



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAISA GOMES DA SILVA**

**EFEITOS SOBRE PERFIL ANTIOXIDANTE E REATIVIDADE VASCULAR  
INDUZIDOS POR UMA MANTEIGA OBTIDA DAS SEMENTES DE *Platonia insignis*  
Mart. EM MODELO DE HIPERTENSÃO L-NAME EM RATAS**

**PARNAÍBA  
2019**

MAISA GOMES DA SILVA

**EFEITOS SOBRE PERFIL ANTIOXIDANTE E REATIVIDADE VASCULAR  
INDUZIDOS POR UMA MANTEIGA OBTIDA DAS SEMENTES DE *Platonia insignis*  
Mart. EM MODELO DE HIPERTENSÃO L-NAME EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular Aplicada à Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

**PARNAÍBA  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva, Maisa Gomes da  
Efeitos sobre perfil antioxidante e reatividade vascular induzido por uma manteiga obtida das sementes de *Platonia insignis* Mart. em modelo de hipertensão L-NAME em ratas [recurso eletrônico] / Maisa Gomes da Silva. – 2019.  
1 Arquivo em PDF  
  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Campus CMRV, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Daniel Rufino Dias Arcanjo.  
  
1. Bacuri. 2. L-NAME. 3. Estresse Oxidativo. 4. Hipertensão. 5. Reatividade Vascular. I. Título.

CDD: 616.1

MAISA GOMES DA SILVA

**EFEITOS SOBRE PERFIL ANTIOXIDANTE E REATIVIDADE VASCULAR  
INDUZIDOS POR UMA MANTEIGA OBTIDA DAS SEMENTES DE *Platonia insignis*  
Mart. EM MODELO DE HIPERTENSÃO L-NAME EM RATAS**

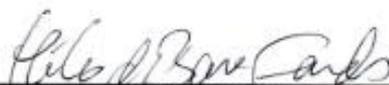
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.  
Aprovada em: 04 de Novembro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**



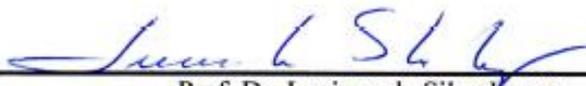
---

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo  
Universidade Federal do Piauí  
(Presidente/Orientador)



---

Prof. Dr. Hélio de Barros Fernandes  
Universidade Federal do Piauí  
(Membro externo)



---

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes  
Universidade Federal do Piauí  
(Membro externo)

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITORA**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITORA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

**COORDENADOR DE PROGRAMAS *STRICTO SENSU***

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva

**DIRETOR DO CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO**

Prof. Dr. Alexandro Marinho Oliveira

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros

# *Dedicatória*

*“Aos meu Orientador, Daniel Dias Rufino Arcanjo,  
grande colaborador e incentivador de seus alunos”.*

# *Agradecimentos*

*Diferentemente da graduação, o mestrado tem um pouco de solidão. Não se tem mais o convívio com os jovens colegas de curso, o que se tem são profissionais que se dividem entre o emprego, a família e os estudos em horas intermináveis dentro de um laboratório, onde o silêncio, um abraço ao final de cada experimento mal sucedido, um doce, uma passadinha pra saber como estão as coisas, significam muito.*

*Em Eclesiastes 3:1 diz que “Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu”. O dia de hoje, encerra mais um ciclo da minha existência e não poderia concluí-lo sem agradecer aqueles que estiveram ao meu lado nessa curta etapa, afinal, como passaram-se rápido esse dois anos!*

*Aos meus Pais (**Oziel e Iranilde**) pelo amor, incetivo e paciência. Parte do que sou e do que tenho são frutos das horas de dedicação, amor e disciplina que vocês me deram.*

*Ao meu esposo (**Tiago**), pela compreensão dos dias ausentes, pelas palavras de ânimo nos dias difíceis, por aquele abraço apertado ao final de um dia exaustivos de testes. Como é bom ter você ao meu lado para dividir esses momentos!*

*À minha irmã (**Maeli**), pela amizade e companheirismo. Foi com você que aprendi a dividir e compartilhar as coisas de valor;*

*Aos familiares e amigos, pelas orações e palavras de afeto, pois elas me fortaleceram durante esta caminhada;*

*Ao estimado **LINT** (Laboratório Interdisciplinar de Neurociências e Toxicologia) onde a maior parte desta pesquisa foi desenvolvida. Sem a força, dedicação, compromisso e companheirismo desse grupo (Daniel Arcanjo, Angélica Coelho, Isadora Basílio, Mariely Mendes, Andressa Amorim, Izabel Barros, Ana Victória Mendes, Ana Karoline) esse trabalho não seria possível. Vocês foram fundamentais para a construção desse projeto!*

*Ao meu orientador, mestre e amigo, **Daniel Arcanjo**, por toda dedicação e paciência. Por nos ensinar além de interpretar e compreender nossos resultados, por respeitar nossas individualidades, por nos fazer refletir sobre a importância daquilo que fazemos, por ser nosso exemplo profissional. Obrigada!*

*À Universidade Federal do Piauí (**UFPI**) na pessoa de seus funcionários (Gestores, Professores, Técnicos e Terceirizados) por toda ajuda e infraestrutura necessárias para a construção desse projeto.*

*À banca avaliadora composta pelos professores **Dr. Luciano Lopes e Dr. Helio Fernandes**, por aceitarem o nosso convite, contribuindo assim para o amadurecimento deste trabalho e da minha formação.*

*Por fim, agradeço ao meu **Deus**, por ter me sustentado com amor e disciplina por mais esta caminhada, pois o caminho exigiu esforço, renúncia, dedicação... Cuidaste de cada detalhe para que este dia fosse possível e de grande valor!*

# *Epigrafe*

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante” (O Pequeno Príncipe)*

SILVA, M. G. Efeitos sobre perfil antioxidante e reatividade Vascular induzidos por uma manteiga obtida das sementes de *Platonia insignis* Mart. em modelo de hipertensão L-NAME em ratas. 2019.2. 91f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Campus Ministro Reis Velloso. Universidade Federal do Piauí, Parnaíba-PI, 2019.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte em todo o mundo. Diante deste contexto, a utilização de produtos naturais vem apresentando-se como uma importante fonte de bioprodutos com potenciais aplicações terapêuticas. Na busca por compostos biologicamente ativos da família Clusiaceae, a espécie *Platonia insignis* Mart., conhecida popularmente como “bacuri”, tem demonstrado efeito vasorrelaxante, antioxidante e hipotensor *in vivo*, evidenciando sua promissora aplicação no desenvolvimento de produtos para o tratamento de doenças cardiovasculares envolvendo estresse oxidativo. Assim, o objetivo desse trabalho é investigar os efeitos toxicológicos, antioxidantes e vasorrelaxante de uma manteiga industrializada obtida das sementes de *Platonia insignis* Mart. (MIB), através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, para potencial aplicação no tratamento da hipertensão. A atividade citotóxica foi inicialmente realizada através do ensaio do MTT em macrófagos murinos e em eritrócitos de sangue de carneiro. No presente estudo, observou-se uma redução da viabilidade celular por avaliação da atividade mitocondrial de modo dependente de concentração, com valor de concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) igual a 124,036 µg/ml e na atividade hemolítica, registrou-se uma baixa citotoxicidade uma vez que a MIB promoveu menos de 10% de hemólise na concentração mais alta testada (800 µg/ml), não sendo possível determinar a concentração hemolítica média. Posteriormente realizaram-se ensaios antioxidantes *in vitro*, avaliando os efeitos da MIB na formação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitrito (NO<sub>2</sub>) e radical hidroxila (HO<sup>•</sup>). Em todos os ensaios, a MIB apresentou atividade antioxidante equipotente quando comparada ao controle positivo. Em seguida, a avaliação toxicológica aguda oral *in vivo* foi realizada através do Teste de Dose Fixa (Diretriz OECD nº 420, 2000), com modificações. Não foram observadas mortes ou alterações nos parâmetros clínicos e comportamentais avaliados, assim como nos parâmetros bioquímicos séricos, no peso e na avaliação macroscópica dos órgãos. Adiante, avaliou-se a responsividade *ex vivo* de preparações de artéria aorta à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) após o tratamento subagudo (7 dias) com MIB (25, 50 e 100 mg/kg) em ratas submetidas à hipertensão induzida por L-NAME (50 mg/kg·dia, por 21 dias). As preparações de aorta dos animais tratados com a MIB na dose de 25 mg/kg apresentaram maior reatividade à acetilcolina, mas não intensificaram a resposta do vaso ao NPS em comparação com o grupo controle hipertenso, instigando a necessidade de ensaios complementares. Nos ensaios antioxidantes *in vivo*, investigou-se os efeitos da MIB (25, 50 e 100 mg/kg) sobre os níveis de malondialdeído (MDA), glutatona reduzida (GSH), mieloperoxidase (MPO), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em eritrócitos ou plasma de ratas submetidas à hipertensão induzida por LNAME (50 mg/kg·dia, por 21 dias). Os resultados dos testes demonstram que houve uma redução significativa nos níveis de MDA e MPO e alterações relevantes do ponto de vista estatístico nos níveis de GSH e SOD dos animais hipertensos tratados com a MIB quando comparados com o controle hipertenso. Todos esses resultados ressaltam o imenso potencial terapêutico da MIB frente às doenças hipertensivas e ao estresse oxidativos correlacionado, abrindo caminho para o estudo de novos ramos terapêuticos no tratamento de indivíduos hipertensos.

**Palavras-Chave:** Bacuri. L-NAME. Estresse oxidativo. Hipertensão. Reatividade vascular.

SILVA, M. G. Effects on Antioxidant Profile and Vascular Reactivity induced by a butter obtained from *Platonia insignis* Mart. in a model of hypertension L-NAME in rats. 2019.2. 87f. Masters dissertation. Postgraduate Program in Biotechnology. Campus Minister Reis Velloso. Federal University of Piauí, Parnaíba-PI, 2019.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death worldwide. In this context, the use of natural products has been presented as an important source of bioproducts with potential therapeutic applications. In the search for biologically active compounds of the Clusiaceae family, *Platonia insignis* Mart., Popularly known as “bacuri”, has shown vasorelaxant, antioxidant and hypotensive effects *in vivo*, showing its promising application in the development of products for the treatment of cardiovascular diseases involving oxidative stress. Thus, the objective of this work is to investigate the toxicological, antioxidant and vasorelaxing effects of an industrialized butter obtained from *Platonia insignis* Mart seeds. (MIB), through *in vitro* and *in vivo* assays, for potential application in the treatment of hypertension. Cytotoxic activity was initially performed by MTT assay on murine macrophages and sheep blood erythrocytes. In the present study, a reduction in cell viability was observed by assessing concentration-dependent mitochondrial activity with a mean cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) of 124.036 µg/ml and a low cytotoxicity was observed in hemolytic activity. Since MIB promoted less than 10% hemolysis at the highest concentration tested (800 µg/ml), the mean hemolytic concentration could not be determined. Subsequently, *in vitro* antioxidant assays were performed to evaluate the effects of MIB on the formation of reactive thiobarbituric acid (TBARS), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydroxyl radical (HO<sup>·</sup>) species. In all assays, MIB showed equipotent antioxidant activity when compared to the positive control. Subsequently, acute oral toxicological evaluation *in vivo* was performed using the Fixed Dose Test (OECD Guideline 420, 2000), with modifications. No deaths or changes were observed in the clinical and behavioral parameters evaluated, as well as in serum biochemical parameters, weight and macroscopic evaluation of organs. Ahead, the *ex vivo* responsiveness of aortic artery preparations to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SPN) after subacute treatment (7 days) with MIB (25, 50 and 100 mg/kg) in rats subjected was evaluated. L-NAME-induced hypertension (50 mg/kg·day for 21 days). Aortic preparations of animals treated with MIB at 25 mg/kg showed higher reactivity to acetylcholine, but did not intensify the vessel response to SNP compared to the hypertensive control group, prompting the need for further trials. In the *in vivo* antioxidant assays, the effects of MIB (25, 50 and 100 mg/kg) on malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and catalase levels were investigated. (CAT) in erythrocytes or plasma of rats submitted to LNAME-induced hypertension (50 mg/kg · day for 21 days). Test results demonstrate that there was a significant reduction in MDA and MPO levels and a significant increase in GSH and SOD levels of hypertensive animals treated with MIB compared with hypertensive control. All these results underscore the immense therapeutic potential of MIB against hypertensive diseases and related oxidative stress, paving the way for the study of new therapeutic branches in the treatment of hypertensive individuals.

**Keywords:** Bacuri. L-NAME. Oxidative stress. Hypertension. Vascular Reactivity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Esquema Representativo das Principais Espécies Reativas.....	21
<b>Figura 2:</b> Esquema Representativo dos Principais Sistemas Antioxidantes .....	22
<b>Figura 3:</b> Esquema Representativo do Estresse Oxidativo.....	23
<b>Figura 4:</b> A interferência do estresse oxidativo no controle da Pressão Arterial .....	25
<b>Figura 5:</b> Reações e Transformações do ânion superóxido.....	26
<b>Figura 6:</b> <i>Platonia insignis</i> Mart. (A – Fruto Fechado, B- Fruto Aberto, C- Polpa, D- Semente Fechada, E- Semente Aberta). .....	29
<b>Figura 7:</b> Esquemática do teste de viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos frente a MBI.....	32
<b>Figura 8:</b> Esquemática do teste de atividade hemolítica da MIB em eritrócitos de sangue de carneiro. ....	33
<b>Figura 9:</b> Esquemática da avaliação dos efeitos in vitro da MIB contra a peroxidação lipídica. ....	34
<b>Figura 10:</b> Esquemática da avaliação dos efeitos in vitro do MIB contra a formação do radical hidroxila (OH•). ....	35
<b>Figura 11:</b> Esquemática da avaliação dos efeitos in vitro do MIB contra a formação de óxido nítrico (•NO).....	36
<b>Figura 12:</b> Esquema do teste de toxicidade aguda por via oral. ....	38
<b>Figura 13:</b> Esquema de pré-indução da hipertensão arterial pelo L-NAME em animais submetidos ao tratamento com a MIB para avaliação da atividade antioxidante e da reatividade vascular. ....	39
<b>Figura 14:</b> Diagrama esquemático de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos.....	40
<b>Figura 15:</b> A) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração-resposta à Phe; B) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração resposta à ACh ou NPS (Modificado de Peçanha, 2009) .....	41
<b>Figura 16:</b> Efeito citotóxico da MIB sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os resultados foram expressos como média ± EPM. **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle. ....	45
<b>Figura 17:</b> Atividade hemolítica da MIB em eritrócitos obtidos de sangue de carneiro. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando com grupo controle.....	47

<b>Figura 18:</b> Atividade Antioxidante da MIB pela reduções dos níveis de TBARS. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM.....	48
<b>Figura 19:</b> Atividade antioxidante da MIB pela remoção do radical hidroxila. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. ....	49
<b>Figura 20:</b> Atividade antioxidante da MIB pela inibição da produção do radical nitrito. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. ....	50
<b>Figura 21:</b> Evolução ponderal em gramas de ratas Wistar tratadas com veículo ou MIB (2,0 g/kg) por via oral. Dados representados por média $\pm$ EPM (n=5/grupo). ....	53
<b>Figura 22:</b> Curva concentração-resposta de acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-Name. *p<0,05 vs controle. Two-way ANOVA. ....	57
<b>Figura 23:</b> Efeito do Tratamento agudo com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg na resposta vasorelaxante da ACh em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-NAME. *p<0,05 vs hipertenso. Two way anova. ....	58
<b>Figura 24:</b> Curva concentração-resposta do Nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-Name. *p<0,05 vs controle. Two way anova .....	60
<b>Figura 25:</b> Efeito do Tratamento agudo com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg na resposta vasorelaxante do NPS em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-NAME. *p<0,05 vs hipertenso. Two way anova .....	60
<b>Figura 26:</b> Avaliação da atividade antioxidante da MIB no plasma de animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da capacidade protetora contra a lipoperoxidação de membrana. *p<0,05 vs LN. One-way ANOVA. ....	62
<b>Figura 27:</b> Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida plasmática de MPO. *p<0,05 vs LN. One-way ANOVA. ....	64
<b>Figura 28:</b> Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida de GSH eritrocitaria. *p<0,05 vs LN. One-way ANOVA .....	65
<b>Figura 29:</b> Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da SOD eritrocitaria. *p<0,05 vs LN. One-way ANOVA .....	66
<b>Figura 30:</b> Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da CAT eritrocitaria. *p<0,05 vs LN. One-way ANOVA.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sinais clínicos e comportamentais avaliados ao longo de 14 dias após a administração aguda da MIB (2,0 g/kg) e água destilada por via oral. ....	52
<b>Tabela 2:</b> Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos em ratas Wistar fêmeas tratadas com a MIB por via oral. Os valores representam à média $\pm$ EPM.....	54
<b>Tabela 3:</b> Peso médio relativo dos órgãos dos animais após 14 dias do tratamento agudo com veículo ou a MIB por via oral na dose de 2,0 g/kg. Os valores representam à média $\pm$ EPM. ....	55
<b>Tabela 4:</b> Avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratas Wistar hipertensas induzidas pelo L-NAME tratadas com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Os valores representam à média $\pm$ EPM.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E MEDIDAS

