ***p <0,001 vs. veículo.

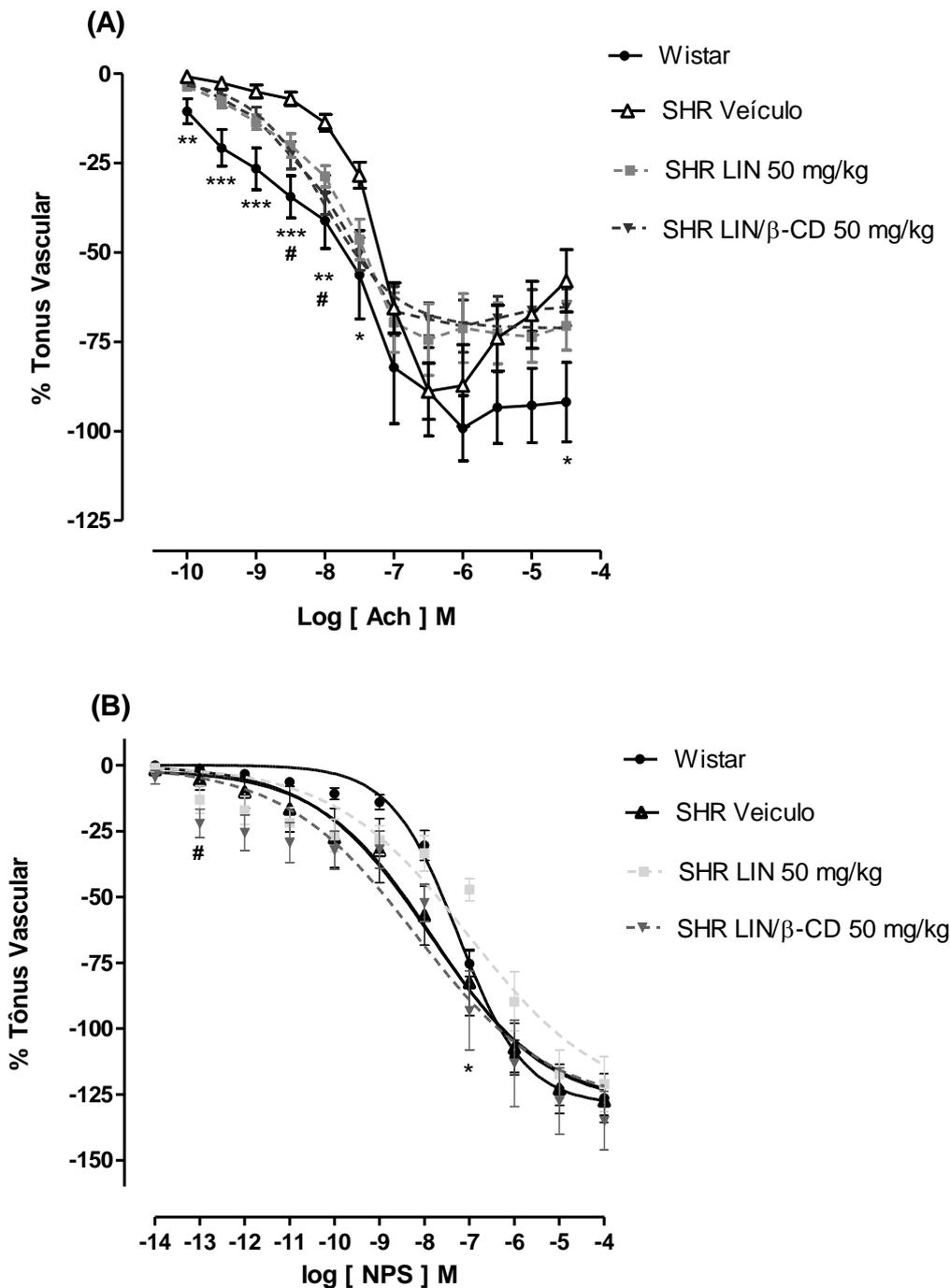


Figura 29. Efeito de LIN/β-CD na reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Animais SHR tratados por 60 dias.

Em (A) gráfico em linha com % de concentrações cumulativas de Ach. Grupos wistar (n=6), veículo (n=6), LIN 50 mg/kg (n=7) e LIN/β-CD 50 mg/kg (n=7) com símbolos (*) veículo vs wistar e (#) veículo vs LIN/β-CD.

Em (B) gráfico em linha com % de concentrações cumulativas de NPS. Símbolo (*) LIN vs LIN/β-CD e (#) veículo vs LIN/β-CD. wistar (n=6), veículo (n=7), LIN 50 mg/kg (n=6) e LIN/β-CD 50 mg/kg (n=5) Valores expressos em média ± S.E.M. Valores expressos em média ± S.E.M com *p < 0,05, #p < 0,05 e ***p < 0,001.

7.2.12 Efeitos do tratamento crônico de 60 dias com LIN e LIN β -CD sobre a morfologia e histopatologia do coração e aorta de ratos SHR e Wistar.

Secções do ventrículo esquerdo e de segmento da aorta torácica foram submetidas a processamento histológico e inclusão em blocos de parafina. A seguir, lâminas contendo cortes de 4 micrômetros de espessura destes tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e picrossirius red, esta última técnica para evidenciar o colágeno tipo I, presente nos tecidos normais, bem como eventual presença de colágeno tipo III, que é encontrado em áreas de cicatrização.

Nas secções do ventrículo esquerdo, as fibras musculares mostraram ramificações habituais, citoplasma estriado e núcleos ovoides centrais e regulares. Não foram observadas alterações nos miócitos que caracterizassem hipertrofia cardíaca em nenhum dos grupos examinados: aumento do diâmetro transversal das fibras e irregularidades na forma e coloração dos núcleos. Apenas em um ventrículo esquerdo de um dos animais, posteriormente nomeado como sendo do grupo tratado com LIN β -CD, notou-se a presença de pequenas áreas subendocárdicas e intramurais de substituição dos cardiomiócitos por tecido conjuntivo jovem, rico em fibroblastos e com escassa deposição de colágeno, indicando processo de reparo de infartos prévios. Esta alteração morfológica indica uma lesão ocorrida provavelmente entre uma a duas semanas da eutanásia do animal. É possível observar as colorações em HE e picrossirius em tecido cardíaco, sobre amplificação de 200 x em microscópio

Figura 30.

A análise histológica dos corações em microscopia de luz mostrou discretas alterações nos espécimes pertencentes a todos os grupos de tratamento, sendo que as lâminas dos artefatos provenientes do grupo de animais normotensos wistar mostraram um miocárdio com aspecto saudável, de espaços intersticiais definidos sem sinais de hipertrofia ou aumento celular, gerando um aspecto histológico normal (A1). Com relação ao grupo de animais SHR veículo, neste é possível observar também aspecto saudável, porém com redução dos espaços intersticiais com alguns cardiomiócitos aparentam com uma leve desorganização das fibras musculares (B1). Em (C1) é possível

observarmos o grupo de animais tratados com LIN puro, que em sua maioria, apresentam cardiomiócitos alongados e ramificados, exibindo estriações transversais com eosinofilia típica e núcleos localizados no centro da fibra muscular. Dados bastante semelhantes no grupo tratado com o complexo LIN/ β -CD em que o miocárdio apresenta cardiomiócitos de eosinofilia típica, estriações transversais e núcleos localizados centralmente (D1) **Figura 30**.

Com relação ao corante picrossirius, as fibras colágenas maduras evidenciadas em avermelhado e fibras colágenas jovens coradas em verde, sendo possível observarmos nos grupos wistar (A2) e LIN (C2) perfis bem semelhantes de apresentação, com miocárdio de aspecto saudável, com bastante espaço intersticial e bem definidos, sem qualquer sinal de hipertrofia ou aumento celular, assim como ausência de sinais de injúria. Já nas lâminas (B2) e (D2) apesar de não apresentarem aspectos atípicos, é possível observar cardiomiócitos com discreta desorganização das fibras musculares, mas estes se constituindo como achados incomuns **Figura 30**.

Embora não tenha sido observado nos animais tratados indícios de disfunção cardíaca ou injúria dos tecidos em nenhum dos grupos de tratamento, não podemos descartar que a exposição experimental mais prolongada não possa causar alguma alteração histológica. Nas secções das artérias aorta, pode-se observar as três camadas bem representadas. Em todos os grupos, a íntima era delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo e revestida por endotélio de aspecto habitual; a camada média constituída predominantemente por tecido conjuntivo denso e menor quantidade de fibras musculares lisas, como normalmente visto nas artérias elásticas; na adventícia, o tecido conjuntivo denso estava permeado por vasa vasorum de aspecto típico. Em nenhuma das amostras foram observados espessamento fibroso da íntima, infiltrado inflamatório, hiperplasia da camada média e deposição de colágeno em qualquer grau, alterações que denotariam dano vascular por hipertensão. Em seguida é possível observar as análises histológicas em artéria aorta dos animais tratados por 60 dias, dados presentes na **Figura 31**.