**AAPH** – Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)

**ACh** – Acetilcolina

**AcOEt** – Acetato de etila

**ALT**- Alanina aminotransferase

**Ang II** – Angiotensina II

**ANOVA**- Análise de Variância

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AST** - Aspartato aminotransferase

**AT1** – Receptor da Angiotensina II

**BBI** – Banha-manteiga de bacuri industrializada

**BBU**- Banha-manteiga de bacuri produzida na UFPI

**BHT** – Hidroxitolueno butilado

**CAT** – Catalase

**CC<sub>50</sub>**- Concentração Citotóxica Média

**CEEA**- Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CGAR-EM** – Cromatografia Gasosa de alta Resolução

**CH<sub>50</sub>** - Concentração Hemolítica Média

**CL<sub>50</sub>** - Concentração Letal Média

**CO<sub>2</sub>** – Ácido Carbônico

**DCNT** – Doenças Crônicas Não-Tranmissíveis

**DCV**- Doenças Cardiovasculares

**DL50**- Dose Letal Média

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EHSB** – Extrato Hexânico da Semente do Bacuri

**EHSB:βCD** – Complexo de Inclusão do Extrato Hexânico da Semente do Bacuri com β-ciclodextrina

**EDCF** – Fatores de Contração Derivado do Endotélio

**eNOS** – Oxido Nítrico Síntese endotelial

**EO** – Estresse oxidativo

**ER** – Espécies Reativas  
**ERO** - Espécies Reativas de Oxigênio  
**ERN** – Espécies Reativas de Nitrogênio  
**ET-1** – Endotelina - 1  
**FA**- Fosfatase alcalina  
**FBS** - Soro Fetal Bovino  
**FDA**- Food and Drug Administration  
**FeSO<sub>4</sub>** – Sulfato de Ferro  
**FR** – Fatores de Risco  
**Fr-AcOET** – Fração Acetato de Etila  
**GFC** – Garcinielliptona FC  
**GHS** – Sistema de Classificação Globalmente Padronizado  
**GSH** – Glutathiona Peroxidase  
**g** - Grama  
**HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica  
**HCl** – Ácido Clorídrico  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peroxido de Hidrogênio  
**HO-** - Hidroxila  
**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência  
**IE** – Ionização de elétrons  
**L-NAME** - Éster metílico da N-nitroarginina  
**MDA** – Malondialdeído  
**MIB** – Manteiga Industrializada do Bacuri  
**MPO** – Mieloperoxidase  
**MTT**- Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio  
**N<sub>2</sub>** – Nitrogênio  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**NaOH** – Hidróxido de sódio  
**NO** – Oxido Nítrico  
**NO<sub>Sc</sub>** – Oxido Nítrico Sintetase Constitutiva  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Nitrito  
**NPS** – Nitroprussiato de Sódio

**OECD**- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PA** – Pressão Arterial

**PHE** – Fenilefrina

**PBS**- Solução fisiológica tampão fosfato

**RL** – Radical Livre

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**SOD** – Superóxido Dismutase

**SRAA** - Sistema Regina Angiotensina Aldosterona

**TBARS** – Espécies Reativas ao Acido Tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	11
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E MEDIDAS .....	14
1.0 INTRODUÇÃO .....	17
2.0 OBJETIVOS .....	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos .....	20
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Espécies Reativas .....	21
3.2 Doenças Cardiovasculares .....	23
3.3 O Estresse Oxidativo no Desenvolvimento da Hipertensão Arterial Sistêmica .....	25
3.4 Plantas Medicinais .....	27
3.5 <i>Platonia insignis</i> Mart. ....	28
4.0 METODOLOGIA.....	31
4.1 Material vegetal .....	31
4.1.1. Obtenção da Manteiga .....	31
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	31
4.2.1 Avaliação toxicológica.....	31
4.2.1.1 Animais e cultivo celular.....	31
4.2.1.2 Citotoxicidade da MIB pelo ensaio do MTT em macrófagos peritoneais murinos.....	31
4.2.1.3 Atividade hemolítica da MIB em eritrócitos de carneiro .....	32
4.2.1.4 Análise Estatística .....	33
4.2.2 Avaliação do potencial antioxidante.....	33
4.2.2.1 Avaliação dos efeitos <i>in vitro</i> da MIB contra a peroxidação lipídica.....	33
4.2.2.2 Avaliação dos efeitos <i>in vitro</i> da MIB contra a formação do radical hidroxila (OH•).....	34
4.2.2.3 Avaliação dos efeitos <i>in vitro</i> da MIB contra a formação de óxido nítrico (•NO).....	35
4.2.2.4 Análise Estatística .....	36
4.3 Ensaio <i>in vivo</i> .....	36
4.3.1 Avaliação toxicológica.....	36

4.3.1.1 Animais utilizados nos protocolos.....	36
4.3.1.2. Toxicidade aguda.....	36
4.3.1.3 Avaliação de parâmetros clínicos e comportamentais .....	37
4.3.1.4 Análise dos parâmetros bioquímicos .....	37
4.3.1.5 Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos animais .....	37
4.3.1.6 Análise Estatística .....	38
4.3.2 Indução da Hipertensão Arterial Sistêmica.....	38
4.3.3 Avaliação da reatividade vascular induzida pela MIB em anéis de aorta de ratas hipertensas L-NAME.....	40
4.3.3.1 Preparações de anéis de artéria aortica .....	40
4.3.3.2 Avaliação da reatividade vascular <i>ex vivo</i> à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio .....	41
4.3.4 Avaliação da atividade antioxidante da MIB.....	41
4.3.4.1 Efeito da MIB sobre a atividade plasmática da mieloperoxidase (MPO) .....	41
4.3.4.2 Determinação dos níveis de concentração plasmáticas de MDA .....	42
4.3.4.3 Determinação da concentração de grupos sulfídricos não proteicos (glutathiona – GSH) nos eritrócitos. ....	42
4.3.4.5 Efeito da MIB sobre a atividade da Superóxido dismutase (SOD) eritrocitária .....	43
4.3.4.6 Efeito da MIB sobre a atividade da Catalase (CAT) nos eritrócitos. ....	43
4.3.4.7 Dosagem de hemoglobina no hemolisado.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Avaliação toxicológica <i>in vitro</i> .....	45
5.2 Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> .....	47
5.3 Avaliação toxicológica <i>in vivo</i> .....	51
5.4 Reatividade vascular .....	55
5.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> .....	61
5.6 Avaliação Bioquímica.....	67
6.0 CONCLUSÃO.....	70
7.0 REFERÊNCIAS.....	71

## 1.0 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo, e no Brasil representam cerca de 30% dos óbitos. Mais pessoas morrem anualmente por essas doenças do que por qualquer outra causa. Registros demonstram que elas matam duas vezes mais que todos os tipos de câncer e seis vezes mais que as infecções, incluídas as mortes por síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (ROCHA E MARTINS, 2017), sendo a hipertensão arterial sistêmica (HAS) uma das grandes responsáveis por esses óbitos. No Brasil, HAS atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, contribuindo para 50% das mortes por DCV, tendo desencadeado cerca de 200 mil mortes até o final de 2013 (VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016). A Sociedade Brasileira de Cardiologia já registrou cerca de 300 mil mortes até o início de outubro de 2019 por doenças do sistema cardiovascular. A informação está registrada no “Cardiômetro”, ferramenta de alerta que a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) inaugurada no final de 2016 (<http://www.cardiometro.com.br/>).

Apesar do expressivo arsenal terapêutico para o tratamento da HAS, a taxa de morbimortalidade continua alta. Visto que, embora eficazes, esses medicamentos também podem causar efeitos colaterais inconvenientes, gerando o abandono do tratamento. Diante de tal fato, a população vem resgatando o conhecimento milenar sobre as plantas medicinais (SILVEIRA, *et al.*, 2008). Representando um importante ponto de partida para a descoberta de vários medicamentos, as plantas medicinais não são unicamente uma fonte potencial de princípios ativos quimicamente definidos. O uso de extratos padronizados tem demonstrado importante relevância terapêutica e, nesse contexto, a atividade farmacológica deve estar caracterizada, assim como a identificação dos compostos marcadores responsáveis por ela. Em alguns casos, o efeito terapêutico pode resultar da ação combinada de grupos de constituintes, em vez de apenas um único princípio ativo isolado (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Estima-se que 25% dos medicamentos existentes são derivados de plantas. Podendo chegar a 70% quando se leva em conta o mercado de medicamentos antineoplásicos e de antibióticos (CALIXTO, 2013). Sendo o Brasil o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, a nação tornou-se detentora de uma rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto

acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais. Como estratégia na investigação dessas plantas, a etnofarmacologia pode ser uma ferramenta importante na recuperação do conhecimento milenar e secular e, até mesmo, recursos terapêuticos naturais contemporâneos, o que permite combinar o conhecimento empírico ao científico, facilitando a descoberta de novos agentes biologicamente ativos, através da redução do tempo e custo de triagem farmacológica e toxicológica (ELISABETSKY, 2003).

Nesse contexto, a espécie *Platonia insignis* Mart., uma planta nativa da Região Amazônica Brasileira popularmente conhecida como “bacurizeiro”, tem ganhado destaque. Esta planta é distribuída naturalmente em todos os Estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil, mais precisamente nos estados do Pará, Mato Grosso, Maranhão e Piauí (LUSTOSA *et al.*, 2016). A polpa dos frutos de *P. insignis* é largamente empregada em indústria alimentícia, como matéria-prima para a produção de sucos, sorvetes, doces e bebidas, com promissor potencial antioxidante (COSTA-JÚNIOR, 2011a; NASCIMENTO *et al.*, 2014). As sementes são usadas na produção de sabões ou manteigas e o material graxo extraído a partir do óleo das sementes tem sido usado no tratamento de diversas doenças em humanos e animais, aproveitando-se suas ações no combate a queimaduras, eczemas, herpes, diarreia e feridas. Estudos têm reportado atividade antimicrobiana, antitumoral, citotóxica, anti-inflamatória e antileishmania para as sementes de *Platonia insignis* (AGRA *et al.*, 2008; LUSTOSA *et al.*, 2016; LUSTOSA *et al.*, 2018).

Ainda quanto ao estudo das possíveis atividades de *Platonia insignis*, foi comprovada a ação antioxidante do extrato hexânico de suas sementes (EHSB), bem como do complexo de inclusão deste extrato em  $\beta$ -ciclodextrina (EHSB: $\beta$ CD), através de abordagens *in vitro* relacionadas à inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), eremoção dos radicais hidroxila e nitrito. Os resultados demonstraram que o efeito antioxidante foi significativamente potencializado após a complexação da manteiga das sementes de *P. insignis* (NASCIMENTO, 2014). Além do mais, há relatos de baixa toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo*, assim como capacidade imunomoduladora do extrato hexânico obtido em bancada e da manteiga obtida industrialmente (LUSTOSA *et al.*, 2016; LUSTOSA *et al.*, 2018).

A família Clusiaceae, a qual pertence a espécie *Platonia insignis*, tem sido alvo de estudos em função de sua riqueza em metabólitos secundários, incluindo as benzofenonas poliisopreniladas. Esta classe de compostos tem sido sistematicamente estudada em função das várias atividades biológicas apresentadas e aplicações terapêuticas promissoras, tais como

atividade vasorrelaxante, citotóxica, antimicrobiana, antiparasitária, leishmanicida, antioxidante, antifúngica, anti-HIV, antiviral, anti-anafilática, hepatoprotetora, antidiabética e atividades anti-inflamatórias (ARCANJO *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2008).

No que diz respeito aos efeitos antioxidantes, sabe-se que no sistema cardiovascular os radicais livres trabalham como sinalizadores que regulam as funções vasculares, produzidas em várias camadas, como endotélio e músculo liso. Essas espécies incluem ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), dentre outras (LAKSHMI *et al.*, 2009). Assim, o estresse oxidativo decorrente do aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) está associado à progressão de diversas disfunções cardiovasculares, podendo afetar a estrutura e função do miocárdio e uma disfunção endotelial, promovendo alterações no tônus vascular (BUFFON *et al.*, 2000; WATTANAPITAYAKULA e BAUERB, 2001).

Desta forma, compreender a relação do estresse oxidativo com a HAS torna-se fundamental para a promoção e/ou prevenção da saúde da população, visto que esses estudos nos possibilitam compreender alguns efeitos biológicos causados pelo desequilíbrio oxidativo. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos antioxidantes e sobre a reatividade vascular induzidos por uma manteiga industrializada obtida das sementes de *Platonia insignis* Mart. (MIB) em modelo de hipertensão em ratas, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, para potencial aplicação no tratamento das doenças cardiovasculares.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar os efeitos antioxidante e vasorrelaxante de uma manteiga industrializada obtida das sementes de *Platonia insignis* Mart. (MIB), através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, para potencial aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares.

### 2.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica da MIB utilizando os ensaios do MTT em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Analisar a atividade hemolítica da MIB em eritrócitos de sangue de carneiro;
- Mensurar os efeitos *in vitro* da MIB na formação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ );
- Investigar o perfil toxicológico da MIB em ensaio de toxicidade aguda *in vivo* seguido da avaliação dos parâmetros comportamentais, bioquímicos e macroscópicos dos órgãos;
- Avaliar a reatividade vascular após tratamento induzido pela MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg·dia em anéis de artéria aorta isolada de ratas submetidos ao modelo de hipertensão com L-NAME;
- Identificar o efeito do tratamento com a MIB sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO), e sobre os níveis de malondialdeído (MDA) e Glutathione reduzida (GSH) em animais submetidos ao modelo de hipertensão com L-NAME;
- Verificar os parâmetros bioquímicos plasmáticos dos animais hipertensos tratados com MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg·dia;

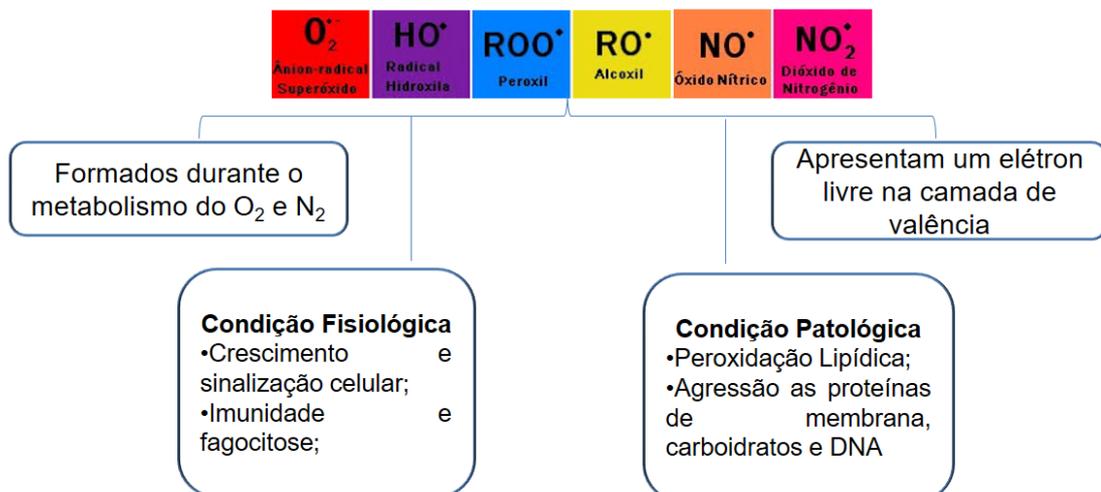
### 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Espécies Reativas

Durante o metabolismo do oxigênio e do nitrogênio, inúmeras moléculas tóxicas, denominadas espécies reativas são formadas. A principal propriedade que confere toxicidade a esses elementos é a presença de elétrons livres na camada de valência, predispondo ligações celulares pelas reações de óxido-redução (BARREIROS *et al.*, 2006). Assim, qualquer espécie que empregue o oxigênio durante a respiração celular ou o nitrogênio, pela decomposição de aminoácidos para obtenção de energia, estão propensas ao estresse oxidativo (FERREIRA e ABREU, 2007).

Denominadas de ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio), esses radicais livres (RL), estão envolvidos na regulação do crescimento celular, imunidade, fagocitose, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas, entretanto, quando em excesso manifestam efeitos nocivos, como a peroxidação dos lipídios e agressão às proteínas de membrana, às enzimas, carboidratos e ao DNA (BARREIROS *et al.*, 2006; CELI, 2010; OLIVEIRA e SCHOFFEN, 2010). A formação de RL normalmente acontece nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e esses mecanismos são favorecidos pelos íons de ferro e cobre, sendo a mitocôndria a principal produtora, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia. Outra importante fonte geradora de RL são as enzimas NADPH oxidases, proteínas de membrana que tem o encargo de deslocar elétrons através das membranas celulares (BARBOSA *et al.*, 2010).

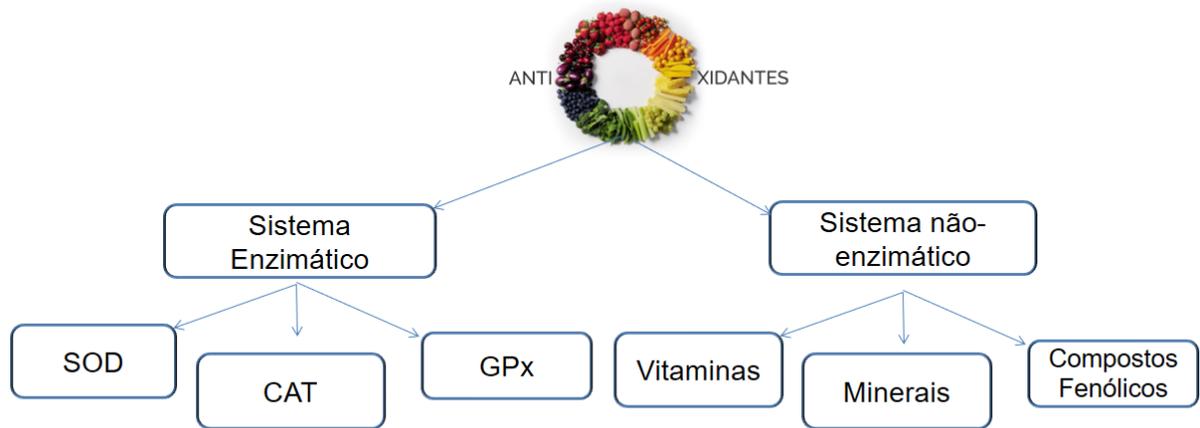
**Figura 1:** Esquema Representativo das Principais Especies Reativas



Fonte: Autoria Própria

Por sua vez, os antioxidantes, substância que manifestada em menor concentração que a do substrato oxidável atrase ou iniba a oxidação deste de modo eficaz, são responsáveis pela redução dos danos causados pela ação nociva dos RL. Esse sistema, pode ser dividido em enzimático (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutaciona peroxidase - GPx) e não enzimático (glutaciona, vitamina C, indóis, catecóis, bioflavonas, vitamina A, vitamina E), podendo ter origem endógena ou dietética (BARBOSA *et al.*, 2014).

**Figura 2:** Esquema Representativo dos Principais Sistemas Antioxidantes



Fonte: Autoria Própria

A SOD, amplamente distribuída no organismo, catalisa a dismutação de dois íons superóxidos para formar peróxido de oxigênio (que é menos reativo) e oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015), instituindo um sistema de defesa vital para a sobrevivência em condições aeróbicas. Segundo Goldstein e Czapski (1996), os danos causados pelo superóxido durante a isquemia e os acidentes vasculares, indicam o potencial terapêutico da SOD. Fato este, relatado por Luoma *et al.*, (1998) ao observar que a modulação da atividade da SOD extracelular colaborou no tratamento de doenças vasculares, como a arteriosclerose.

A CAT está presente em todos os tipos de células de mamíferos, principalmente nos peroxisomas, sendo esta uma das enzimas responsáveis pela metabolização do  $H_2O_2$  em água e oxigênio, impedindo assim a formação de radical hidroxil e consequentemente dano celular ao atuar de forma complementar a GPx. Nessa perspectiva, alguns órgãos (coração, pulmões e cérebro) por não apresentarem peroxisomas em sua estrutura estão mais expostos aos danos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Nesses casos, ao se difundir para o sangue o  $H_2O_2$  sofrerá ação da CAT eritrocitária, amenizando assim o estresse oxidativos nesses órgãos (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A GPx pode encontrar-se sob a forma de glutathiona reduzida (GSH), na forma oxidada (GSSG), e ainda sob a forma de glutathiona conjugada (GS-R), sendo a glutathiona reduzida a forma mais prevalente nos tecidos saudáveis e no sangue (PARK e YOU, 2010). A glutathiona participa de inúmeros processos metabólicos no organismo ao catalisar a redução de vários peróxidos, principalmente do  $H_2O_2$ . Dessa forma, a quantidade de GSH no organismo reflete seu estado fisiológico, cuja depleção expõe as células aos agentes oxidantes de forma crítica (FORMAN, RINNA E ZHANG, 2009; TAPIERO e TEW, 2003).

Nessa perspectiva, o estresse oxidativo (EO) é uma condição metabólica caracterizada na medicina humana, em que a produção de RL sobrepõem a capacidade antioxidante, desencadeando o desenvolvimento de disfunções crônicas e degenerativas, a exemplo das doenças cardiovasculares, endócrinas e oncológicas (GOTTLIEB et al., 2010, SILVA e JASIULIONIS, 2014). Também existem correlações com problemas neurológicos, renais, hepáticos, respiratórios, diabetes, problemas inflamatórios, envelhecimento, infecções virais (RAVAROTTO *et al.*, 2018).

**Figura 3:** Esquema Representativo do Estresse Oxidativo



Fonte: Autoria Própria

### 3.2 Doenças Cardiovasculares

Na América Latina e no Brasil, observou-se, nas últimas décadas, uma alteração no perfil da mortalidade da população, marcado pelo aumento dos óbitos ocasionados por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Dentre estas, sobressaem-se as doenças cardiovasculares (DCV), causando disfunções no coração e nos vasos sanguíneos, constituindo a causa de morte mais prevalente em todo mundo (RIBEIRO, COTTA e RIBEIRO, 2012).

Sendo assim, as DCV têm uma forte influência na qualidade de vida, provocando

incapacidade física prematura e prolongamento da permanência hospitalar do indivíduo. Além de, representarem um desmedido impacto na economia e nos sistemas de saúde e seguridade social. O que justifica o rastreamento pelos fatores de risco associados ao seu desenvolvimento. Dentre eles, encontram-se os modificáveis: dislipidemias, fumo, dieta, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, sedentarismo e obesidade; e os não-modificáveis: sexo, idade, raça e hereditariedade. Esses fatores podem inter-relacionar-se e aumentar o risco do seu desenvolvimento (COVATTI *et al.*, 2016).

Dentre as DVCs, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) manifesta-se como um fator de risco para as doenças cardíacas e cerebrovasculares, tornando-se um transtorno de saúde pública em esfera mundial. Menciona-se que em 2000, a HAS atingiu 25% da população mundial e a estimativa é que em 2025 chegue a 29%. No Brasil, estudos revelaram que a prevalência da hipertensão atinge em média 32,5% dos indivíduos (RADOVANOVIC *et al.*, 2014).

Nesse contexto, HAS, como a maioria das doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), envolve componentes etiológicos, ambientais e hereditários, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifactorial (HASIMU *et al.*, 2003), relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico (SBC, 2007). Desenvolvendo-se de forma assintomática, na maior parte do seu percurso, acarretando um obstáculo no diagnóstico precoce e na adesão terapêutica por parte dos pacientes ao tratamento visto que muitos medicamentos desencadeiam efeitos colaterais, o que torna o controle da HAS tão complexo (PARANÁ, 2018).

A HAS favorece as causas de morbidade e mortalidade cardiovascular, sendo um dos elementos mais relevantes no avanço das doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, respondendo por cerca de 25% das perdas por doença arterial coronariana, 40% dos óbitos por acidente vascular cerebral e 50% dos casos de insuficiência renal, quando associada a diabetes (PARANÁ, 2018).

Nesse contexto, pesquisas realizadas na última década demonstraram o crescimento das vias oxidativas biológicas durante a DCV em humanos e animais. Assim, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ser um mecanismo unificador na progressão dessas doenças, e os antioxidantes podem ter valor terapêutico nesse panorama (WATTANAPITAYAKULA e BAUERB, 2001).

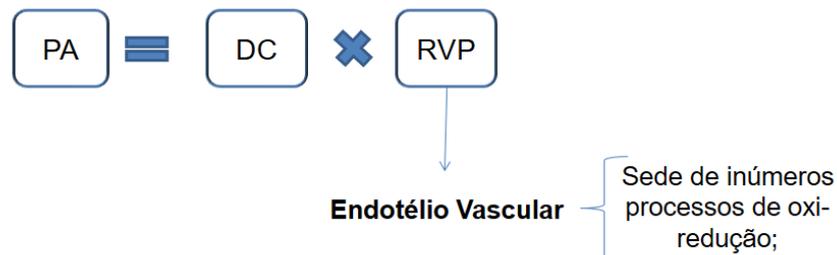
Embora não haja evidência direta de lesão cardíaca induzida por EROs durante hipóxia ou isquemia/reperfusão em humanos, alguns estudos demonstraram aumento nos

biomarcadores da produção de oxidantes e/ou diminuição da capacidade antioxidante durante a isquemia miocárdica (BUFFON *et al.*, 2000; MIWA *et al.*, 1999). Além disso, eles relataram que a administração de antioxidantes reduz a lesão e disfunção das células cardíacas no infarto agudo do miocárdio (SINGH *et al.*, 1996), angioplastia coronariana (RAJAKUMAR *et al.*, 1999) e cirurgia de coração aberto (FABIANI *et al.*, 1993).

### 3.3 O Estresse Oxidativo no Desenvolvimento da Hipertensão Arterial Sistêmica

Em circunstâncias normais, a pressão arterial (PA) deve se manter sob uma restrita variação, proporcionando uma adequada perfusão tecidual, determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica (GIANNINI *et al.*, 2014), cujo controle abrange mecanismos neurais e neuro-humorais que modulam a atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) para o coração e vasos, bem como o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios (renina, vasopressina e peptídeo natriurético atrial) evidenciando o papel do sistema endotelial e renal (NEVES *et al.*, 2016)

**Figura 4:** A interferência do estresse oxidativo no controle da Pressão Arterial



Fonte: Autoria Própria

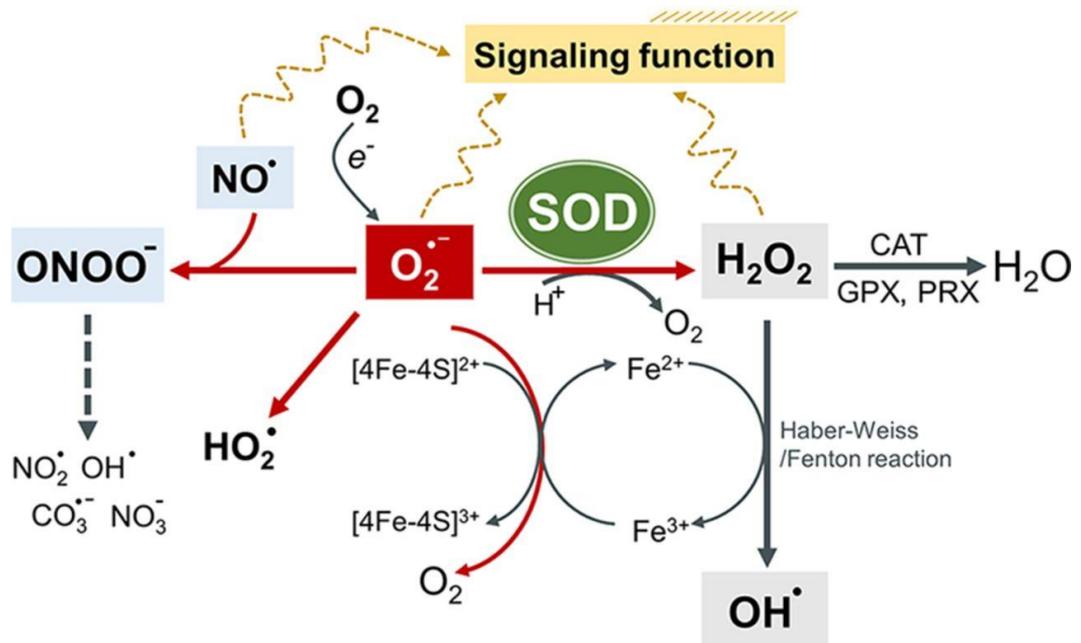
Por sua vez, o endotélio vascular é a sede de inúmeros processos de oxirredução, visto que, todas as células vasculares produzem inúmeras espécies reativas (ER). Dessa forma, o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), produzido na célula endotelial pela enzima eNOS ao converter o aminoácido L-arginina a  $NO^{\bullet} + L$ -citrulina, com a cooperação da  $NAD(P)H/NADP^+$  e do complexo cálcio/calmodulina, regula o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas, inibe a atividade plaquetária, proliferação celular e a agregação dos leucócitos, sendo por tanto essencial na modulação da PA (BATLOUNI, 2001; NEVES *et al.*, 2016)

Marcada pela disfunção endotelial, a HAS é acompanhada de alterações estruturais e funcionais do sistema vascular em resposta às oscilações hemodinâmicas, cuja função principal consiste na resistência ao vasorelaxamento causado pelo  $NO^{\bullet}$  na parede vascular,

devido, ao EO. No que lhe diz respeito, o estresse oxidativo vascular é caracterizado pela formação excessiva do  $O_2^{\bullet-}$  que dificulta à ação do  $NO^{\bullet}$  ao reagir com o mesmo para formar  $ONOO^-$ , um intermediário reativo essencialmente lesivo, visto que é capaz de produzir o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (STORCH *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Favorecida pela baixa disponibilidade de  $NO^{\bullet}$ , a Endotelina-1 (ET-1) ou fator de contração derivado do endotélio (EDCF), propicia o crescimento das células endoteliais e a vasoconstrição, participando, portanto, da patogênese do EO da HAS (BATLOUNI, 2001). Assim o estresse oxidativo vascular sucederei um estágio hipertensivo, visto que fatores vasoconstritores estariam em predomínio sob os fatores vasodilatadores (VASCONCELOS *et al.*, 2007; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2015).

**Figura 5:** Reações e Transformações do ânion superóxido



Fonte: Wang, et al., 2018.

O principal provedor de  $O_2^{\bullet-}$  é o complexo enzimático NADH/NAD(P)Hox, que catalisa a redução do oxigênio molecular utilizando NAD(P)H como doador de elétrons gerando  $O_2^{\bullet-}$ . Esse sistema fornece  $O_2^{\bullet-}$ , das membranas das células musculares lisas e endoteliais (STORCH *et al.*, 2017; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2015). A patogênese da HAS demanda tanto predisposição genética quanto exposição a fatores ambientais, como já mencionado, assim para manter a PA sob condições fisiológicas, faz-se necessário a ação conjunta de uma complexa rede de sistemas cardiovasculares (balanço de sódio, vasodilatação, função renal, atividade da angiotensina II e do sistema renina angiotensina aldosterona - SRAA) (GONSALEZ *et al.*, 2018).

A angiotensina II (Ang II) fomenta a produção de NAD(P)Hox e reduz a biodisponibilidade de NO<sup>\*</sup> ao alterar a síntese de eNOS (GOUVEIA *et al.*, 2018; PÓVOA, 2018), além de estimular a proliferação das células vasculares, via receptor AT1 (receptor de angiotensina 1), visto que as ER geradas ativam cascatas proliferativas no músculo liso vascular (QUEIROZ, *et al.*, 2018; SIMPLICIO *et al.*, 2016). Dessa maneira, há um mecanismo interligado ao SRAA e um independente deste sistema que explicariam a participação do estresse oxidativo na HAS (GONSALEZ *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, o que conecta os dois sistemas é a participação da enzima NAD(P)Hox, presente na membrana das células musculares lisas do endotélio, e um domínio do sistema pró-oxidante (GUADAGNIN *et al.*, 2015). O declínio na atividade de NO<sup>\*</sup> pode estar envolvido diretamente com fatores que atinjam a eNOS como diminuição na expressão, ausência de substrato ou cofator, alteração da sinalização celular ou degradação acelerada (TEIXEIRA *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Portanto, apesar de muitos mecanismos estarem esclarecidos, ainda se faz necessário estabelecer se indivíduos com HAS apresentam indícios sistêmicos de estresse oxidativo e o impacto deste no curso da doença. Neste sentido, estudar substâncias com potencial antioxidante e indicadores de dano oxidativo em hipertensos torna-se fundamental, possibilitando a ciência compreender a relação existente entre o processo patológico e o EO através da análise dos marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos.