Com relação à artéria aorta dos animais tratados é possível observar e constatar que as lâminas do grupo de animais normotensos wistar apresentaram músculo liso e camada arterial com aspecto saudável, de espaços definidos sem sinais de aumento celular (A1). Com relação ao grupo de animais SHR veículo,

neste é possível observar também aspecto saudável, porém com redução dos espaços intersticiais e algumas células aglutinadas de modo a aparentar desorganização das fibras musculares (B1). Em (C1) é possível observarmos o grupo de animais tratados com LIN puro, que em sua maioria, apresentam células alongadas, com estriações transversais típicas da fibra muscular. Dados bastante semelhantes no grupo tratado com o complexo LIN/ β -CD onde há estriações transversais e núcleos localizados de forma central (D1) **Figura 31**.

Com relação ao corante picrossirius, as fibras colágenas maduras em vermelho e fibras colágenas jovens em verde observamos no grupo wistar (A2) com células de aspecto saudável, com espaço intersticial bem definido, sem sinal de injúria. Já na lâmina (B2) apesar de não apresentarem aspectos atípicos, é possível observar mais corante avermelhado, com discreta desorganização das fibras musculares e da camada externa, mas sendo apenas um achado que poderia diferenciar os grupos de tratamento. Nas artérias em (C2 e D2) há apresentação típica das estruturas, com aspecto dentro do esperado para esta estrutura **Figura 31**.

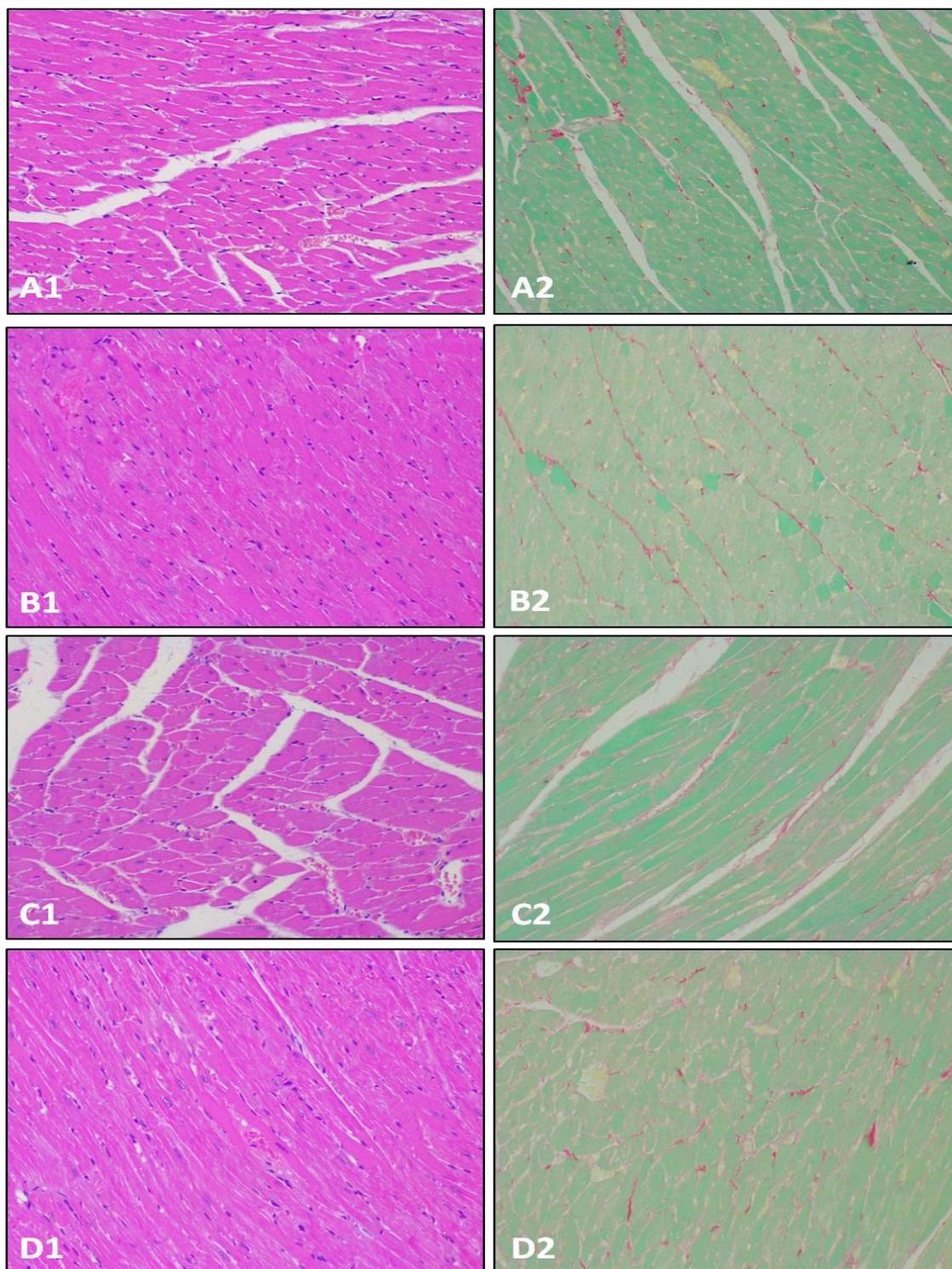


Figura 30. Ausência de alterações morfológicas em músculo cardíaco de ratos wistar e SHR tratados por 60 dias. Fotomicrografias mostrando seções longitudinais do ventrículo esquerdo de amostras dos grupos: wistar em (A), SHR veículo em (B), SHR tratado com LIN em (C) e SHR tratado com LIN/ β -CD em (D). Miocárdios normais, com fibras bem organizadas e preservação da estrutura nos tratados com LIN e LIN/ β -CD. Coloração dos cortes histológicos com hematoxilina-eosina (1) e picrosirius (2). Fibras colágenas maduras evidenciadas em vermelho e fibras colágenas jovens, coradas em verde com picrosirius. Aumento de 200X.