### **3.4 Plantas Medicinais**

A utilização de plantas medicinais como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade nas mais diferentes sociedades. A medicina popular vem oferecendo uma contribuição cada vez maior às ciências, devido uma gama de conhecimentos e práticas médicas de caráter empírico, influenciadas pelo contexto sociocultural, econômico e físico, no qual se encontram inseridos (CALIXTO, 2000; CAMARGO, 1976). Por sua vez, as plantas não são unicamente uma fonte potencial de princípios ativos quimicamente definidos. O uso de extratos é também possível e, para isso, a atividade farmacológica deve estar definida, assim como os compostos responsáveis por essa atividade. Em alguns casos, o efeito terapêutico pode resultar da ação de vários constituintes (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). A identificação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação, vêm sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a

farmacologia (BRAZ FILHO, 2010). Assim, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças, é uma área de interesse crescente de diversos grupos de pesquisa (JÄGER *et al.*, 2013; RUBIO-MORAGA *et al.*, 2013).

Além de deter a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15 a 20%, o Brasil detém uma diversidade cultural e étnica que resulta em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, sobre manejo e uso de plantas medicinais. Sendo esta, uma ferramenta importante na recuperação do conhecimento milenar e secular e, até mesmo, recursos terapêuticos naturais contemporâneos, o que permite combinar o conhecimento empírico ao científico, facilitando a descoberta de novos agentes biologicamente ativos, através da redução do tempo e custo de triagem farmacológica e toxicológica (ELISABETSKY, 2003).

No que se refere as doenças cardiovasculares, as plantas medicinais são agentes ativos de prevenção sendo frequentemente usadas como um meio de terapia adjuvante. Uma vez que, séculos de experiência no uso destas na medicina popular são o resultado de sua eficiência relativamente alta e sua ampla distribuição em ecossistemas naturais e, às vezes, perto da habitação humana (FARIAS *et al.*, 2016; FRANÇA *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2010; MEIRA *et al.*, 2017).

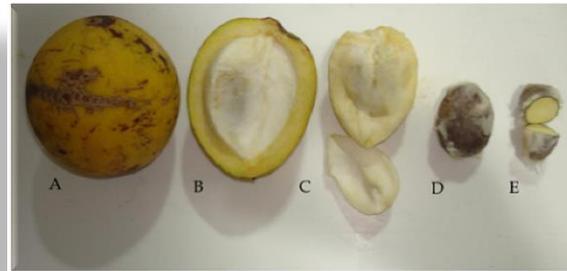
### **3.5 *Platonia insignis* Mart.**

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) pertence à família Clusiaceae, é uma árvore frutífera nativa da região amazônica do Brasil e Guiana em áreas descampadas ou de vegetação baixa (FONTENELE *et al.*, 2010; MOURÃO; BELTRATI, 1995;) sendo amplamente distribuída em todos os estados da região norte e nordeste do Brasil, mais precisamente nos estados do Pará, Mato Grosso, Maranhão e Piauí. Esta espécie é caracterizada por uma ampla variação de forma e tamanho de seus frutos, rendimento e qualidade de polpa, além de outras características de interesse econômico (FERREIRA; FERREIRA; CARVALHO, 1987).

O fruto pode ser consumido tanto na forma *in natura*, sendo muito utilizado na preparação de sorvetes, cremes, refrescos, compotas e geleias; como processado na agroindústria (FERREIRA; FERREIRA; CARVALHO, 1987; SILVA *et al.*, 2010). A polpa do fruto é rica em constituintes químicos com propriedades antioxidantes como, a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferóis) e uma semente rica em ácidos graxos, oleico (C18:1) 27,59%, palmítico (C16:0) 25,31%, éster metílico do ácido linoleico (C 18:2) 4,35%, ácido

erúxico (C 22:1) 3,50%, mirístico 3,34%, linoleico (C18:2) 2,5%, esteárico (C18:0) 1,86%, palmitoleico (C16:1) 1,82%, além da presença de tripalmitina, cerca de 10 - 12% dos extrativos graxos das sementes de bacuri, indicando que o mesmo pode ser uma boa alternativa para a indústria de óleo (LUSTOSA, 2012; SILVA BENTES *et al.*, 1986).

**Figura 6:** *Platonia insignis* Mart. (A – Fruto Fechado, B- Fruto Aberto, C- Polpa, D- Semente Fechada, E- Semente Aberta).



Fonte: Lustosa, 2012.

A graxa de bacuri, fabricada pela população a partir das sementes, é usada para o tratamento de diversas doenças, tais como: problemas de pele: queimaduras, feridas, ação antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e de forma sistemática, como anti-inflamatória (LIMA; VIEIRA; COSTA JÚNIOR, 2007; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010). Além disso, existem vários estudos relatando efeitos antioxidantes (LIMA *et al.*, 2017 ; RUFINO *et al.*, 2010), cicatrização de feridas (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010), atividade leishmanicida (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013) e anticonvulsivante (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2010) do extrato das sementes de frutos de *P. insignis*. Por sua vez, o látex amarelo da árvore em algumas regiões é utilizado para o tratamento de eczemas, vírus do herpes e outros problemas de pele (SHANLEY; MEDINA, 2005).

A manteiga industrializada do bacuri (MIB), produzida e comercializada pela empresa Amazon Oil Indústria e Comércio Ltda., é uma graxa de de alta absorção, devido ao seu elevado nível de tripalmitina (50 a 55%), o que lhe confere a capacidade de penetrar na pele rapidamente. O alto teor do ácido graxo palmitoleico (5%), em comparação com outros óleos que não possuem mais que 0,5 a 1,5%, qualifica esse produto como um emoliente fantástico podendo também ser utilizado como umectante. Um dos seus constituintes, a tripalmitina, pode ser utilizado em comprimidos mastigáveis por ter uma hidrólise lenta, atenuando os efeitos colaterais de medicamentos pesados ao dosar a quantidade para que o organismo fique sempre absorvendo as suas ações medicamentosas, de acordo com a farmacocinética (LUSTOSA, 2012; HOMMA *et al.*, 2010).

Na busca de componentes biologicamente ativos da família Clusiaceae, COSTA JUNIOR *et al.*, (2011b), investigou componentes bioativos das sementes de *P. insignis*, e assim isolou uma benzofenona poliisoprenilada denominada Garcinieliptona FC (GFC), que apresenta atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica de ratos (ARCANJO *et al.*, 2014) e uma ação antioxidante *in vitro* ao impedir a lipoperoxidação *in vitro* (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2011b) e *in vivo* (COSTAJÚNIOR *et al.*, 2012). Segundo WU e colaboradores (2008), que também isolaram esta substância, a GFC possui atividades pró-oxidante no DNA, e induz a morte celular *in vitro*, sendo estas atividades as mais importantes para o presente estudo.

A família Clusiaceae representa uma rica fonte de benzofenonas e xantonas poliisopreniladas que são responsáveis por diversas atividades biológicas (KUMAR *et al.*, 2013 ). A  $\alpha$ -mangostina, um tipo de xantona encontrada na casca do mangostão e identificado no extrato hexânico do bacuri (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013a), tem efeitos antiinflamatórios (LIN-GEENG CHEN *et al.*, 2008) , antibióticos (SAKAGAMI *et al.*, 2005), anticancerígenos (AKAO *et al.*, 2008) e antioxidantes (JUNG *et al.*, 2006; NGAWHIRUNPAT, *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*P. insignis*) no tratamento das doenças cardiovasculares é promissor, uma vez que o sequestro de radicais hidroxilas (OH) e de óxido nítrico (NO) pela garcinieliptona FC (GFC) (COSTA JÚNIOR, 2011), sugere o controle de um dos mecanismos que afetam o equilíbrio do sistema cardiovascular.

## **4.0 METODOLOGIA**

### **4.1 Material vegetal**

#### **4.1.1. Obtenção da Manteiga**

A manteiga industrializada das sementes do bacuri (MIB) foi obtida comercialmente da empresa Amazon Oil Industria e Comércio Ltda. (Ananindeua, PA, Brasil), produtora da manteiga no Brasil, sob o lote AMO081005/2015. Segundo Lustosa (2012), a MIB é rica em ácidos graxos, destacando-se os ácidos palmítico (C16:1) e ácido oleico (C18:1), além de considerável conteúdo de tocoferol e constituintes terpênicos.

### **4.2 Ensaio *in vitro***

#### **4.2.1 Avaliação toxicológica**

##### **4.2.1.1 Animais e cultivo celular**

Foram utilizados camundongos BALB/c (20-30g) machos entre 7 e 12 semanas de vida, provenientes do Biotério Setorial de Experimentação I, localizado no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos durante todo o período de estudo em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ), com água e ração *ad libitum*, os quais foram eutanasiados de acordo com a Resolução Nº 1000/2012-CRMV, sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, CFMV-PI Nº 0335. Os procedimentos foram realizados com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí, Brasil (permissão Nº 457/18).

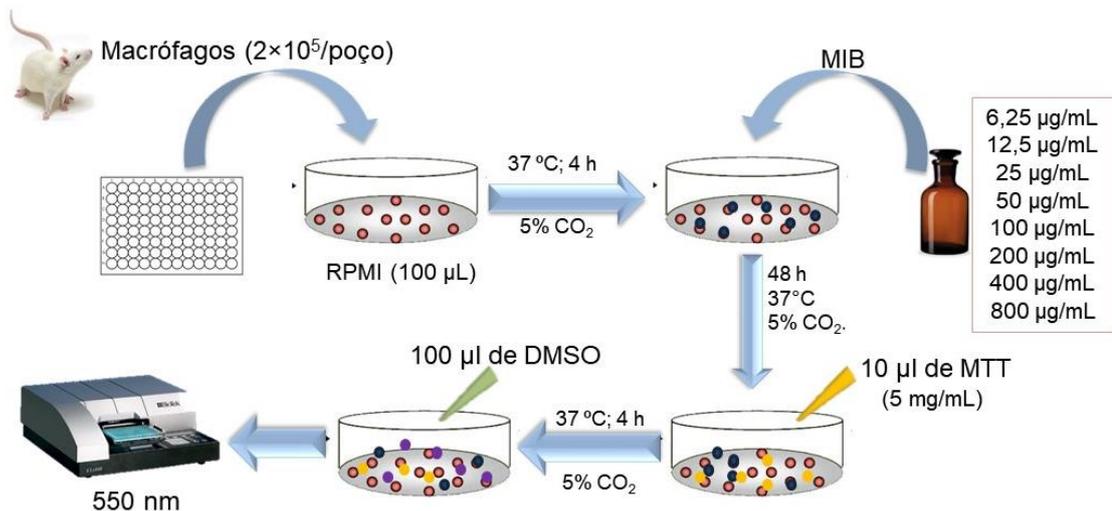
Três dias após a administração intraperitoneal de 1,5 mL de tioglicolato sódico 3,0%, os animais foram eutanasiados e imersos em álcool 70% por 1 min para assepsia. Em fluxo laminar, adicionou-se 8,0 mL de PBS estéril na cavidade peritoneal. Em seguida, a solução contendo macrófagos peritoneais foi aspirada e transferida para um tubo estéril em banho de gelo e submetida a duas centrifugações a 1500 rpm a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min, com sucessivas lavagens com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%, penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/ml. A contagem dos macrófagos viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, na presença do corante Azul de Tripán para análise de viabilidade celular (RODRIGUES *et al.*, 2015).

##### **4.2.1.2 Citotoxicidade da MIB pelo ensaio do MTT em macrófagos peritoneais murinos**

A avaliação da atividade citotóxica da MIB em macrófagos murinos foi realizada

pelo ensaio do MTT. Em placas de 96 poços, os macrófagos ( $2 \times 10^5$ /poço) foram incubados com 100  $\mu$ l de meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) a 37°C em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas, para adesão celular. Em seguida, a MIB foi incubada em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800  $\mu$ g/mL) durante 48 h a 37°C e CO<sub>2</sub> à 5%. Logo após, adicionou-se 10  $\mu$ l do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a partir de uma solução estoque a 5 mg/mL em PBS, e incubou-se por mais 4 h, sob as mesmas condições de temperatura e CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 100  $\mu$ l de DMSO foi adicionado em cada poço. A placa foi mantida sob agitação por 30 min para completa dissolução do formazan. As absorbâncias foram lidas em um leitor de microplacas de elisa (ELx800™, BioTek® Instruments, EUA) em 550 nm e os resultados foram expressos em CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica média) com intervalo de confiança calculados por regressão não-linear pelo software GraphPad Prism 5.0, sendo o grupo controle considerado como contendo 100% de células viáveis (ALVES *et al.*, 2010).

**Figura 7:** Esquemática do teste de viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos frente a MIB.



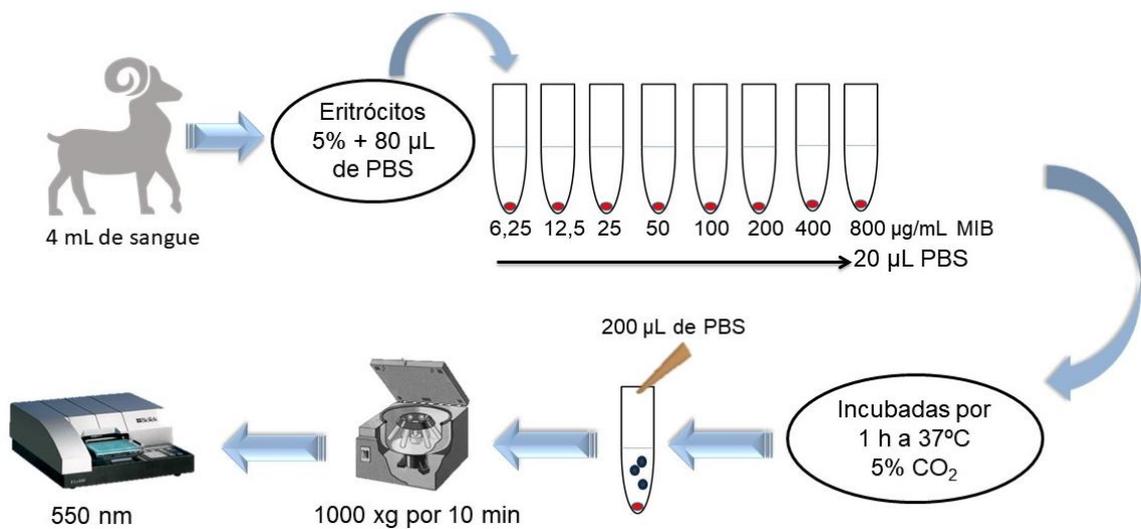
Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.1.3 Atividade hemolítica da MIB em eritrócitos de carneiro

Para a avaliação da atividade hemolítica, foram utilizados eritrócitos de sangue de carneiro, obtidos a partir de 4 mL de sangue total coletado com anticoagulante (EDTA). O carneiro não foi submetido a nenhum outro procedimento experimental anterior à coleta. Os eritrócitos foram diluídos em 80  $\mu$ L de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, a MIB foi adicionada em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50;

100; 200; 400 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ), em volume de 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37°C e  $\text{CO}_2$  5% e a reação interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 1000 $\times$ g, por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 550 nm, para determinação da atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média ( $\text{CH}_{50}$ ), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (ALVES *et al.*, 2010)

**Figura 8:** Esquemática do teste de atividade hemolítica da MIB em eritrócitos de sangue de carneiro.



Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.1.4 Análise Estatística

Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata para cada amostra cujos valores de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CH}_{50}$  foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles e determinados graficamente a partir das curvas concentração resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

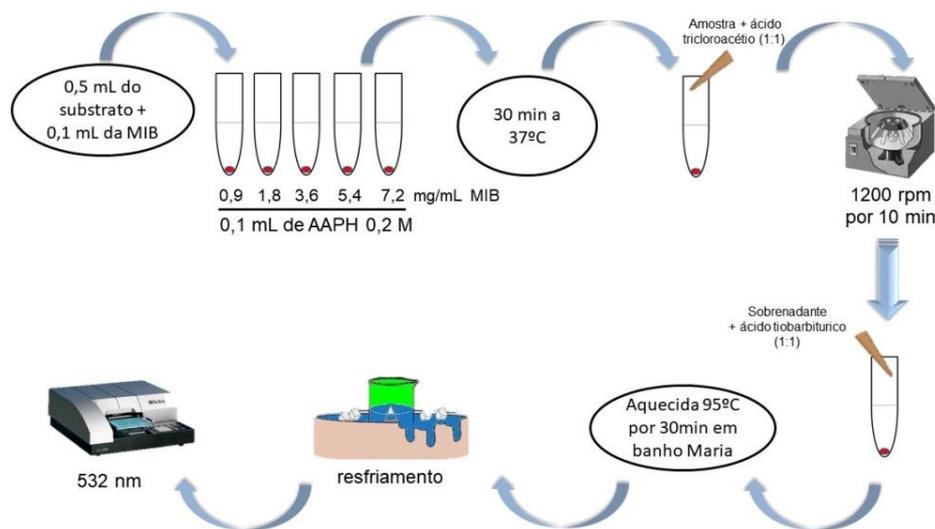
#### 4.2.2 Avaliação do potencial antioxidante

##### 4.2.2.1 Avaliação dos efeitos *in vitro* da MIB contra a peroxidação lipídica.

Realizado pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, o método conhecido como TBARS foi utilizado para avaliar a ação da MIB contra a peroxidação lipídica (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). O substrato utilizado

foi um homogeneizado de gema de ovo a 1% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). Uma alíquota de 0,5 mL do substrato foi então homogeneizada e sonicada com 0,1 mL de MIB em diferentes concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 mg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis-2 metilpropinamida 0,12 M). No controle testou-se apenas o veículo (Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina a 0,9%). As reações foram realizadas por 30 minutos a 37°C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas em 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota (0,5 mL) do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95°C durante 30 minutos. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de TBARS formados a partir do AAPH apenas (controle induzido). O Trolox foi usado como droga padrão.

**Figura 9:** Esquemática da avaliação dos efeitos *in vitro* da MIB contra a peroxidação lipídica.



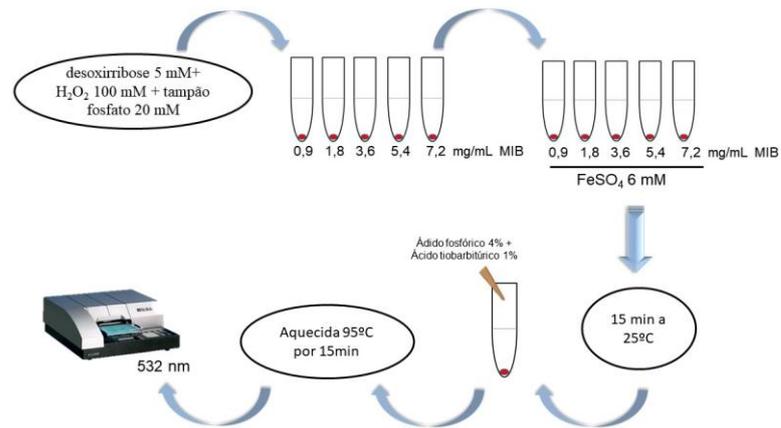
Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.2.2 Avaliação dos efeitos *in vitro* da MIB contra a formação do radical hidroxila (OH•)

A formação de radical hidroxila (•OH) na reação de Fenton foi quantificada utilizando a degradação oxidativa de 2-desoxirribose (ZARENA e UDAYA SANKAR, 2009). O princípio do teste é a quantificação do produto de degradação de 2-desoxirribose, malonaldeído (MDA), pela sua condensação com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). A reação foi iniciada pela adição de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$  6 mM) à solução contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100

mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Para medir a atividade antioxidante da MIB na remoção do radical hidroxila, diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dessa manteiga foram adicionadas ao sistema antes da adição de  $\text{Fe}^{2+}$ . As reações foram realizadas durante 15 minutos em temperatura ambiente, e foram interrompidas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de TBA (m/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram submetidas a aquecimento por 15 minutos a  $95^\circ\text{C}$  e, então, resfriados em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes de MDA formados pelo  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Figura 10:** Esquemática da avaliação dos efeitos *in vitro* do MIB contra a formação do radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ).

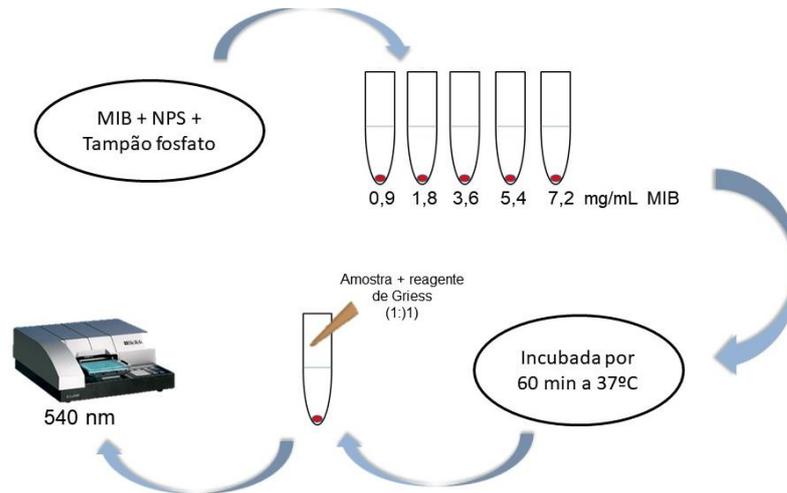


Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.2.3 Avaliação dos efeitos *in vitro* da MIB contra a formação de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ).

Radicais de óxido nítrico foram gerados a partir de solução de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Por sua vez, o  $\text{NO}\cdot$  interage com o oxigênio para produzir radicais nitritos, os quais foram medidos pela reação de Griess (FENG *et al.*, 2013). A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em padrão fosfato e MIB em diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. O percentual de inibição da produção de  $\text{NO}_2\cdot$  foi determinado por comparação dos valores de absorbância do controle negativo (apenas NPS 10 mM e veículo) e as preparações das substâncias utilizadas no teste. Os resultados foram expressos como percentagem de radical nitrito formado pelo meio reacional.

**Figura 11:** Esquemática da avaliação dos efeitos *in vitro* do MIB contra a formação de óxido nítrico ( $\bullet$ NO)



Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida de t-Student-Neuman-Keuls como post hoc test. Os valores foram considerados estatisticamente significativos a  $p < 0,001$ . A porcentagem de inibição foi determinada a partir da seguinte fórmula: % de inibição =  $100 \times (\text{controle} - \text{experimental} / \text{controle})$ .

### 4.3 Ensaios *in vivo*

#### 4.3.1 Avaliação toxicológica

##### 4.3.1.1 Animais utilizados nos protocolos

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Setorial de Experimentação, localizado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos durante todo o período de estudo em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com livre acesso a água e alimentação. Os procedimentos realizados estão de acordo com as normas internacionais preconizadas pela OECD e ocorreram com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (permissão N° 457/18)

##### 4.3.1.2. Toxicidade aguda

A avaliação toxicológica foi realizada através do Teste de Dose Fixa de acordo com a Diretriz 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)

(2000) com algumas modificações (LUSTOSA *et al.*, 2016; SERAFINI *et al.*, 2011). Os animais foram distribuídos em dois grupos de 5 animais cada. Por via oral (gavagem), os animais do grupo controle, receberam água destilada (0,1 mL/10 g de peso corporal) e o outro grupo recebeu MIB na dose de 2 g/kg. Logo após a administração, os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados durante as primeiras 8 horas, e depois diariamente por 14 dias, conforme reconhecimento do protocolo e avaliação dos sinais clínicos recomendados pela OCDE (2000). No 15º dia, amostras de sangue foram coletadas para análise de parâmetros bioquímicos. Após eutanásia, pulmões, fígado, coração, estômago, cérebro e rins foram retirados para avaliação morfológica e macroscópica.

#### **4.3.1.3 Avaliação de parâmetros clínicos e comportamentais**

Após administração da MIB na dose de 2 g/Kg, os animais foram monitorados nas primeiras 8 h, para observação da ocorrência de morte. Depois de 24 h, o tempo de observação, para cada grupo foi em torno de 30 minutos a 1 h. Os animais foram pesados diariamente e os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados conforme o Guia de Reconhecimento, Avaliação e Uso de Sinais Clínicos da OECD (OECD, 2002c). Os principais parâmetros avaliados estão listados na TABELA 1.

#### **4.3.1.4 Análise dos parâmetros bioquímicos**

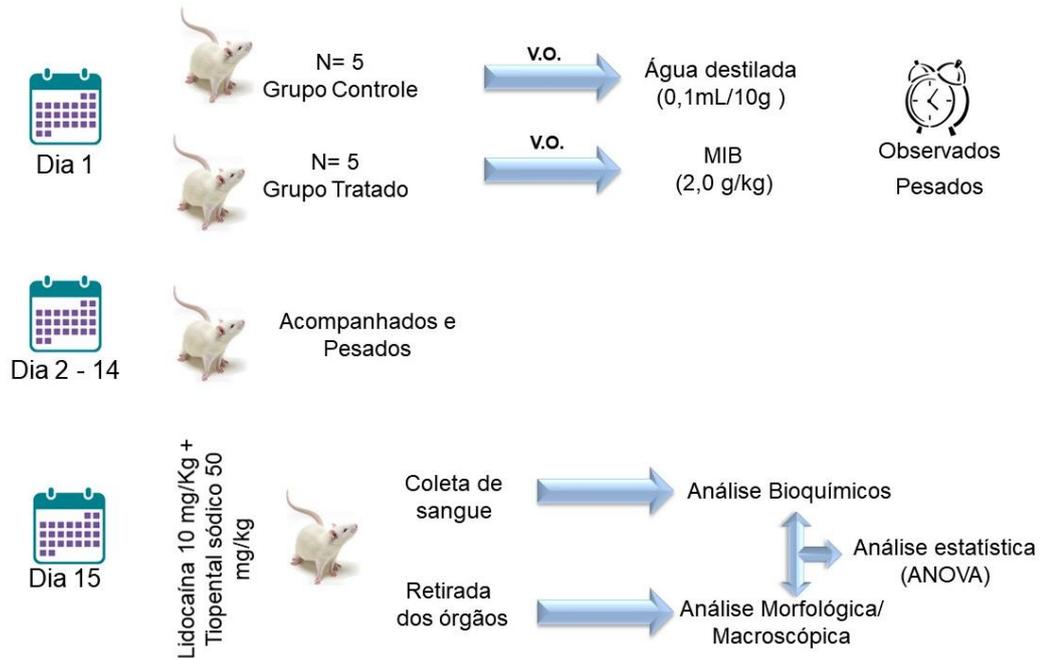
No 15º dia, os animais foram anestesiados com lidocaína 10 mg/kg e tiopental sódico 50 mg/kg. Em seguida as amostras de sangue foram coletadas dos animais pela veia cava abdominal e armazenadas em tubos para coleta com ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha). O material foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e posteriormente determinou-se: glicose, ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, fosfatase alcalina (FA) e proteínas. Os ensaios foram realizados em aparelho automático LABTEST® Pleno utilizando kits comerciais do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

#### **4.3.1.5 Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos animais**

As ratas foram pesadas diariamente durante 14 dias para elaboração de uma curva dose-efeito. No décimo quinto dia, após a eutanásia dos animais com uma dose letal de tiopental sódico (50 mg/kg, via intraperitoneal), os órgãos (rins, fígado, coração, pulmão, coração e estômago) foram coletados para análise morfológica e macroscópica quanto à textura, consistência e cor. Tendo o peso relativo dos mesmos sido calculado através da fórmula:  $[\text{peso do órgão (g)} / \text{peso do animal no dia da necropsia (g)} \times 100]$ . Além disso, investigou-se a presença de lesões gástricas de acordo com Fernandes *et al.* (2010). Após a

remoção e pesagem o estômago dos animais foram abertos em toda a grande curvatura, a fim de determinar a porcentagem de lesão gástrica, como segue:  $\text{área da lesão (\%)} = \text{área da lesão (mm}^2) \times 100 / \text{área total da superfície (mm}^2)$ , pelo NIH - Software Image J® (National Institutes of Health, Washington DC).

**Figura 12:** Esquema do teste de toxicidade aguda por via oral.



Fonte: Autoria Própria

#### 4.3.1.6 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do Teste t de Student para amostras não pareadas ou Análise de Variância (ANOVA) Two-way seguida dos pós-testes de Tukey ou Dunnett, para análise de significância entre os grupos. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o  $p < 0,05$ . Para todas as análises estatísticas e plotagem das curvas utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

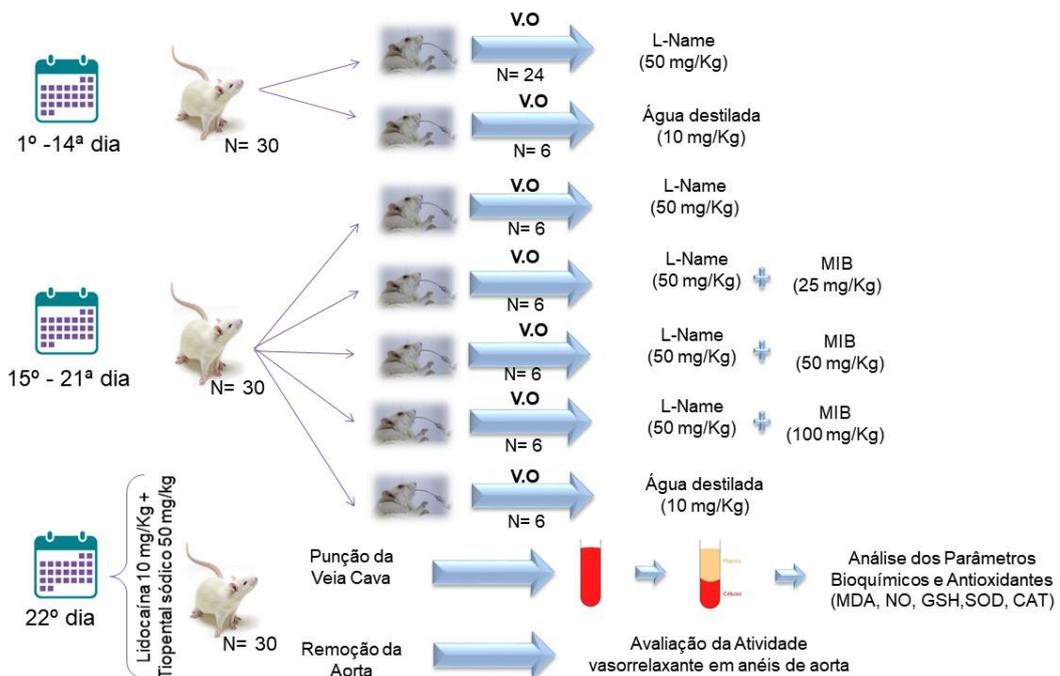
#### 4.3.2 Indução da Hipertensão Arterial Sistêmica

Ratos Wistar fêmeas (250 - 300 g), provenientes do Biotério Setorial de Experimentação, localizado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí, foram mantidos sob condições de controle de temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) em ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Os Procedimentos referentes à eutanásia dos animais ocorreram em conformidade com à

Resolução N° 1000/2012, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA-UFPI) N° 457/18.

Para a realização deste ensaio, utilizou-se o protocolo de indução de hipertensão por L-NAME (L-nitroarginina metil éster), que é um inibidor não seletivo da enzima Óxido Nítrico Sintase constitutiva (NOSc), com o objetivo de causar mudanças na pressão arterial e na reatividade vascular devido à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (KOPINCOVÁ *et al.*, 2012), desenvolvendo também um processo oxidativo (BANIN, 2011; KOPINCOVÁ *et al.*, 2012).

**Figura 13:** Esquema de pré-indução da hipertensão arterial pelo L-NAME em animais submetidos ao tratamento com a MIB para avaliação da atividade antioxidante e da reatividade vascular.



Fonte: Autoria Própria

As ratas foram divididas em grupos com 06 animais: um grupo tratado apenas LNAME (50 mg/kg) + Veículo (G1), outros três grupos tratados com a MIB nas doses de 25 mg/kg (G2), 50 mg/kg (G3) ou 100 mg/kg (G4), aliados ao tratamento com L-NAME e um grupo tratado com água (G5). Nos primeiros 14 dias do protocolo, todos os animais dos 4 primeiros grupos receberam L-NAME por via oral para indução da hipertensão enquanto o grupo controle recebia água. Nos próximos 7 dias do protocolo, os animais dos grupos G2, G3 e G4 receberam respectivamente 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg da MIB completando assim 21 dias de protocolo. Após esse período, os animais foram anestesiados com tiopental

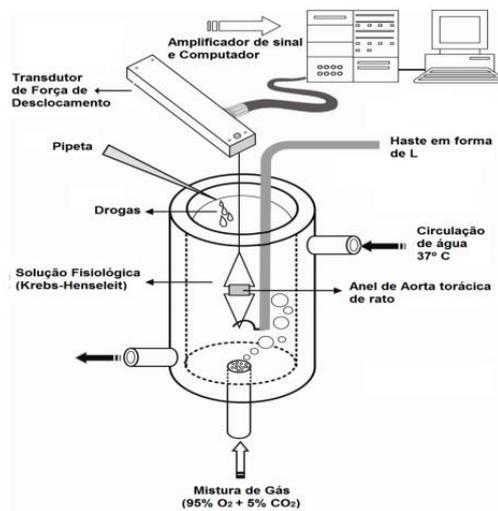
sódico 50 mg/kg e lidocaína 10 mg/kg e amostras de sangue foram colhidas para realização dos ensaios antioxidantes, e segmentos da artéria aorta torácica foram retiradas para realização do ensaio de reatividade vascular.