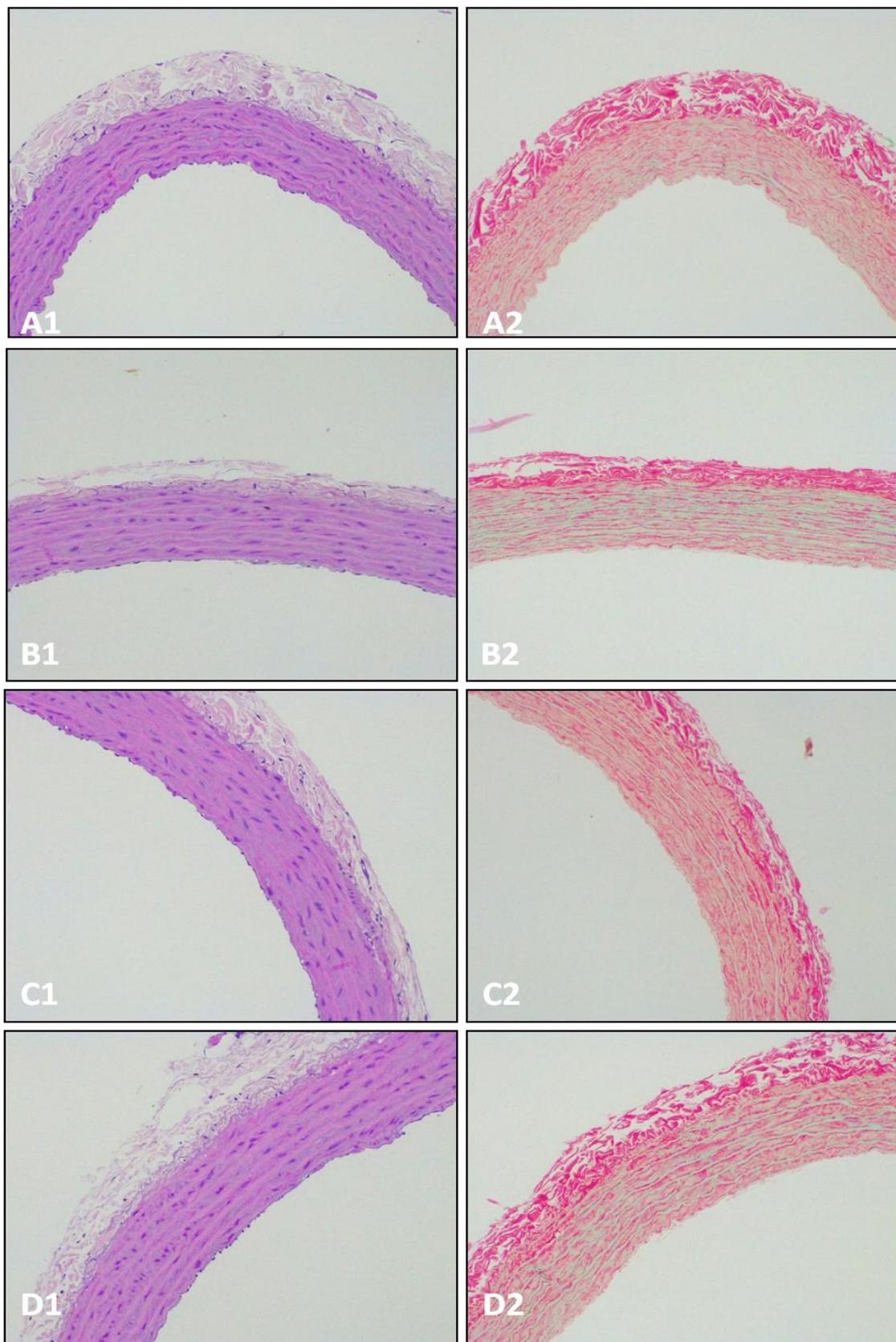


Figura 31. Ausência de alterações morfológicas em artéria aorta de ratos wistar e SHR tratados por 60 dias. Fotomicrografias mostrando seções longitudinais de artéria aorta de amostras dos grupos: wistar em (A), SHR veículo em (B), SHR LIN em (C) e SHR LIN/ β -CD em (D). Aortas normais com fibras bem organizadas nos grupos controle e preservação da estrutura em espécimes tratados com LIN e LIN/ β -CD. Coloração dos cortes histológicos com hematoxilina-eosina (1) e picrosirius (2). Fibras colágenas maduras evidenciadas em vermelho e fibras colágenas jovens, coradas em verde com picrosirius. Aumento de 200X.

8 DISCUSSÃO

Diante das lacunas na literatura científica acerca dos efeitos cardiovasculares do monoterpene linalol assim como da utilização de beta-ciclodextrina para formação de um sistema de liberação controlada de fármaco, o presente estudo foi desenvolvido. Importante reforçar que em nosso trabalho, LIN/ β -CD foi capaz de melhorar os efeitos biológicos de LIN puro sobre o sistema cardiovascular e a partir de estudos farmacocinéticos destes compostos, comprovamos que as variáveis de biodisponibilidade absoluta e relativa de LIN/ β -CD na corrente sanguínea dos ratos tratados por via oral foram aumentadas significativamente. A absorção, as velocidades de distribuição do fármaco do compartimento central ou corrente sanguínea para o periférico, representado pelos órgãos mais distais, assim como seu retorno e excreção foram melhoradas quando o LIN estava incluído em β -CD.

Outros dados importantes foram os efeitos farmacodinâmicos do complexo LIN/ β -CD, que apresentou potencial hipotensor quando aplicado por via intravenosa e quando administrado por via oral, induzindo hipotensão e bradicardia com efeitos estatisticamente superiores quando comparados ao LIN puro. Uma vez administrado de forma subcrônica, o complexo demonstrou efeito anti-hipertensivo consideravelmente superior ao LIN sendo ainda possível observar aumento nos níveis séricos da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuição do índice de massa cardíaca, o que não ocorreu no grupo LIN.

Quando aumentamos o tempo de tratamento para 60 dias, houve potencial anti-hipertensivo estatisticamente superior da forma complexada comparada a forma livre, seguindo um perfil de evolução temporal muito semelhante aos animais normotensos saudáveis, sugerindo que o tratamento com LIN/ β -CD é capaz de diminuir e manter baixos os níveis pressóricos de modo mais potente e eficaz do que LIN. Ao avaliarmos os tecidos após tratamento de 60 dias, houve diminuição estatisticamente significativa com relação ao índice de massa cardíaca dos animais tratados com LIN/ β -CD quando comparados ao grupo veículo e LIN; houve ainda diminuição da reatividade vascular ao agente vasocontrator α -1 adrenérgico, Phe de modo estatisticamente significativo quando comparado ao grupo veículo, com resultado superior ao apresentado por LIN; com relação à curva de reatividade com Ach, sua ação nos receptores

muscarínicos foi capaz de causar vasorelaxamento também estatisticamente significativo no grupo tratado com LIN/ β -CD o que não ocorreu no grupo tratado com LIN, sendo possível ainda, observar diferenças na reatividade vascular entre os animais normotensos wistar e veículo SHR, já bem estabelecidas na literatura científica. (LUSCHER e PAUL, 1989; RIZZONI, CASTELLANO, PORTEN, BETTONI e LORENZA, 1994; WYNNE et al., 2018).

A pesquisa com ciclodextrinas para as mais diversas finalidades se faz presente há décadas na comunidade científica, uma vez que elas são naturalmente sintetizadas, com baixo custo para reprodutibilidade e apresentam uma infinidade de funções biológicas (DAVIS e BREWSTER, 2004; KFOURY, AUEZOVA, GREIGE, e SOPHIE, 2019). Há um cunho histórico por trás destes compostos que pode ser observado de maneira bastante abrangente, clara e sucinta nos artigos “Thirty years with cyclodextrins” de (DUCHÊNE e BOCHOT, 2016) assim como em “Past, present, and future of cyclodextrin research” (SZEJTLI, 2004).

Ambos os artigos trazem abordagens históricas e do estado da arte em que relembram desde a década de 70 até os dias mais atuais, o potencial das ciclodextrinas, em especial a beta-ciclodextrina. Entretanto, há escassez de informações da atuação do complexo linalol/ β -ciclodextrina no sistema cardiovascular, o que nos permitiu a avaliação dos efeitos biológicos por diversas abordagens experimentais. Tal hipótese surge a partir do momento que encontramos na literatura, respaldo para a obtenção do complexo LIN e β -CD (LIMA et al., 2016; MENEZES et al., 2014) em que demonstraram ser possível, viável e eficaz a inclusão de monoterpenos em beta-ciclodextrina, e que muitas vezes os efeitos biológicos testados são significativamente melhorados e otimizados, com diminuição de efeitos adversos (DAVIS e BREWSTER, 2004).

Assim sendo, após minuciosa busca pela farmacodinâmica e farmacocinética do monoterpeno linalol e de seu complexo de inclusão em beta-ciclodextrina, não foram encontrados dados contundentes, para embasar nossa discussão sobre biodisponibilidade e estabilidade destes compostos, principalmente no que concerne ao sistema cardiovascular, sendo encontrados apenas estudos relacionando sua formação em complexo de inclusão

(MENEZES et al., 2014) e efeitos biológicos em outros sistemas (NASCIMENTO et al., 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013).

Inicialmente precisávamos realizar a avaliação do perfil farmacocinético de LIN e LIN/ β -CD assim como a sua modelagem populacional, que nos dariam indícios do comportamento desta molécula e composto na corrente sanguínea e em um sistema biológico íntegro. Assim sendo, a farmacocinética foi uma das ferramentas utilizadas, e torna-se importante para auxiliar no alcance de uma posologia ideal de modo a nos ajudar como entender qual a melhor dose para administração via oral de modo a possibilitar também a compreensão da ocorrência de variações entre os grupos experimentais (RAKMAI et al., 2018; SHI et al., 2016).

O principal objetivo foi garantir que as doses administradas alcancem uma margem terapêutica, em que fosse possível observarmos os efeitos biológicos esperados de diminuição da pressão arterial e modulação da frequência cardíaca com o mínimo possível de efeitos colaterais. A principal via de administração dos anti-hipertensivos é largamente difundida e utilizada como sendo a via oral; é também a que mais apresenta adesão por parte dos pacientes (DE AZEVEDO et al., 2011; WHELTON et al., 2017), por isso escolhemos realizar estes experimentos, seja de caráter agudo, subcrônico e crônico, avaliando a administração orogástrica dos compostos. Um dos mais importantes itens a levarmos em consideração na administração de fármacos é a sua biodisponibilidade, que indica a fração absorvida do fármaco; esta, por sua vez, é produto da própria via de administração, das propriedades físicas e químicas do fármaco ou ainda de fatores intrínsecos e inerentes ao paciente ou animal, além de seus níveis pressóricos e metabolismo (JOHANSSON et al., 2014; KAISER et al., 2010).