### 4.3.3 Avaliação da reatividade vascular induzida pela MIB em anéis de aorta de ratas hipertensas L-NAME.

#### 4.3.3.1 Preparações de anéis de artéria aortica

Após eutanásia, a porção torácica da artéria aorta foi retiradas através de uma incisão na linha média do tórax e abdome. Após remoção do tecido perivascular, as artérias foram seccionadas em 4 anéis (aproximadamente 4 mm cada), e mantidas em cubas de 10 mL para órgão isolado contendo Solução de Krebs (em mM: NaCl [118]; KCl [4,6]; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O [2,5]; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O [5,7]; NaHCO<sub>3</sub> [25]; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [1,1]; e D-Glucose [11]), sob tensão de 1,0 g, 37°C e aerados com mistura de CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 21% e N<sub>2</sub> 74% (ARCANJO *et al.*, 2015; HEDEGAARD *et al.*, 2016). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão e fixados a transdutores de força acoplados a um sistema de aquisição de dados para o registro das tensões isométricas (Figura 14) (AQCAD 2.3.8., AVS Projetos, SP, Brasil). As preparações foram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual foram mantidos sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva foi renovada a cada 15 min para prevenir a interferencia de metabólitos. A presença de endotélio funcional será confirmada com a indução de pelo menos 70% de vasorrelaxamento induzido por acetilcolina (10<sup>-6</sup> μM) sobre pré-contracção induzida por fenilefrina (3x 10<sup>-7</sup> μM) (ARCANJO *et al.*, 2015).

**Figura 14:** Diagrama esquemático de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos



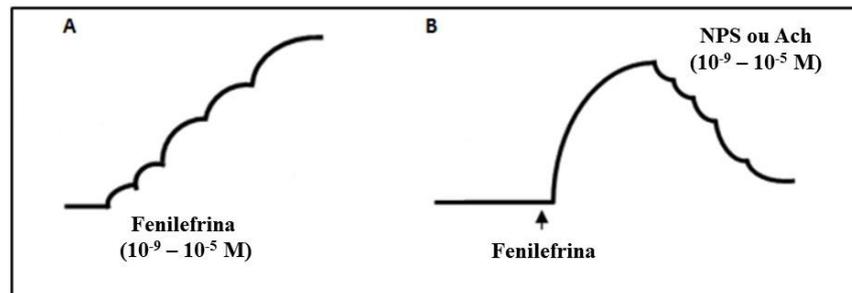
Fonte: Adaptado de OGUZHAN YILDIZ, 2013.

#### 4.3.3.2 Avaliação da reatividade vascular *ex vivo* à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio

Após a realização do teste de integridade do endotélio os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, esses anéis foram submetidos aos diferentes protocolos experimentais, objetivando avaliar os efeitos do tratamento agudo da MIB, em diferentes concentrações, sob a reatividade vascular da aorta de animais pré-tratados com L-NAME, como demonstrando em protocolo experimental.

Após 60 minutos de estabilização, os segmentos aorticos foram pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M) para obtenção de curvas concentração-resposta ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) para acetilcolina - ACh (relaxamento dependente do endotélio), e nitroprussiato de sódio - NPS (relaxamento independente do endotélio) (Figura 15). Os resultados para cada concentração foram expressos em percentual da contração máxima obtida pela fenilefrina.

**Figura 15:** A) Esquema representativo da resposta vascular à curva concentração-resposta à Phe; B) Esquema representativo da resposta vascular á curva concentração resposta à ACh ou NPS (Modificado de Peçanha, 2009)



#### 4.3.4 Avaliação da atividade antioxidante da MIB

##### 4.3.4.1 Efeito da MIB sobre a atividade plasmática da mieloperoxidase (MPO)

A medida de atividade da MPO baseou-se na velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina na presença de  $H_2O_2$ , realizada pela observação do aumento da absorbância da mistura a 450 nm (BRADLEY *et al.*, 1982). A leitura foi realizada em microplaca ELISA por adição de 10  $\mu$ L de plasma em 200  $\mu$ L da solução de leitura, constituída com 27 mL de  $H_2O$  destilada, 3 mL de tampão fosfato pH 6,0, 15 mL de  $H_2O_2$  a 1% e 5 mg de o-dianisidina. A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada pela observação do aumento da absorbância da mistura a 450 nm, obtendo-se leitura no tempo zero e após um minuto. A atividade da MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação, e o resultado expresso em unidade de

MPO por microlitro (U MPO/ $\mu$ L) de amostra, sendo uma unidade de MPO definida como a quantidade em  $\mu$ mol de  $H_2O_2$ .

#### **4.3.4.2 Determinação dos níveis de concentração plasmáticas de MDA**

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi introduzido por Kwon e Watts (1964), é dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica. A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) originando composto rosa. Esse composto, quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol), tem sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das TBARS para posterior dosagem de MDA em diferentes materiais biológicos utilizado para estimar a peroxidação lipídica.

Para a determinação da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que promovem uma lipoperoxidação, usou-se o método descrito por WINTERBOURN, GUTTERIDGE E HALLIWELL (1985). Tomou-se 0,2 mL do plasma, o qual se adicionou 0,5 mL de HCl (25%), 45  $\mu$ L de BHT etanólico (2%) e 0,5 mL de TBA (1% p/v em NaOH 0,05 M). A solução foi agitada em vortex e colocada em banho fervente por 10 minutos, seguindo-se o resfriamento em banho de gelo. Adicionou-se 1,5 mL de n-butanol, agitou-se e centrifugou-se a 1500  $\times$ g. após a centrifugação, coletou-se a fase superior, que foi analisada espectrofotometricamente, a 510, 532 e 560 nm. Os resultados foram expressos em nol de equivalentes de MDA/mL de plasma.

#### **4.3.4.3 Determinação da concentração de grupos sulfídricos não proteicos (glutathione – GSH) nos eritrócitos.**

A determinação de GSH no sangue foi realizado pelo método do ácidoditionitrobenzóico (DTNB), descrito por Beutler *et al.* (1963). Para o preparo da amostra de GSH, 200  $\mu$ L de sangue contendo  $Na_2EDTA$  foi homogeneizada com 1,8 mL de água destilada, obtendo o hemolisado. Imediatamente foram adicionados 3 mL da solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial; 0,20 g de EDTA; 30,0 g de NaCl; em 100 mL de água purificada) e o material foi mantido em repouso por 5 min. Posteriormente, em 200  $\mu$ L do sobrenadante, foram adicionados 0,8 mL de solução tampão fosfato (42,6 g de  $NaHPO$  em 1000 mL de água purificada). Esta solução foi transferida para cubetas de leitura no espectrofotômetro, onde foram acrescentados 100  $\mu$ L de ácido ditionitrobenzóico (1,0 g de

citrato de sódio; 40 mg de DTNB em 100 mL de água purificada) e a leitura efetuada em até 30 segundos. A absorbância foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm, e posteriormente calculada a concentração de glutatona reduzida.

#### **4.3.4.5 Efeito da MIB sobre a atividade da Superóxido dismutase (SOD) eritrocitária**

A atividade da enzima foi determinada de acordo com o método descrito por Das, Samanta e Chainy (2000), em que foi analisada a quantidade de SOD capaz de inibir em 50% a formação de nitrito em reação de ponto final. A reação foi iniciada pela adição de 1.110 µL de tampão fosfato, 75 µL L-metionina, 40 µL de Triton X-100, 75 µL de cloreto de hidroxilamina, 100 µL de EDTA e 100 µL da amostra ou tampão fosfato (branco). A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos e posteriormente adicionou-se 80 µL de riboflavina, expondo a luz durante 10 minutos. Por fim, 1 mL do reagente de Griess foi adicionado ao sistema, realizando-se a leitura em leitor de placas automático modelo SynergyMx, utilizando comprimento de onda de 543 nm. A determinação foi feita em duplicata e os resultados foram expressos em U/g de hemoglobina. Uma curva analítica de calibração foi construída utilizando nitrito de sódio em concentrações variando entre 5 e 50 µM. O cálculo da atividade da SOD foi feito com base na absorbância do controle (v0) e absorbância do teste (v), conforme a fórmula:  $SOD = v0 / v - 1$ .

#### **4.3.4.6 Efeito da MIB sobre a atividade da Catalase (CAT) nos eritrócitos.**

A preparação da amostra iniciava-se com a adição de 900 µL de tampão fosfato, pH 7.4, a 100 µL do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1µl foi adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50 mm, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10mM. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT. A atividade de CAT foi calculada usando o coeficiente de extinção molar e os resultados foram expressos em nmol de CAT por miligrama de Hg.

#### **4.3.4.7 Dosagem de hemoglobina no hemolisado**

A determinação da concentração de Hb no hemolisado torna-se fundamental para a obtenção dos valores finais de SOD, GSH e CAT. Os valores foram obtidos através do método de Drabkin, em que a Hb (100 µL da amostra preparada a partir do hemolisado 1:20),

em presença de reagente de Drabkin (2 mL), forma um composto, a cianometaemoglobina, que é absorvida a 540 nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é  $11,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **4.3.4.8 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em médias e erro padrão da média. Para comparação de médias entre os grupos no momento final do experimento foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparação múltipla de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. Para análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

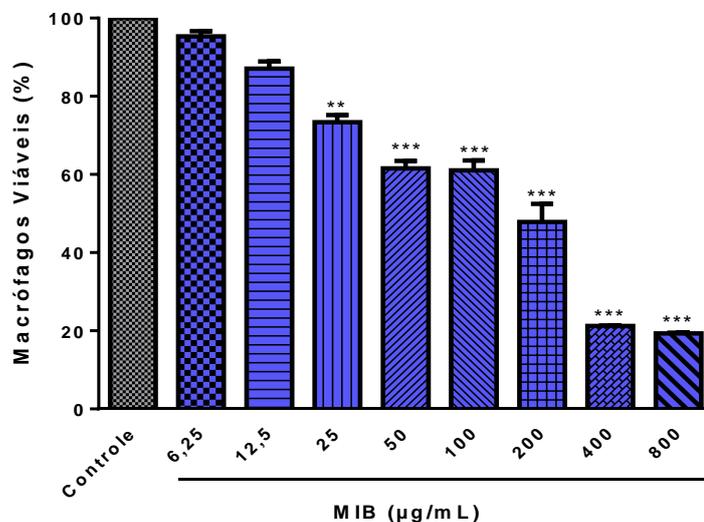
### 5.1 Avaliação toxicológica *in vitro*

Ensaio de citotoxicidade são essenciais para a elaboração de novos fármacos, pois definem a faixa de concentrações que serão utilizadas nos estágios não clínicos de desenvolvimento, sendo alguns capazes de estimar a dose de partida a ser utilizada no estudo toxicológico *in vivo*, seguindo o Princípio dos 3Rs (do inglês: Replacement, Reduction and Refinement), permitindo a realização de diversos métodos alternativos ao uso de animais (ARAÚJO *et al.*, 2014; OECD, 2010).

O ensaio do MTT é um teste colorimétrico clássico de viabilidade celular sendo utilizado para medir a atividade metabólica de células viáveis. Este teste avalia a função mitocondrial celular através da redução enzimática do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais em células viáveis, levando a formação do formazan, um sal insolúvel de coloração arroxeada (MOSMANN, 1983). Por causa da relação linear entre atividade celular e absorvância, o crescimento ou taxa de morte de células pode ser mensurado (ATCC, 2001).

Na avaliação de um possível efeito citotóxico induzido pela MIB em macrófagos murinos, foi observada uma redução da viabilidade celular por avaliação da atividade mitocondrial de modo dependente de concentração (Figura 16), com valor de concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) igual a 124,036 µg/ml.

**Figura 16:** Efeito citotóxico da MIB sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os resultados foram expressos como média ± EPM. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 quando comparado com o grupo controle.



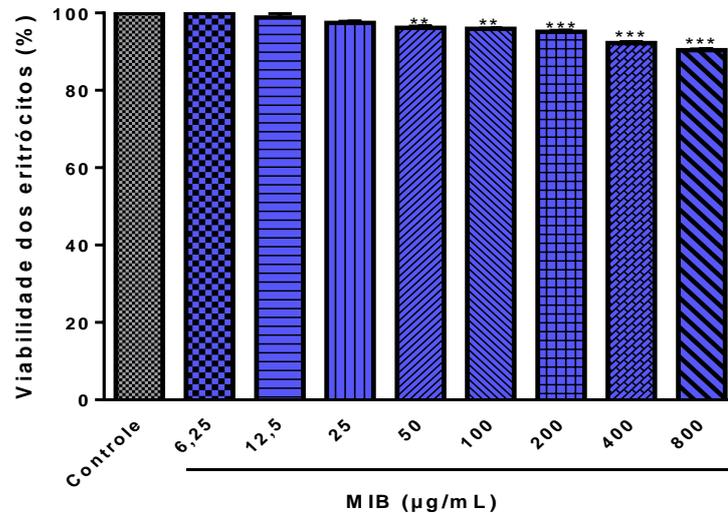
Fonte: Autoria Própria

Por intermédio de diversos estudos com extratos vegetais, MEYER *et al.*, (1982) estabeleceu uma associação entre a concentração letal média ( $CL_{50}$ ) e o grau de toxicidade, constatando que extratos com  $CL_{50}$  menor que 80  $\mu\text{g/ml}$  apresentam-se moderadamente tóxicos, extratos com  $CL_{50}$  entre 80  $\mu\text{g/ml}$  e 250  $\mu\text{g/ml}$  são pouco tóxicos e valores acima 1000  $\mu\text{g/mL}$ , são considerados atóxicos. Segundo ANDRADE (2013), quanto menor o valor do  $CC_{50}$  mais citotóxico é o composto avaliado frente à espécie celular empregado. Dessa maneira, a MIB foi classificada como moderadamente citotóxico ( $100 \mu\text{g/mL} < CC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ ) em comparação com dados já reportados por LUSTOSA *et al.*, 2016 para o Extrato Hexânico da Semente do Bacuri (EHSB) que apresentou valor de  $CC_{50}$  igual a 90,03  $\mu\text{g/mL}$ , pode-se afirmar que a MIB apresenta um perfil de segurança maior frente ao organismo.

Efeitos citotóxicos de diferentes substâncias podem estar relacionados com irregularidades estruturais na membrana celular (HADNAGY *et al.*, 2003). No eritrócito, esta é uma estrutura delicada que pode ser danificada por ação de medicamentos (AKI e YAMAMOTO, 1991). Vários estudos indicam que certos metabolitos vegetais, tais como polifenóis, saponinas, triterpenoides e glicosídeos, podem causar modificações nas membranas dos glóbulos vermelhos propiciando à hemólise (BADER *et al.*, 1996; GRINBERG *et al.*, 1997). Com base neste fato, é possível concluir que a estabilidade mecânica da membrana das hemácias é um critério de avaliação citotóxica de uma droga em desenvolvimento frente às células saudáveis do organismo, sinalizando uma possível toxicidade *in vivo* (AKI e YAMAMOTO, 1991; SILVA, 2007).

Segundo os critérios estabelecidos por NOFIANI *et al.*, (2011), uma taxa de hemólise superior a 40% é considerada elevada e inferior a 10% é dita baixa. Assim, a MIB apresenta uma baixa citotoxicidade uma vez que ela promoveu menos de 10% de hemólise na concentração mais alta testada (800  $\mu\text{g/ml}$ ), não sendo possível determinar a concentração hemolítica média. Dessa forma, os resultados indicam que a MIB apresenta perfil toxicológico *in vitro* aceitável, permitindo a aplicação de modelos toxicológicos *in vivo* de forma segura para uma avaliação mais profunda sobre seu perfil de segurança, permitindo suas aplicações no desenvolvimento de novos produtos

**Figura 17:** Atividade hemolítica da MIB em eritrócitos obtidos de sangue de carneiro. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando com grupo controle.



Fonte: Autoria Própria

## 5.2 Avaliação do potencial antioxidante in vitro

No tocante à investigação da atividade antioxidante da MIB, deve-se mencionar a presença de substâncias com esta atividade nas sementes da espécie. Investigações sobre a composição química das plantas da família Clusiaceae mostraram que estas são ricas em xantonas, benzofenonas poliisopreniladas, flavonóides, ácidos fenólicos e lactonas, (BAGGETT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2010; PICCINELLI *et al.*, 2009), substâncias naturais que despertam grande interesse devido às atividades farmacológicas que apresentam. As xantonas têm sido relatadas por inibir a síntese de prostaglandina E2 e peroxidação de lipídios, demonstrando assim seu potencial antioxidante. (ZARENA e UDAYA SANKAR, 2009).