Os nossos resultados revelaram que a farmacocinética do complexo LIN/ β -CD, comparado à forma livre, apresentou ganhos importantes. Houve maior absorção de linalol na corrente sanguínea quando estava na forma complexada, sendo alcançada uma concentração sanguínea de cerca de 1000x maior quando foi administrado sobre a forma complexada quando comparamos com LIN. Quando avaliamos a biodisponibilidade para os tecidos, foi observado que a inclusão do linalol a β -CD multiplicou em 20 vezes mais a quantidade do monoterpeneo linalol na corrente sanguínea, elevando

substancialmente a quantidade deste fármaco disponível na corrente sanguínea, o que torna possível sua ação de maneira mais duradoura e eficaz, ao atingir da melhor forma possível órgãos e tecidos do sistema cardiovascular (ADEOYE e CABRAL-MARQUES, 2017; KAISER et al., 2010; MENEZES et al., 2014).

Outro parâmetro importante a ser observado foi a diminuição do clearance, que se constitui da capacidade do organismo em excretar ou eliminar determinada substância da corrente sanguínea, seja por via renal ou hepática. Sendo assim, quanto menor o clearance, como encontrado no grupo tratado com LIN/ β -CD, torna-se possível o fármaco permanecer por maior tempo na corrente sanguínea de modo a realizar seus efeitos biológicos por mais tempo quando comparado à LIN livre. Estudos de modelagem populacional realizados demonstraram que os parâmetros obtidos de volume e constantes de eliminação e distribuição foram evidentemente alterados de modo a melhorar e otimizar os efeitos de LIN/ β -CD uma vez que a dispersão do fármaco em órgãos e tecidos, foi substancialmente aumentada havendo mais moléculas do fármaco circulantes na corrente sanguínea, efeito benéfico farmacologicamente (KAISER et al., 2010; LIMA et al., 2016).

As análises de concentração e distribuição individuais e populacionais, também demonstraram que LIN/ β -CD foi capaz de tornar o monoterpeno LIN muito mais capaz de promover a distribuição e penetração em tecidos e órgãos após a administração, com maior tempo de ação e conseqüentemente havendo diminuição da possibilidade de excreção do fármaco seja por via renal ou hepática de forma facilitada, tornando o mesmo intacto ou perfeitamente ativo por um maior período de tempo. Tais efeitos tornam LIN mais eficaz em sua ação sobre o sistema cardiovascular, considerando ainda que nossos dados são inéditos e biologicamente promissores.

Partindo deste raciocínio, nossos experimentos então foram idealizados e baseados em estudos encontrados na literatura, cuja ação da mistura racêmica de (\pm)-linalol, atua como um agente hipotensor, associado à taquicardia (Anjos et al., 2013), dado este que em nossos achados divergem quanto aos efeitos cardíacos, pois a fração levorrotatória de (-)-linalol apresentou efeito hipotensor e bradicárdico quando administrado por via intravenosa na dose de 50mg. Com relação à administração do complexo de

inclusão, de maneira aguda, por via intravenosa, não há dados na literatura científica sobre esta forma de aplicação assim como seus efeitos sobre o sistema cardiovascular. Uma vez em sistema de liberação controlada, LIN/ β -CD apresentou hipotensão como efeito majoritário sobre a pressão sanguínea, havendo taquicardia como efeito reflexo, corroborando com os estudos de (MENEZES et al., 2010; SANTOS et al., 2011) que apresentam uma associação à taquicardia. Este efeito pode ser justificado por um reflexo cardiovascular, através de um mecanismo de compensação após diminuição rápida da PA, por ação de barorreceptores presentes também no arco aórtico, como reguladores à curto prazo da pressão sanguínea (ROBLES-CABRERA et al., 2014). Porém, estudos adicionais deverão ser realizados para demonstrar se o efeito taquicárdico seria decorrente de uma resposta reflexa.

Apesar destes experimentos iniciais por via de administração intravenosa, os medicamentos anti-hipertensivos são comumente administrados por via oral, seja através de drágeas ou comprimidos, sendo necessária geralmente uma dose única durante todo o dia, por longos períodos de tratamento (DE AZEVEDO et al., 2011; PICCINI, 2012). Há ainda a necessidade algumas vezes de associação com diuréticos ou ingestão de mais de um comprimido por dia, de diferentes classes de fármacos, todas estas ações voltadas para o controle da hipertensão arterial (WHELTON et al., 2017).

Levando-se em consideração o exposto, e o único estudo com administração oral de LIN para efeitos cardiovasculares, realizado por (ANJOS et al., 2013), foi possível observar a administração de 200mg de LIN puro por via oral, que apresentou efeito hipotensor máximo após 3 horas de administração. Entretanto em nossos achados, fizemos a administração de um quarto da dose anteriormente testada, ou seja, 50mg do LIN na forma livre e complexada em β -CD na mesma dose, também por via oral, sendo que durante as 6 horas de observação experimental foi possível perceber uma diminuição na pressão arterial estatisticamente significativa somente no grupo que recebeu o linalol complexado, nos períodos de efeito máximo após 5:00 hrs e 5:30 hrs quando comparado ao momento da aplicação da droga e quando comparamos a diferença nos níveis pressóricos entre LIN e LIN/ β -CD, houve diferença estatisticamente significativa após 15 min. assim como, após 4, 5 e 6 horas, caracterizando e diferenciando o efeito hipotensor associado ao complexo;

Com relação ao sistema cardiovascular e à hipertensão, o ideal é que os experimentos científicos sejam realizados com animais espontaneamente hipertensos para mimetizar a hipertensão essencial, que acomete 95% da população de hipertensos (WEBER e ANLAUF, 2014). Justamente pensando nisso, nossos resultados mostraram que o pré-tratamento de animais SHR de modo subcrônico com LIN/ β -CD em uma dose de 50 mg/kg impediu o desenvolvimento de hipertensão arterial, que ocorre naturalmente em ratos SHR quando comparado ao grupo veículo. O controle dos níveis pressóricos é possível de ser estatisticamente analisado desde o 15^a dia de tratamento, permanecendo até sua finalização após 20 dias. Estes dados já foram publicados em periódico (CAMARGO et al., 2018), permitindo que a comunidade científica tenha acesso e reproduza com outros monoterpenos.

Assim que percebemos que os níveis pressóricos de LIN/ β -CD na dose de 50 mg/kg permaneciam em caráter descendente ao final do tratamento subcrônico, hipotetizamos que esta diminuição dos níveis de pressão arterial poderia ser ainda mais acentuada, caso tornássemos o tratamento crônico, que é o tipo de abordagem terapêutica mundialmente utilizada para controle e manejo da hipertensão (WHELTON et al., 2017). Deste modo, tornamos o tratamento mais prolongado, com 60 dias de administração dos compostos e incluímos ainda um grupo de animais normotensos a serem tratados para termos mais um grupo controle comparativo e confirmar a diferença de níveis pressóricos entre os ratos wistar e SHR (BELL et al., 2004; FAZAN et al., 2006; RIZZONI et al., 1994; WYNNE et al., 2018).

Considerando o desenvolvimento da hipertensão essencial no modelo animal SHR, largamente discutido na literatura (ANISHCHENKO, ALIEV, SIDEKHMENOVA, SHAMANAIEV e PLOTNIKOV, 2015; DICKHOUT e LEE, 1998), assim como as diferenças existentes entre os níveis pressóricos de animais sadios normotensos wistar e SHR (MCDOUGALL, PAULL, WIDDOP & LAWRENCE, 2000; ROLOFF, WALAS, MORAES, KASPAROV e PATON, 2018), e a partir de então, nossos animais tratados com LIN/ β -CD alcançaram níveis pressóricos muito próximos aos animais normotensos sadios, ao longo de todo o tratamento, evitando a progressão da pressão arterial, típica do animal SHR, o que nos leva a crer que o complexo apresenta importante potencial anti-hipertensivo e de modulação da pressão sanguínea,

especialmente quando comparado à LIN e ao grupo veículo constituído de também de animais SHR.

Além disso, ao longo do tratamento, não foram observadas alterações significativas na ingestão de ração e água, sugerindo não haverem mudanças quanto ao desenvolvimento corporal e a ingestão nutricional. Alguns estudos sugerem que a diminuição do peso corporal pode ser indicativa de efeitos adversos de um medicamento (LAPCZYNSKI et al., 2008) e os resultados obtidos no nosso estudo mostraram que o ganho de peso evoluiu durante os tratamentos subcrônico e crônico de forma bem semelhante entre os grupos, sem perda de peso ou qualquer outra anormalidade. Adicionalmente, o ganho de peso em animais wistar, durante o tratamento crônico, foi gradativamente superior quando comparados aos animais SRH corroborando com a literatura (ANISHCHENKO et al., 2015; FAZAN et al., 2006; MCDUGALL et al., 2000)

Além disso, em nossos dados não foram observados quaisquer ocorrências de alterações de comportamento, como diminuição dos movimentos espontâneos ou convulsões, movimentações excessivas ou de caráter giratório nas caixas, assim como mortalidade ou ainda diarreia devido à ingestão de LIN ou LIN/ β -CD. Estes são sintomas clássicos que podem ser utilizados em estudos de toxicidade para inferir que algum tipo de dano biológico pode estar ocorrendo referente às drogas administradas (LAPCZYNSKI et al., 2008). Então, esses resultados sugerem a provável ausência de efeitos tóxicos com o uso de LIN e LIN/ β -CD, o que é compatível e corrobora com estudos prévios realizados com roedores que demonstraram segurança nos tratamentos diários de linalol puro com doses inferiores a 500 mg/kg (LAPCZYNSKI et al., 2008).

O SHR é geralmente considerado como um bom modelo também para estudos de avaliação de hipertrofia cardíaca (FAZAN ET AL., 2006; MOTHÉ, CARESTIATO e AGUILA, 2005). Com o objetivo de avaliar o efeito da administração de LIN/ β -CD sobre uma possível hipertrofia cardíaca de animais SHR, o coração foi removido e o peso cardíaco foi avaliado como índice de massa cardíaca. Observou-se uma diminuição significativa da massa cardíaca de corações secos em estufa a 60 graus após 24hrs em animais tratados por 21 dias com LIN/ β -CD quando comparados aos grupos veículo e LIN puro. Já com relação ao tratamento crônico de 60 dias, foi possível observar que os

ratos wistar normotensos sadios, apresentaram índice de massa cardíaca muito inferior aos animais SHR tratados com veículo.

Este dado corrobora com estudos anteriores acerca da massa cardíaca e alterações cardiovasculares sofridas pelos animais SHR (ANISHCHENKO et al., 2015; DICKHOUT et al., 1998). Quando observamos a massa cardíaca dos animais tratados com LIN e complexo, apenas o grupo LIN/ β -CD apresentou diminuição estatisticamente significativa da massa cardíaca, sugerindo potencial efeito cardíaco direto aproximando este animal tipicamente hipertenso de um padrão próximo da normalidade de pressão arterial e massa cardíaca apresentada pelos animais Wistar (BELL et al., 2004; BERTAGNOLLI et al., 2014).

Outro monoterpreno, o β -Pinoeno, quando complexado com β -CD, foi capaz de reduzir significativamente a pressão arterial média às 36h e 48h quando comparado ao β -Pinoeno livre em um modelo de hipertensão induzida por L-NAME (MOREIRA et al., 2016), uma das diferenças de nosso estudo é que avaliamos animais essencialmente hipertensos. Na literatura, não há relatos de administração crônica de LIN/ β -CD ou LIN, assim como seus efeitos diretos no tecido cardíaco, o que torna nossos resultados ainda mais interessantes. Ademais, as alterações vasculares (RIZZONI et al., 1994; SCHIFFRIN, 2012) e cardíacas (MOTHÉ et al., 2005; ROLOFF et al., 2018) apresentadas pelos SHR com o passar do tempo, como modificações estruturais em cardiomiócitos que se iniciam por volta das 16 semanas de vida em SHR (BELL et al., 2004) são sugestivas à hipertrofia, dados estes que foram observados após realização de ensaios histológicos com coração e artéria aorta dos ratos tratados.

Após laudo emitido por patologista, as artérias e corações demonstraram que o tratamento com LIN/ β -CD não altera ou modifica a morfologia cardíaca, uma vez que os corações apresentaram fibras musculares de ramificações habituais, citoplasma estriado e núcleos ovoides centrais e regulares. Não foram observadas alterações nos miócitos que caracterizassem hipertrofia cardíaca em nenhum dos grupos examinados; já com relação às artérias avaliadas os grupos apresentaram resultados muito semelhantes nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina assim como picrossírius, sendo que em nenhuma das amostras, foi observado espessamento fibroso da camada

íntima, infiltrado inflamatório, hiperplasia da camada média ou deposição de colágeno em qualquer grau, alterações que denotariam dano vascular por hipertensão (RIZZONI et al., 1994; SCHIFFRIN, 2012).

Os dados histopatológicos entre animais wistar e SHR no nosso estudo estão de encontro aos observados na literatura, pelo menos no que diz respeito a deposição de colágeno e hipertrofia nos animais hipertensos comparados a normotensos (ANISHCHENKO et al., 2015; DINIZ et al., 2011; MOTHÉ et al., 2005). Não sabemos destacar por qual motivo observamos tal diferença nos tecidos cardíacos uma vez que os animais SHR tinham comprovadamente níveis pressóricos e índice de massa cardíaca aumentados, o que caracterizaria o modelo animal como também hipertrófico cardíaco. Vale salientar que os compostos testados não modificaram o aspecto estrutural vascular ou cardíaco.

Em contrapartida, a hipertensão é uma condição inflamatória em que muitos mediadores e reguladores de imunidade estão invariavelmente alterados. A família das interleucinas é de extrema importância no estudo da gravidade e cronicidade da resposta imune e inflamatória (DALEKOS, ELISAF, BAIRAKTARI, TSOLAS e SIAMOPOULOS, 1997; SHI et al., 2011) sendo que há décadas já se apresentam evidências científicas de que a produção excessiva de IL-1 β ocorre no estado hipertensivo, de modo a tornar-se fator de risco para doenças cardiovasculares (DALEKOS et al., 1997; MOON et al., 2013). Além disso, uma resposta inflamatória na hipertensão é caracterizada por um aumento periférico e central em várias citocinas pró-inflamatórias, em particular, TNF- α e IL-1 β (DANGE, AGARWAL, TERUYAMA e FRANCIS, 2015; SHI et al., 2011). As citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, podem aumentar sua produção por indução em vários mecanismos de sinalização (DANGE et al., 2015; MATASSOLI et al., 2018).

Com base nisso, hipotetizamos que as citocinas circulantes na corrente sanguínea dos animais poderiam ser alteradas quando estes fossem submetidos ao tratamento subcrônico com LIN e LIN/ β -CD e que a forma complexada apresentaria efeitos potencializados. Já foram descritos na literatura experimentos que demonstraram a atividade anti-inflamatória de linalol de modo satisfatório, principalmente em modelo de lesão pulmonar de camundongo, com diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como

TNF- α e IL-6 (PEANA et al., 2004). Assim sendo, o tratamento com LIN/ β -CD por 21 dias foi capaz de aumentar consideravelmente os níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória clássica, com apresentação estatisticamente superior no grupo tratado com o LIN/ β -CD em comparação com o grupo o veículo e LIN puro, sugerindo uma resposta anti-inflamatória do linalol quando incluso no complexo em β -CD, com efeito biológico superior ao LIN.

É largamente difundido na literatura que o estado hipertensivo altera as conformações estruturais e funcionais do endotélio vascular (MULVANY, 2011, 2012; REHO et al., 2014; RIZZONI et al., 1994; SCHIFFRIN, 2012), produto do quadro de estresse constante e inflamação que são submetidas às artérias (QIU et al., 2014; RIZZONI et al., 1994). No estudo de (ANJOS et al., 2013), realizado com a mistura racêmica de LIN, foi demonstrado que (\pm)-linalol induziu vasorelaxamento em anéis mesentéricos de ratos, de maneira independente de endotélio vascular. Já em aorta isolada de camundongos, foi observado que o (-)-linalol promove relaxamento dependente de fatores derivados do endotélio, tal como o óxido nítrico, sendo que a ação de linalol estaria relacionada à ativação da guanilil ciclase solúvel (GCs) e de canais para potássio (K⁺) (KANG e SEOL, 2015).

A partir destes dados, e conhecendo-se a importância da resistência vascular periférica na regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo (QIU et al., 2014; REHO et al., 2014) realizamos testes de reatividade vascular em artéria mesentérica de ratos que revelaram que o pré-tratamento subcrônico com LIN/ β -CD na dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir a reatividade e contração vascular induzida por Phe em artéria mesentérica isolada do SHR, um achado que não foi relatado até então na literatura. Adicionalmente demonstramos que, diferentemente do complexo LIN/ β -CD, o linalol puro, após 21 dias, não alterou significativamente a contração induzida pela Phe. Tais achados com diminuição da sensibilidade a agentes vasocontratantes como a Phe (KALEA, CLARK, SCHUSCHKE, KRISTO e KLIMIS-ZACAS, 2010) tornam ainda mais evidente a ação do LIN/ β -CD na resistência vascular periférica, o que pode contribuir para a ação anti-hipertensiva de linalol.