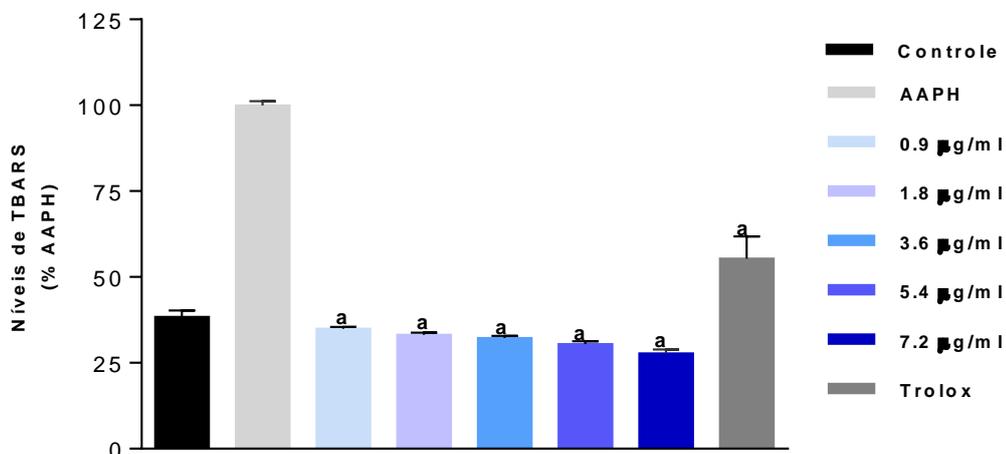
Na avaliação da atividade antioxidante da MIB contra a formação de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico, foi utilizado o método TBARS, amplamente empregado para quantificar a peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular causado pelo estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2012a). A atividade antioxidante de fontes naturais é devida aos compostos ativos presentes nas plantas. Conforme PRATT E HUDSON (1992), os antioxidantes naturais podem ser encontrados em diversas partes do vegetal (madeira, casca, caule, folhas, frutos, raízes, flores e sementes). A maioria destes constituintes químicos são, normalmente, compostos fenólicos ou polifenólicos na natureza, por exemplo, os tocoferóis, flavonóides e derivados de ácido cinâmico, ácidos orgânicos fosfatídicos e

outros (HUANG *et al.*, 2005). O AAPH, composto azo hidrossolúvel, é usado como gerador de radicais livres. Sua decomposição produz radicais nitrogênio e carbonila moleculares, que, por sua vez, reagem com o ácido tiobarbitúrico, resultando na formação de TBARS (FITÓ, LA TORRE; COVAS, 2007; MOON; SHIBAMOTO, 2009; SERAFINI *et al.*, 2011; ZIN; HAMID, OSMAN, 2002).

Sabe-se que mudanças na permeabilidade seletiva das membranas, como consequência do processo de lipoperoxidação, alteram os fluxos iônico e de outras substâncias resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e de substâncias tóxicas à célula com acometimentos dos componentes da matriz extracelular além produzir mudanças vasculares que controlam a pressão arterial (AMARAL, 2014; LIMA *et al.*, 2002).

No presente estudo, a manteiga industrializada do bacuri (MIB) em todas as concentrações testadas, foi capaz inibir a peroxidação lipídica induzida pela AAPH, observada pela redução da quantidade de TBARS formada (Figura 18). As concentrações utilizadas de MIB (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 mg/ml) proporcionaram redução na produção de TBARS em (65,07%; 66,81%; 67,76%; 69,05%; 72,29%) respectivamente. O trolox, análogo do  $\alpha$ -tocoferol, produziu uma diminuição na produção de TBARS de 44,64%. Dessa forma, podese perceber que a MIB reduziu a produção de TBARS em todas as concentrações testadas, sugerindo que a manteiga pode exercer um efeito antioxidante protetor de biomoléculas lipídicas *in vitro*.

**Figura 18:** Atividade Antioxidante da MIB pela reduções dos níveis de TBARS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

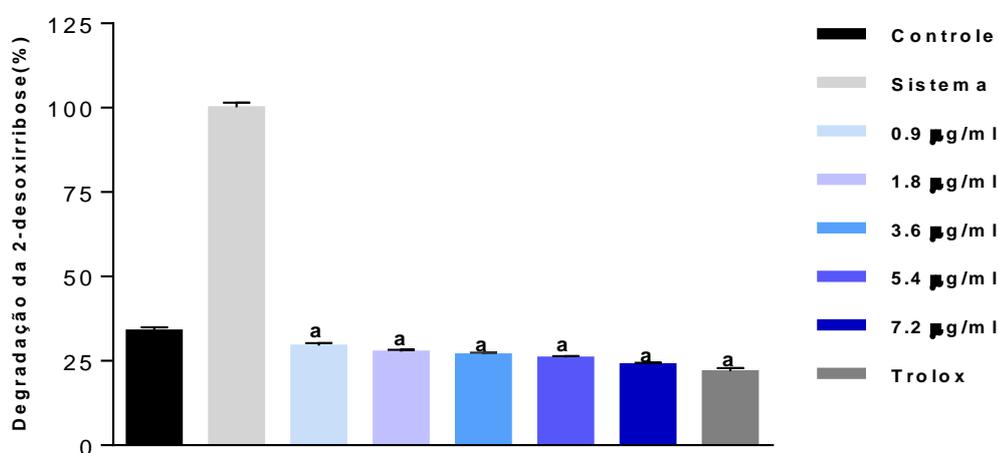


Fonte: Autoria Própria

Outra metodologia utilizada para avaliar o potencial antioxidante de uma substância é baseada na capacidade de remover radicais livres formados em espécies menos reativas, o que pode estar diretamente relacionado à sua atividade antioxidante (HOELZL *et al.*, 2005). O radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) é uma espécie altamente reativa capaz de causar danos ao DNA, proteínas, enzimas e aminoácidos. (SERAFINI *et al.*, 2011; SHUKLA *et al.*, 2009). Além disso, ele pode reagir com os fosfolipídios de membrana, promovendo a sua desorganização, formando radicais precursores da peroxidação lipídica como os radicais alcóxila ( $\text{LO}\bullet$ ), peróxila ( $\text{LOO}\bullet$ ) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (BARREIROS *et al.*, 2006; CHE, HU e WANG, 2012).

A 2-desoxirribose, exposta a reação de Fenton ( $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \bullet\text{OH} + \text{-OH}$ ), reage com o radical hidroxila formando malonaldeído, quem será quantificado exibindo assim indiretamente a capacidade oxidativa da MIB em capturar o  $\bullet\text{OH}$  (HUANG *et al.*, 2005; PAYA *et al.*, 1992; SERAFINI *et al.*, 2011). Dessa forma, pode-se observar que a MIB nas concentrações utilizadas (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 mg/ml) exibiu uma atividade antioxidante significativa capaz de inibir o dano celular causado por esse radical proporcionando uma redução na degradação da 2-desoxirribose em 70,57%; 72,21%; 73,03%; 73,99%; 76,01% respectivamente. Ação semelhante foi observada com o Trolox (48,64%), que também reduziu significativamente a quantidade de MDA formada (Figura 19).

**Figura 19:** Atividade antioxidante da MIB pela remoção do radical hidroxila. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.



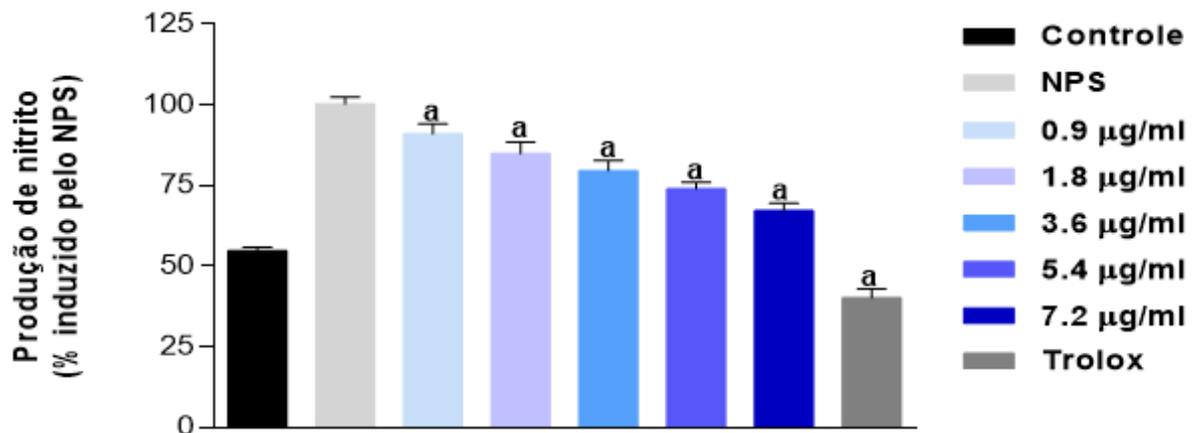
Fonte: Autoria Própria

O método de inibição de produção do radical nitrito para avaliação da atividade antioxidante também foi utilizado, baseado na produção de  $\text{NO}\bullet$  a partir da decomposição de

nitroprussiato de sódio em solução aquosa (RAMOS *et al.*, 2006). Por sua vez, o radical NO• reage com o oxigênio gerando o radical nitrito, o qual reage com o radical de óxido nítrico e forma-se o anidrido nitroso, um reagente nitrosante (SYKES, 1991). O anidrido nitroso, ao reagir com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e dicloridrato de N- (1-naftil)etilenodiamina) a 1% em água, forma um composto diazo de cor violeta, um cromóforo de absorção máxima em 546 nm. Se no meio reacional existirem substâncias antioxidantes, estas vão competir com o oxigênio, e a produção do radical nitrito NO<sup>2•</sup> será reduzida, caracterizando a atividade antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2012; SERAFINI *et al.*, 2011).

Neste estudo, o MIB reduziu significativamente a produção de nitrito (Figura 20), demonstrando novamente as suas propriedades antioxidantes contra os danos causados pelos radicais livres. Nas concentrações utilizadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 mg/ml), a MIB produziu a remoção do radical nitrito em (8,91%; 15,04%; 20,31%; 26,03%, 32,81%) respectivamente. O controle usado análogo do  $\alpha$ -tocoferol produziu uma depuração contra a formação do radical nitrito em 59,76%.

**Figura 20:** Atividade antioxidante da MIB pela inibição da produção do radical nitrito. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.



Fonte: Autoria Própria

O NO é uma molécula sinalizadora envolvida em muitos processos fisiológicos (manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária) (KAWANO *et al.*, 2009; SOUSA; PRADO, 2011) e patológicos (formação de espécies reativas com efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios potentes) (BECKMAN *et al.*, 1990; QUINTANS, JR. *et al.*, 2011) de extrema importância dentro dos sistemas oxidativos, uma vez que ele induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada

muscular do vaso e extracelular, diminuindo o  $O^{2-}$  disponível e, conseqüentemente, a produção de  $ONOO^-$ , além de induzir a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de  $O^{2-}$  (DUSSE, *et al.*, 2003). Assim, o efeito do MIB inibindo a formação de  $NO_2$  previne o surgimento/proliferação de ação deletérias como também contribui positivamente para a atuação do NO sob o sistema vascular e antioxidante.

### 5.3 Avaliação toxicológica in vivo

Com o auxílio da toxicologia, antecipa-se o risco e reduz-se a probabilidade de novas drogas falharem e de serem excluídas em estágios subsequentes do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, evitando-se assim desperdício financeiro e de materiais. A identificação dos riscos revela o grau de periculosidade da nova substância no organismo, bem como o potencial de reversibilidade ou irreversibilidade de seus efeitos (DENNY, *et al.*, 2013), sendo primordial o conhecimento adquirido durante estes ensaios para delinear a dose inicial, o intervalo terapêutico e os potenciais efeitos adversos que poderão ocorrer durante os ensaios clínicos (LAVANDEIRA, 2014).

Nessa perspectiva, a investigação toxicológica de produtos naturais visa estabelecer uma gama segura e eficaz de doses para novos fármacos e formulações farmacêuticas. Em nosso estudo, a MIB não provocou nenhuma morte durante os quatorze dias de observação após administração oral da dose de 2,0 g/kg em ratas Wistar, indicando ausência de toxicidade para a dose e esquema de administração avaliado. Além disso, ao longo do protocolo, nenhum animal apresentou qualquer alteração clínica ou comportamental aparente, permanecendo em bom estado até o final do estudo (Tabela 1). Logo, não foi possível determinar a  $DL_{50}$  para o extrato utilizado, sugerindo classificação na categoria 5 do GHS.

O desequilíbrio no desenvolvimento ponderal dos animais em tratamento são sinais de toxicidade sistêmica, uma vez que a perda de peso pode indicar doenças como câncer, distúrbios renais, dor ou estresse. Já o aumento de peso sinaliza distúrbios metabólicos que levam ao aumento do consumo da ração ou formação de grandes tumores (GONZALEZ; SILVA, 2006; MELO, *et al.*, 2001). No presente estudo, observou-se um ganho de peso significativo ao longo dos 14 dias nos animais que receberam uma dose única da MIB (2,0 g/kg) em comparação com o grupo controle (Figura 21). No entanto, o ganho de massa ponderal isoladamente não caracteriza um distúrbio sendo necessário dados alterações bioquímicas, hematológicas ou histológicas que justifiquem tal achados.

Nessa perspectiva, as aminotransferases séricas (ALT e AST) e a fosfatase alcalina (FA), são importantes indicadores de lesões hepáticas (MOTTA, 2003). Logo, a dosagem

dessas enzimas permite averiguar a presença de alterações da permeabilidade dos hepatócitos pela elevação de ALT e AST, assim como de desordens colestáticas pela elevação da FA (MONCORVO *et al.*, 1998). No presente estudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais tratados em relação ao grupo controle (Tabela 2), sugerindo assim ausência de alterações na função hepática.

**Tabela 1:** Sinais clínicos e comportamentais avaliados ao longo de 14 dias após a administração aguda da MIB (2,0 g/kg) e água destilada por via oral.

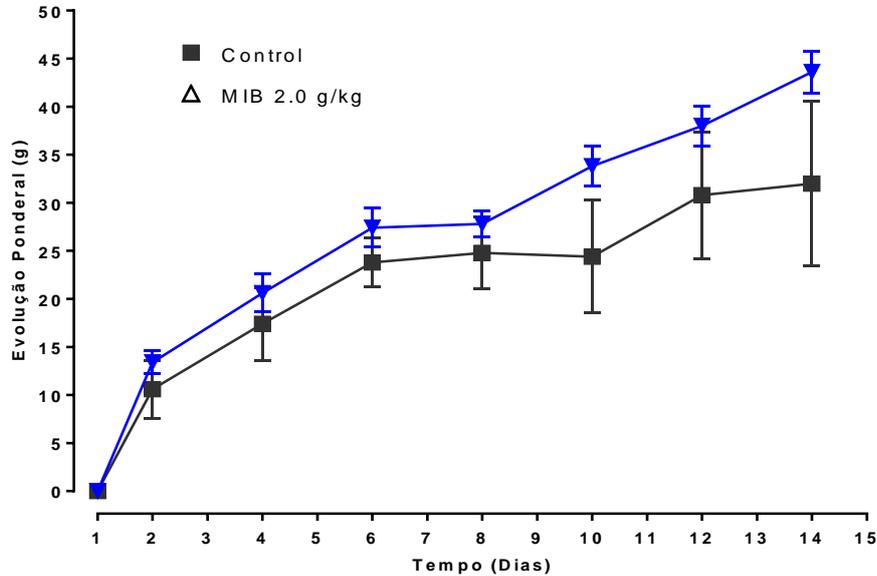
ATIVIDADE	Controle			MIB		
	1.º dia	7.º dia	14.º dia	1.º dia	7.º dia	14.º dia
<b>ESTIMULANTE</b>						
Hiperatividade	0	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0	0
<b>DEPRESSOR</b>						
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0	0
Reflexo Corneal	0	0	0	0	0	0
Reflexo Auricular	0	0	0	0	0	0
<b>SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO</b>						
Defecação	0	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0	0
<b>OUTROS COMPORTAMENTOS</b>						
Ambulação	0	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0	0
Vocalizações	0	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0	0
<b>MORTE</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Fonte: Autoria Própria

As concentrações de creatinina, um catabólito do metabolismo muscular cujos valores de referência variam entre 0,5 e 0,9 mg/dL para as fêmeas, e de ureia, um composto não tóxico sintetizado mediante a degradação dos aminoácidos, funcionam como parâmetro de avaliação da função renal uma vez que sua excreção se dar quase que exclusivamente por filtração glomerular (ANDRIOLO & ROCHA, 2007). Assim, quando em altas concentrações,

esses biomarcadores sinalizam uma lesão renal. No presente estudo, a avaliação realizada sugere que a MIB não promoveu danos aos rins nas doses administradas devido à ausência de alterações bioquímicas nas análises de creatinina, em relação ao grupo controle.