Já com relação ao tratamento realizado por 60 dias, houve redução estatisticamente significativa da reatividade vascular à Phe com relação ao grupo LIN quando comparado ao grupo veículo e principalmente no que diz

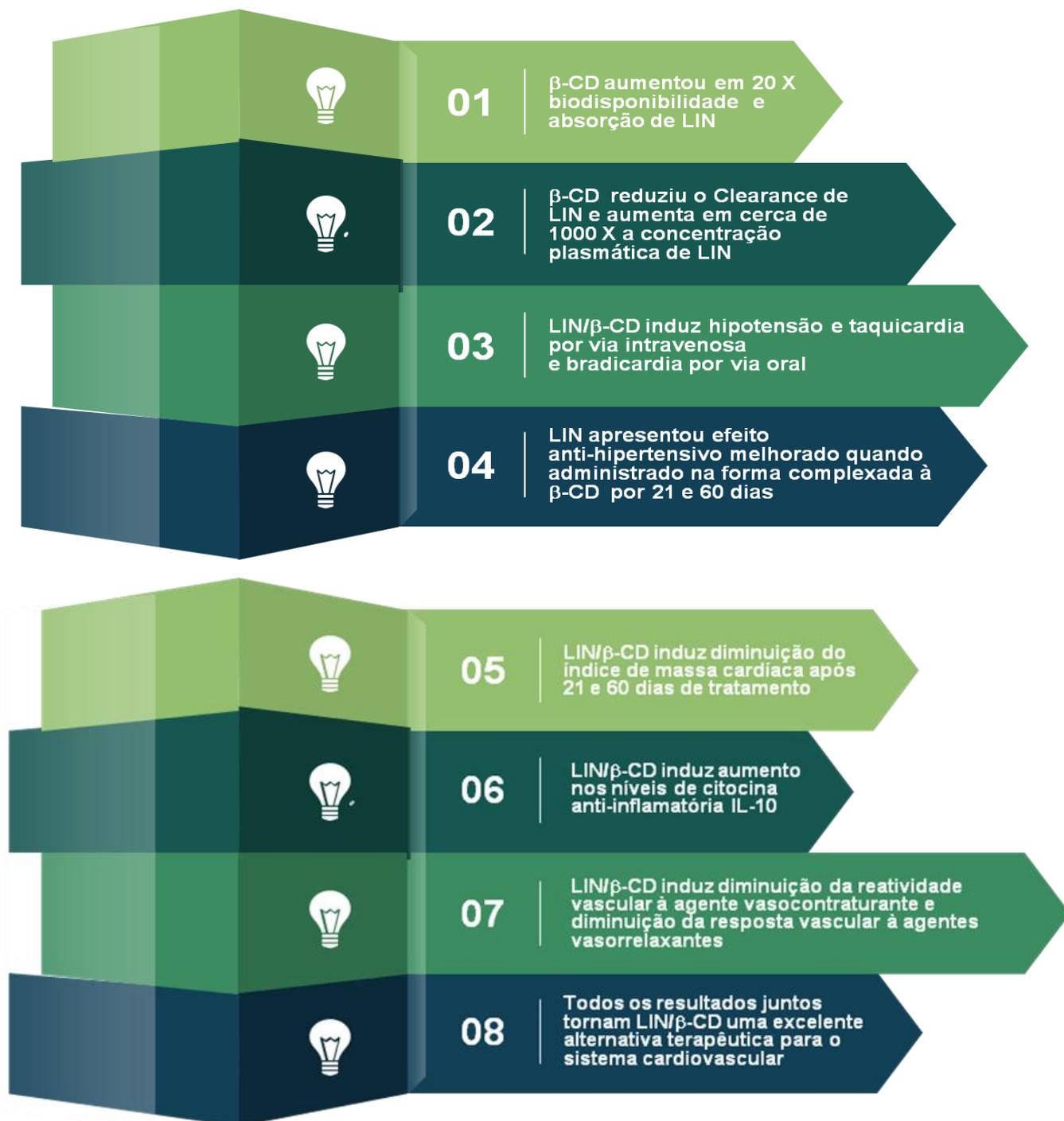
respeito à LIN/ β -CD, que apresentou efeito mais potente na redução à contração induzida por Phe, sugerindo que o tratamento crônico com LIN/ β -CD, foi capaz de diminuir a reatividade à agente vasocontratante, o que pode ser benéfico no controle e modulação da pressão sanguínea. É de conhecimento científico que os doadores de óxido nítrico promovem a redução do tônus miogênico (KALEA et al., 2010) em artérias de ratos, com grande seletividade para este tipo de tecido (AJAY e MUSTAFA, 2006; KALEA et al., 2010) e seu mecanismo parece envolver ativação de canais para potássio dependentes de cálcio (ZHAO, VANHOUTTE e LEUNG, 2015).

Quando falamos no sistema cardiovascular (BOHLEN, 2015) ou ainda no estado hipertensivo há alteração destas vias seja na síntese ou após liberação de NO, assim como na sequência da sua cascata de ativação de PKG e posterior desregulação, considerando que a disfunção endotelial não resulta simplesmente de uma diminuição da produção de NO pela eNOS, mas também pode envolver uma combinação complexa de disponibilidade reduzida de L-arginina, disfunção enzimática e degradação aumentada com alterações na biodisponibilidade (FARAH, MICHEL, e BALLIGAND 2018; QIU et al., 2014; ZHAO et al., 2015). As alterações vasculares sofridas por enfermidades como a hipertensão alteram a síntese e liberação de óxido Nítrico (FALCONER et al., 2018; RIZZONI et al., 1994).

O tratamento com LIN/ β -CD em experimentos com nitropussiato de sódio, conhecido doador de óxido nítrico, após 60 dias de tratamento, apresentou deslocamento da curva farmacológica para a esquerda, demonstrando diferença estatística quando comparado ao grupo veículo e também mais potente do que o grupo LIN. Em experimentos com endotélio funcional, a adição de ACh demonstrou que o grupo de Wistar, apresenta mais sensibilidade à este agente vasorelaxante, quando comparado ao grupo SHR veículo dado amplamente discutido na literatura (LUSCHER e PAUL, 1989; ZOU, LEUNG e VANHOUTTE, 2012), e quando observamos o grupo LIN/ β -CD também é possível observar que a curva farmacológica foi deslocada para a esquerda, demonstrando aumento do efeito vasorrelaxante com diferença estatisticamente significativa quando comparamos aos grupos veículo e LIN. Diante de todos os resultados expostos, torna-se possível traçar algumas conclusões com nossos experimentos.

9 CONCLUSÃO

A partir de todos os estudos *in vivo* e *in vitro* realizados e dos resultados alcançados em associação, LIN/ β -CD possui um potencial efeito anti-hipertensivo em animais SHR superior ao LIN e novos estudos devem ser realizados para melhor elucidar seus efeitos, assim como tornar possivelmente viável o tratamento em seres humanos hipertensos.



REFERÊNCIAS

ADEOYE, O.; CABRAL-MARQUES, H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery : A mini review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 521–531, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.050>

AJAY, M.; MUSTAFA, M. R. Effects of ascorbic acid on impaired vascular reactivity in aortas isolated from age-matched hypertensive and diabetic rats. **Vascular Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 127–133, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.05.001>

ALVIANO, W. S. *et al.* Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 101–105, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x>

ANISHCHENKO, A. M. *et al.* Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in shr rats during the development of arterial hypertension. **General Pathology and Pathophysiology** v. 159, n. 5, p. 591–592, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3020-8>

ANJOS, P. J. C. *et al.* Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 68, n. 5–6, p. 181–190, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2013-5-603>

AZEVEDO, M. M. B. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxycalamenene-rich essential oils from Croton cajucara benth. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1128–1137, 2013.

BATISTA, P. A. *et al.* Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience Letters**, v. 440, n. 3, p. 299–303, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.092>

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial, BATLOUNI, Michel. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328–338, 2001.

BELL, D. *et al.* Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. **Cardiovascular Pathology**, v. 13, p. 71–78, 2004.

BERTAGNOLLI, M. *et al.* An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. **Peptides**, v. 51, p. 65–73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.11.006>

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; PADUKKA, I. Encapsulation of lemon oil by paste method using β -cyclodextrin: Encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5194–5197, 1999.. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf9902503>

BOHLEN, H. G. Nitric Oxide and the Cardiovascular System. **Comprehensive Physiology**, v. 5, p. 803–828, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c140052>

CAMARGO, S. B.; DE VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v13i3.12949>

CAMARGO, S. B. *et al.* Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochemical Pharmacology**, v. 151, p. 38–46, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.014>

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 30–40, 2001.

CEBORSKA, M. *et al.* Interactions with β -cyclodextrin as a way for encapsulation and separation of camphene and fenchene. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n 1, p. 110–114, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.072>

COELHO, V. *et al.* Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n 4, p. 876–880, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0751-6>

DALEKOS, G. N. *et al.* Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 129, n. 3, p. 300-308,1997.

DANGE, R.B. *et al.* Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular

nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 31, 2015.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E.. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. 3, v. 12, p. 1023–1035, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1576>

DE AZEVEDO, M. de B. M. *et al.* New formulation of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1005–16, 2011. Disponível: <https://doi.org/10.2147/IJN.S18999>

DE SIQUEIRA, R. J. *et al.* Linalool-rich rosewood oil induces vago-vagal bradycardic and depressor reflex in rats. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 1, p. 42–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.4953>

DE SOUZA, S.Q.J. *et al.* Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436–440, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.009>

DICKHOUT, J.G.; LEE, R.M.K.W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 274, n. 3, p. H794-H800, 1998.

DINIZ, T.G. *et al.* Morphometry of the collagen fibers in healthy and diabetic rats treated with vitamin C. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1-6, 2011.

DUCHÊNE, D.; BOCHOT, A. Thirty years with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 58–72, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030>

ESH / ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the ESH and of the ESC. **European Society of Hypertension and European Society of Cardiology**, v. 31, n. 7, p. 1281-1357, 2013.

FALCONER, D., *et al.* Nitric oxide donors for peripheral artery disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 39, p. 77–85, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.02.009>

FARAH, C.; MICHEL, L.Y.M; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292, 2018.

FAZAN, V.P.S. *et al.* Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias

periféricas. **Medicina**, v. 39, n. 1, p. 39–50, 2006.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.
Monoterpenes with analgesic activity - a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013.

HELDWEIN, C.G. *et al.* S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 6, p. 621–629, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vaa.12146>

HÖFERL, M.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. **Planta Medica**, v. 72, n. 13, p. 1188-1192, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-947202>

JIANXIANG Z.; Peter X. M. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>

AZEREDO, F.J.; DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: current status and future directions. **Clinical pharmacokinetics**, v. 53, n. 3, p. 205-212, 2014.

KAISER, M. *et al.* Pre-clinical pharmacokinetics evaluation of an anticonvulsant candidate benzaldehyde semicarbazone free and included in β -cyclodextrin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 39, n. 5, p. 355-362, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.01.003>

KALEA, A. Z., Dietary enrichment with wild blueberries (*Vaccinium angustifolium*) affects the vascular reactivity in the aorta of young spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.09.005>

KANG, P., SEOL, G. H. KANG, Purum; SEOL, Geun Hee. Linalool elicits vasorelaxation of mouse aortae through activation of guanylyl cyclase and K⁺ channels. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 714-719, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jphp.12359>

KFOURY, M. *et al.* Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 129–143, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0783-y>

KURODA, K., *et al.* Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood

states. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 2–3, p. 107–114, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00421-005-1402-8>

LAPCZYNSKI, A.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Addendum to fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S190–S192, 2008.

LIMA, P. *et al.* Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>

LINCK, V.D.M. *et al.* Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 303–307. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.001>

LINCK, V.M. *et al.* Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 679–683, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.002>

LOCCI, E. *et al.* ¹³C-CPMAS and ¹H-NMR study of the inclusion complexes of β-cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide. **Chemistry and Biodiversity**, v. 1, n. 9, p. 1354–1366, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490098>

LODAGEKAR, A., *et al.* Formulation and evaluation of cyclodextrin complexes for improved anticancer activity of repurposed drug: Niclosamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 212, p. 252–259, 2019. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.041>

LUSCHER, T. F.; PAUL, M. Endothelium-Dependent Contractions to Acetylcholine in the Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. **Hypertension**, v. 8, p. 344–348, 1989.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>

MATASSOLI, F.L., *et al.* Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Reduces Inflammatory Signaling from Monocytes: Possible Implications for Suppression of HIV Chronic Immune Activation. **MSphere**, v. 3, n. 6, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msphere.00497-18>

MCDOUGALL, S.J. *et al.* Restraint Stress: Differential Cardiovascular Responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats.

Hypertension, v. 35, n. 1, p. 126–129, 2000.

MENDONC, R.R., *et al.* Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from. **Society**, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, 2003.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.1895>

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

MENEZES, P. P. *et al.* Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2429-2437, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3367-x>

MENEZES, P.P. *et al.* Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.

MOON, P.D. *et al.* Inhibitory effects of biryuche-bang on mast cell-mediated allergic reactions and inflammatory cytokines production. **The American journal of Chinese medicine**, v. 41, n. 06, p. 1267-1282, 2013.

MOREIRA, I. *et al.* Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- β -pinene in β -cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 837-845, 2016.

MORIWAKI, C. *et al.* Production, purification and performance improve of cyclodextrin glycosyl transferases to cyclodextrins production. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2360-2366, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900024>

MOTHÉ, C.G. *et al.* Thermal behavior of the heart of SHR and wistar rats. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, n. 2, p. 429-433, 2005.

Mulvany, M.J. Small artery remodelling in hypertension. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 49–55, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00758.x>

NASCIMENTO, S.S. *et al.* Linalool and linalool complexed in β -cyclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increase Fos protein expression in animal model for fibromyalgia. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 10, p. 935-942, 2014.

NUMANOĞLU, U. *et al.* Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. **Aaps Pharmscitech**, v. 8, n. 4, p. 34-42, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/pt0804085>

ORGANIZATION WORLD HEALTH. A global brief on Hypertension, 2013.

Retrieved from:

http://ish-world.com/downloads/pdf/global_brief_hypertension.pdf

PADUCH, R. *et al.* Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1096-1107, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1103753>

PEANA, A. T., *et al.* PEANA, Alessandra T. *et al.* (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European journal of pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 37-41, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02856-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02856-X)

PEANA, A. T., *et al.* Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n 3, p. 279–284, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.006>

PEANA, A. T., *et al.* (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, n 7, p. 719–723, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.065>

PEETERS, A.C.T.M. *et al.* Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. **European journal of clinical investigation**, v. 31, n. 1, p. 31-36, 2001.

PICCINI, R.X. *et al.* Promoção, prevenção e cuidado da hipertensão arterial no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 3, p. 543-550, 2012.

PICON, R.V. *et al.* Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis. **PLOS one**, v. 7, n. 10, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048255>

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>

QIU, J. *et al.* Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: from in vitro to in vivo understanding. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 90, p. 20130852, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0852>

QUINTANS-JÚNIOR, L.J. *et al.* β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces

antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 167–172, 2013. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12087>

RAJESWARI, C. *et al.* Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech an Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 6, n. 2, p. 329–357, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>

RAKMAI, J. *et al.* Encapsulation of Essential Oils by Cyclodextrins: Characterization and Evaluation. **Cyclodextrin: A Versatile Ingredient**, p. 263, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.73589>

REHO, J.J.; ZHENG, X.; FISHER, S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 2, H163–H172. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00493.2013>

RIBEIRO, T. P. Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 811–816, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05383.x>

RIZZONI, D. *et al.* Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. **American journal of hypertension**, v. 7, n. 2, p. 193-200, 1994.

ROBLES CABRERA, A. *et al.* Los barorreflejos arteriales cardiovagal, cardiosimpático y vasosimpático y el control neural de la presión arterial a corto plazo. **Revista Neurología**, v. 59, n. 11, p. 508-16, 2014.

ROLOFF, E.L. *et al.* Differences in autonomic innervation to the vertebrobasilar arteries in spontaneously hypertensive and Wistar rats, **The Journal of physiology**, v. 16, p. 3505–3529, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/JP275973>

SANTOS, M.R.V., *et al.* Cardiovascular effects of monoterpenes: A review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764–771, 2011. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000119>

SCHIFFRIN, E.L. Excellence Award in Hypertension Research Vascular Remodeling in Hypertension Mechanisms and Treatment. **Hypertension**, p. 367–374, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021>

SERAFINI, M.R. Interaction of p-cymene with b-cyclodextrin. **Journal of**

Thermal Analysis and Calorimetry, v. 109, n. 2, p. 951–955, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s10973-011-1736-x>

SETO, S. W. et al. Impaired acetylcholine-induced endothelium-dependent aortic relaxation by caveolin-1 in angiotensin II-infused apolipoprotein-E (ApoE-/-) knockout mice. **PloS One**, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058481>

SHARKEY, T. D.; WIBERLEY, A. E.; DONOHUE, A. R. Isoprene emission from plants: Why and how. **Annals of Botany**, v. 101, n. 1, p. 5–18, 2008.
Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm240>

SHI, F. et al. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 10, p. 2320-2328, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1155630>

SHI, P. et al. Brain Microglial Cytokines in Neurogenic Hypertension. **NIH Public Access**, v. 56, n. 2, p. 297–303, 2011.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150409.Brain>

SIMÕES, L.O. et al. Evidences of antihypertensive potential of extract from *Solanum capsicoides* All. in spontaneously hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p. 498-508, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.020>

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, n. 1–3, p. 293–299, 1998.
Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00639-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00639-9)

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1825–1845, 2004. Disponível em:
<https://doi.org/10.1351/pac200476101825>

TANASE, D.M. et al. Arterial Hypertension and Interleukins: Potential Therapeutic Target or Future Diagnostic Marker?. **International Journal of Hypertension**, v. 2019, 2019.

TRINDADE, G.G. et al. Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 198–209, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.003>

WEBER, F.; ANLAUF, M. Therapieresistente hypertonie - Diagnostik und

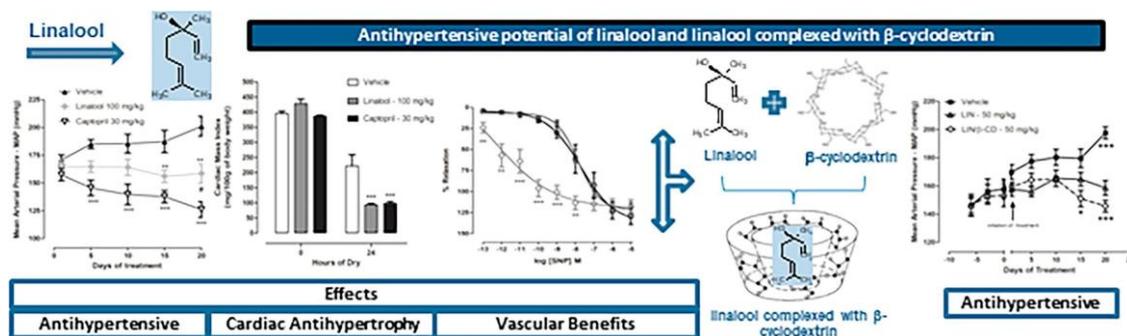
konservative therapieoptionen. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 111, n. 25, p. 425–431, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0425>

WYNNE B.M. et al. Mesenteric arteries from spontaneously hypertensive stroke prone rats exhibit an increase in NO-dependent vasorelaxation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 8, p.1–37, 2018.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P.M.; LEUNG, S.W.S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZOU, Q.; LEUNG, S.W.S.; VANHOUTTE, P.M. Activation of nicotinic receptors can contribute to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in the rat aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, n. 3, p. 756-763, 2012.

ANEXOS



ScienceDirect

Journals & Books



Get Access

Share

Export

Outline

Abstract

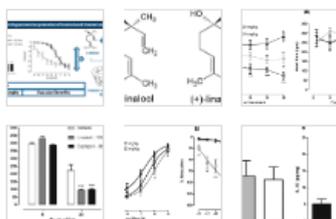
Graphical abstract

Keywords

1. Introduction
 2. Materials and methods
 3. Results
 4. Discussion
- Acknowledgments
- References

Show full outline

Figures (8)



Show all figures



Biochemical Pharmacology

Volume 151, May 2018, Pages 38-46



Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity

Samuel Barbosa Camargo ^a, Letícia Oliveira Simões ^a, Carla Fiana de Azevedo Medeiros ^a, Anderson de Melo Jesus ^a, Josmara Bartolomei Fregoneze ^b, Afrânio Evangelista ^c, Cristiane Flora Villarreal ^c, Adriano Antunes de Souza Araújo ^d, Lucindo José Quintans-Júnior ^d, Darizy Flavia Silva ^a

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.014>

Get rights and content

Abstract

Linalool (LIN) is a **monoterpene** alcohol present in some aromatic medicinal plants with biological activities that can impact cardiovascular diseases. This chemical class is highly volatile and β -cyclodextrin (β -CD) has been employed to improve the pharmacological properties of monoterpenes. Thus, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular effects of LIN free focusing on the antihypertensive

Drugs- β -Cyclodextrin inclusion complex: Would be a new strategy to improve Antihypertensive Therapy?

Quiara Lovatti Alves, Samuel Barbosa Camargo, Rafael Leone Cruz de Jesus and Darizy Flávia Silva*

Laboratory of Cardiovascular Physiology and Pharmacology, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

Abstract

Taking into account the increasing use of cyclodextrins (CDs) to overcome drawbacks of drugs like antihypertensive, complex formation with CDs seems to be a good pharmaceutical strategy to improve stability, solubility, bioavailability and reduction of side effects, thus facilitating the control of hypertension. The main objective of this short communication is to demonstrate the antihypertensive potential of complexed compounds with β -cyclodextrins and their clinical applications. This short communication identified and illustrated that β -cyclodextrin-based systems are promising sources that provide improved pharmacokinetic and formulation conditions, and important applications have been established by many research groups, optimizing β -CDs derivative systems for oral drug therapy, especially in hypertension.

Introduction

Cyclodextrins (CDs) are a family of cyclic oligosaccharides that have been largely studied and used industrially in pharmaceutical applications, due the fact they are able to form inclusion complexes with poorly water-soluble drugs and improve a variety of drug properties, such as stability, dissolution rate, solubility, bioavailability and reduction of side effects [1-3]. CDs are composed of at least 6D-(*) glucopyranose units attached by α -(1, 4) glucosidic bonds that differ in their ring size and solubility [4]. There are 3 important subtypes that naturally occur: α -CD, β -CD, and γ -CD with 6, 7 and 8 glucopyranoside units respectively [4]. They became scientifically attractive due to their application potential and important impact in hypertensive therapy. The most antihypertensive drugs are orally administered [5] and according the Biopharmaceutical Classification System (BCS) there are two important parameters that control rate and extent of drug absorption. These include drug dissolution and gastrointestinal permeability, which are considered the variables that most affecting drug bioavailability [6]. Many antihypertensive drugs are classified by BCS, in different classes, including: low solubility and high permeability characteristics after oral administration (class II), high solubility and low permeability (class III) and low solubility and permeability (class IV) [6-8]. Furthermore, controlled-release formulations of some antihypertensive drugs are unstable both *in vivo* and *in vitro* when administered orally [9], thus resulting in a lack of suitable specific antihypertensive formulations, especially for pediatric patients [10]. Taking this into account, CDs have been used to circumvent these limitations, and forming complexes with antihypertensives and CDs is a promising pharmaceutical strategy to facilitate the management of hypertension. Thus, the main objective of this short communication is to demonstrate the antihypertensive potential of compounds complexed with β -cyclodextrins and their clinical applications.

Applications of β -CD in Hypertension Treatment

For many drugs, the cavity size of α -CDs is unsatisfactory while γ -CDs is more expensive. The β -CDs has been extensively used for

its immediate availability and cavity size suitable for a wide range of medications. Despite this, the use of β -CDs is limited due to low solubility in water and nephrotoxicity, especially in parenteral preparations [11]. However, when administered orally, cyclodextrins are considered safe and void of toxicity, as well as low bioavailable [12] and therefore is not sufficiently absorbed into the gastrointestinal system [13]. After the discovery of β -CD's promising properties, it was possible to study new formulations for antihypertensive drugs. Although few studies have assessed the inclusion complexes of drugs with β -CD in cardiovascular diseases, our group demonstrated that linalool, a vasodilator [14] and hypotensive monoterpene [15], complexed with β -CD promoted a significant decrease in the mean arterial pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) when compared to the non-complexed form, an effect that may be related to the increased stability and bioavailability afforded by β -CD [16]. Another monoterpene, β -Pinene, when complexed with β -CD significantly reduced mean arterial pressure when compared to free β -Pinene in a model of hypertension induced by L-NAME. Thus, β -Pinene complex formation with β -CD improved the pharmacological profile of this monoterpene [17].

An important derivative of β -CD is methyl- β -cyclodextrin (M- β -CD), a cholesterol binding agent. Cardiovascular studies performed in apolipoprotein E (ApoE2/2) deficient mice, where infusing angiotensin II (Ang II) promotes atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm, and in this model, an increase in blood pressure has been reported. Isolated aortas from Ang II-infused mice were significantly less responsive to acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation when compared to aortas infused with vehicle control. Pre-incubation with M- β -CD in isolated aortic rings from this animals,

*Correspondence to: Darizy Flávia Silva, PhD, Laboratory of Cardiovascular Physiology and Pharmacology, Federal University of Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, Vale do Canela, 40110-902 Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: darizy@gmail.com

Received: July 09, 2019; Accepted: August 01, 2019; Published: August 05, 2019