**Figura 21:** Evolução ponderal em gramas de ratas Wistar tratadas com veículo ou MIB (2,0 g/kg) por via oral. Dados representados por média  $\pm$  EPM (n=5/grupo).



Fonte: Autoria Própria

O colesterol, sintetizado em sua maior parte pelo fígado, constitui diversos tecidos do corpo humano, sendo regulado por um sistema compensatório. Seu transporte é realizado pela ação das lipoproteínas devido ao seu caráter apolar (MOTTA, 2003). O aumento nos níveis de colesterol no sangue é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, que frequentemente leva a doenças circulatórias, cerebrovasculares e doenças vasculares periféricas (RADOVANOVIC *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2008). A administração da MIB na dose de 2,0 g/kg não promoveu uma redução estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos do colesterol total.

Outros biomarcadores fisiológicos relacionados com as proteínas plasmáticas são albumina, globulinas, enzimas, proteína específica de transporte, hormônios proteicos e fatores de coagulação, cujas dosagens fornecem um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e para a presença de doenças sistêmicas severas (BUSH, 2004; KERR, 2003; THRALL, 2007). Quando em altas concentrações, podem significar deficiência relativa de água, doença inflamatória crônica e doença imunomediada. Em contrapartida, sua diminuição é causada normalmente por perda renal, intestinal, hemorragias, queimaduras e por diminuição da síntese de proteínas, sinalizando insuficiência hepática (CUNHA *et al.*, 2013;

GOMES; KIRSZTAJN, 2011). No presente estudo, os valores de proteínas totais 14 dias após a administração da MIB mantiveram-se estatisticamente constantes, indicando ausência de efeitos tóxicos. Por tanto, levando-se em consideração os resultados registrados neste teste, não houve modificações significativas no perfil bioquímico, em comparação com o grupo controle como registrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos em ratas Wistar fêmeas tratadas com a MIB por via oral. Os valores representam à média  $\pm$  EPM

Parâmetros	Controle	MIB
Proteínas Totais (mg/dl)	6,96 $\pm$ 0,103	6,40 $\pm$ 0,141
Albumina (mg/dl)	4,02 $\pm$ 0,143	4,16 $\pm$ 0,087
Fosfatase Alcalina (U/L)	214,80 $\pm$ 29,986	138,20 $\pm$ 20,30
ALT (U/L)	59,20 $\pm$ 4,409	58,20 $\pm$ 5,342
AST (U/L)	108,00 $\pm$ 6,790	98,40 $\pm$ 3,696
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,10 $\pm$ 0,000	0,10 $\pm$ 0,000
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0,036 $\pm$ 0,006	0,036 $\pm$ 0,005
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	0,064 $\pm$ 0,006	0,064 $\pm$ 0,005
Creatinina (mg /dl)	0,30 $\pm$ 0,032	0,28 $\pm$ 0,037
Ácido Úrico (mg/dl)	0,68 $\pm$ 0,049	1,12 $\pm$ 0,402
Colesterol (mg/dl)	118,50 $\pm$ 6,083	105,0 $\pm$ 9,00
Triglicerídeos (mg/dl)	98,50 $\pm$ 20,857	87,2 $\pm$ 13,021
Sódio (mmol/l)	142,00 $\pm$ 1,140	140,60 $\pm$ 0,60
Potássio (mmol/l)	3,74 $\pm$ 0,125	3,82 $\pm$ 0,111
Cloro (mmol/l)	101,60 $\pm$ 1,364	102,40 $\pm$ 0,510

Fonte: Autoria Própria

Segundo GONZALEZ E SILVA (2006), outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, uma vez que tais parâmetros refletem o funcionamento das principais vias metabólicas do organismo. Dessa forma, alterações de peso de órgãos são frequentemente associadas a efeitos relacionados a tratamento farmacológico. A escolha dos órgãos apropriados para avaliação nos estudos de toxicologia envolve a compreensão do mecanismo de ação da substância-teste, do metabolismo e da toxicocinética; A fisiologia das espécies de teste; e o conjunto cumulativo de dados de estudos anteriores dos mesmos ou composto ou materiais semelhantes (LONG *et al.*, 1998<sup>a</sup>).

Alterações no peso do fígado podem sugerir alterações relacionadas ao tratamento, incluindo hipertrofia hepatocelular. O aumento do peso cardíaco pode ser a única evidência de hipertrofia miocárdica que é muitas vezes macroscópica e microscopicamente difícil de reconhecer. As alterações no peso do rim podem refletir toxicidade renal, hipertrofia tubular ou nefropatia crônica progressiva (GREAVES, 2011; MICHAEL *et al.*, 2007).

Sob tal enfoque, a análise macroscópica dos órgãos, assim como o seu peso relativo, após a administração da MIB por via oral não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle. Além disso, não foram observadas lesões gástricas em nenhum grupo tratado. De maneira geral, pode-se inferir que a MIB em dose única de 2,0 g/kg administradas por via oral em ratas Wistar não apresentou efeito tóxico. Tais resultados abrem perspectivas para estudos de prova de conceito não clínica com o extrato da *Platonia insignis*, visando o desenvolvimento de novos produtos com diversas aplicações farmacológicas e terapêuticas.

**Tabela 3:** Peso médio relativo dos órgãos dos animais após 14 dias do tratamento agudo com veículo ou a MIB por via oral na dose de 2,0 g/kg. Os valores representam à média  $\pm$  EPM.

Órgãos	Peso Médio Relativo (g)	
	Controle	MIB
Pulmões	0,652 $\pm$ 0,063	0,501 $\pm$ 0,021
Fígado	3,745 $\pm$ 0,304	3,875 $\pm$ 0,192
Coração	0,336 $\pm$ 0,007	0,431 $\pm$ 0,100
Estômago	0,701 $\pm$ 0,037	0,740 $\pm$ 0,042
Cérebro	0,814 $\pm$ 0,030	0,821 $\pm$ 0,035
Rim Direito	0,363 $\pm$ 0,010	0,359 $\pm$ 0,011
Rim Esquerdo	0,349 $\pm$ 0,010	0,344 $\pm$ 0,075

Fonte: Autoria Própria

#### 5.4 Reatividade vascular

A via do óxido nítrico (NO) é um importante sistema regulador da circulação. A forma endotelial da enzima NO sintase é expressa constitutivamente e produz NO sob condições basais (MONCADA *et al.*, 1991), bem como em resposta ao estresse de cisalhamento (PRABHU, 2004) e agonistas operados por receptores, como a acetilcolina (PALMER, *et al.*, 1988; YANG, *et al.*, 1991). O NO é um nitrovasodilatador endógeno produzido em grandes artérias de condutos e também na circulação de resistência. Os

inibidores da síntese de NO, reduzem acentuadamente o fluxo sanguíneo local (MEYER, *et al.*, 1995), e quando infundidos *in vivo*, induzem hipertensão arterial sistêmica sustentada (CALVER, *et al.*, 1992; GARDINER *et al.*, 1990). O mecanismo preciso baseia-se no fato de que o L-NAME, um análogo estrutural da L-arginina, ao ser metabolizado por hidrólise não enzimática na forma ativa, N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NOARG), se liga competitivamente à NOS endotelial (PFEIFFER *et al.*, 1996). A inibição desta, atenua a síntese e o metabolismo do NO, a menor molécula de sinalização intercelular gasosa que medeia o relaxamento vascular. Posteriormente, a deficiência de NO leva a vasoconstrição sistêmica e hipertensão (HOPKINS, *et al.*, 2013).

A hipertensão induzida por L-NAME, por seu peculiar mecanismo de ação, permite o estudo *in vivo* dos efeitos da deficiência prolongada de NO. Blot e colaboradores (1994) relataram que ratos com hipertensão induzida por L-NAME geralmente morrem após 8 a 11 semanas, supostamente de aneurisma aórtico, insuficiência renal e outros danos aos órgãos alvo. Em contrapartida, ratos com hipertensão espontânea conseguem viver até as 70 semanas de idade apesar de um aumento semelhante da pressão arterial (KUNG, *et al.*, 1995). Dessa forma, a disfunção vascular associada à hipertensão induzida por L-NAME torna-se bem estabelecida como modelo de doença vascular, sendo o endotélio, uma região de particular interesse, visto ser uma fonte de fatores de relaxamento e contração, além de mediadores capazes de interferir na função plaquetária e na proliferação do músculo liso vascular (HOPKINS, *et al.*, 2013).

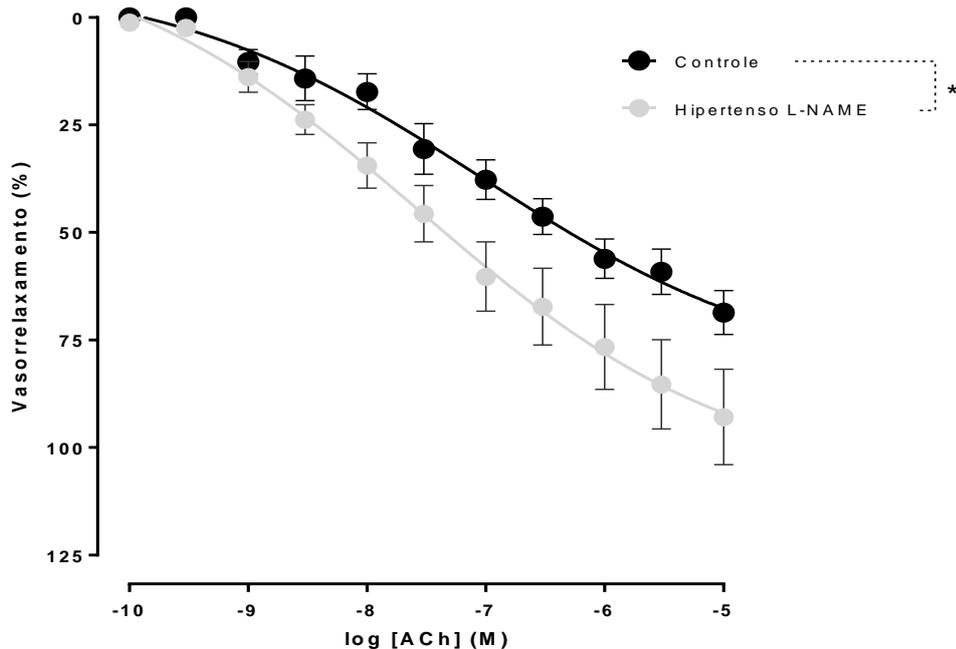
Como uma deficiência na produção ou na ação do NO está envolvida em vários estados de doença (ARNAL, *et al.*, 1992; BAYLIS, *et al.*, 1992), a aplicação crônica de inibidores da NO sintase representa um modelo de disfunção vascular específica e, portanto, de doença vascular precoce. Clinicamente, a doença vascular que leva a complicações cardiovasculares ocorre quase exclusivamente em artérias de grandes calibres, como a artéria aorta, coronária, carótida e renal. Como é provável que os medicamentos sejam mais eficientes na prevenção e reversão das alterações vasculares precoces do que tardias na hipertensão, esse modelo é adequado para testar os efeitos protetores vasculares dos potenciais anti-hipertensivos no contexto da deficiência de NO (CHRISTOPH, *et al.*, 1995).

Nessa perspectiva, sabe-se que o L-NAME causa contração dependente do endotélio em artérias isoladas e inibe o relaxamento dependente do endotélio a vários agonistas (DORA, *et al.*, 2000). Todavia, muitas pesquisas vem demonstrando que a forma de administração dessa substância, a dose e o período de tratamento variam de caso para caso e

às vezes terminam em apurações discutíveis, pois os efeitos do tratamento com L-NAME no sistema cardiovascular podem ser inconsistentes, além da resposta do organismo normotenso e hipertenso à mesma dose de L-NAME diferirem e, aparentemente, a sensibilidade da via NOS/NO ser alterada em condições hipertensivas (GRAY, *et al.*, 1993; WINKLES *et al.*, 1995).

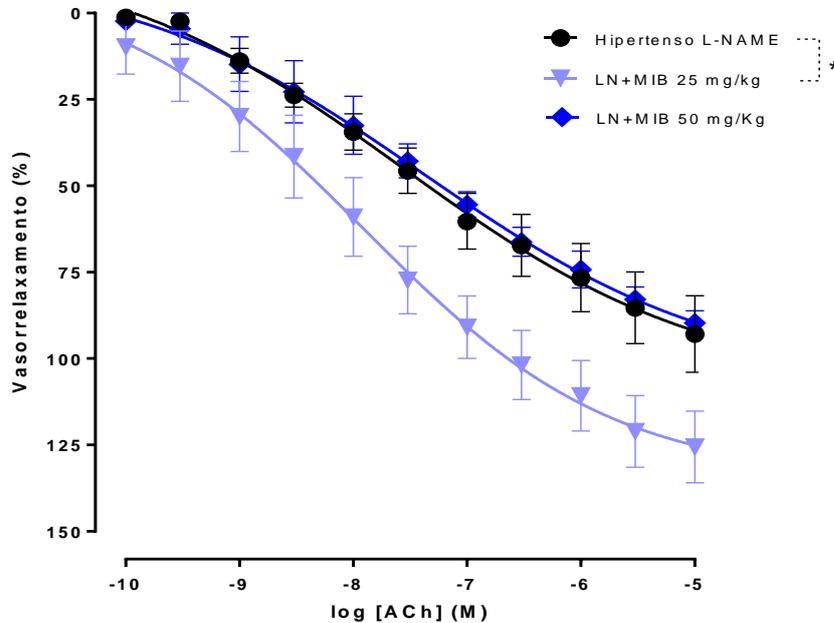
Com o objetivo de avaliar o responsividade vascular em animais hipertensos no modelo do L-NAME submetidos a um pré-tratamento com MIB na dose de 25 e 50 mg/kg, percebeu-se que os relaxamentos dependentes de endotélio induzidos pela acetilcolina foram potencializadas no grupo hipertenso L-NAME em comparação com o controle normotenso (Figura 22) (\* $p < 0,05$  vs controle). Nos animais tratados com a MIB na dose de 25 mg/kg, a reatividade à acetilcolina foi potencializada em relação ao grupo hipertenso L-NAME (Figura 23), evidenciando assim a complexidade da resposta vascular ao L-NAME, a existência de mecanismos compensatorios ao efeito inibitivo deste sob a síntese de NO e a capacidade da MIB de melhorar a responsividade das preparações de aorta à acetilcolina.

**Figura 22:** Curva concentração-resposta de acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-Name. \* $p < 0,05$  vs controle. Two-way ANOVA.



Fonte: Autoria Própria

**Figura 23:** Efeito do Tratamento agudo com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg na resposta vasorelaxante da ACh em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-NAME. \* $p < 0,05$  vs hipertenso. Two way anova.



Fonte: Autoria Própria

Embora a administração de L-NAME, com o objetivo de reduzir a produção de NO, seja amplamente usada, pouco se sabe sobre as consequências do feedback do tratamento de L-NAME a longo prazo na produção de NO. O fenômeno da regulação de realimentação da expressão e atividade do NOS pelo nível de NO produzido *in vitro* demonstrou que sob condições fisiológicas, o NO produzido pelo NOS se liga ao ferro heme da molécula do NOS e, assim, inibe a atividade sintética da enzima (BERNÁTOVÁ, *et al.*, 1999; ZHAO, *et al.*, 2015). A taxa de inibição depende da isoforma da NOS. Consequentemente, a redução dos níveis de NO na solução da reação pela eliminação de NO levou à manutenção da atividade sintética, enquanto a adição de doador de NO à solução diminuiu gradualmente a produção de NO (ROGERS e IGNARO, 1992). Na mesma direção, a expressão de isoforma particular de NOS é regulada pela produção de NO. A pré-incubação da cultura de células com doador exógeno de NO levou à expressão atenuada de isoformas de NOS indutíveis (iNOS) e endoteliais NOS (eNOS) (VAZIRI e WANG, 1999) e, por outro lado, a presença de sequestrador de NO aumentou a expressão de iNOS após estimulação de citocinas (PARK, *et al.*, 1994). A presença do L-NAME atua na atividade e expressão da NOS de maneira semelhante à eliminação de NO, que na linha de células estimuladas por citocinas levou à

expressão e atividade aumentadas de iNOS (BERNÁTOVÁ, *et al.*, 1999; PARK, *et al.*, 1994) e, curiosamente, a incubação das células endoteliais com L-NAME causa um aumento significativo no nível de proteína eNOS como resposta *in vitro* tensão de cisalhamento, que é um estímulo natural para a síntese de NO *in vivo* (FINNK, *et al.*, 1998; GRUMBACH, *et al.*, 2005).

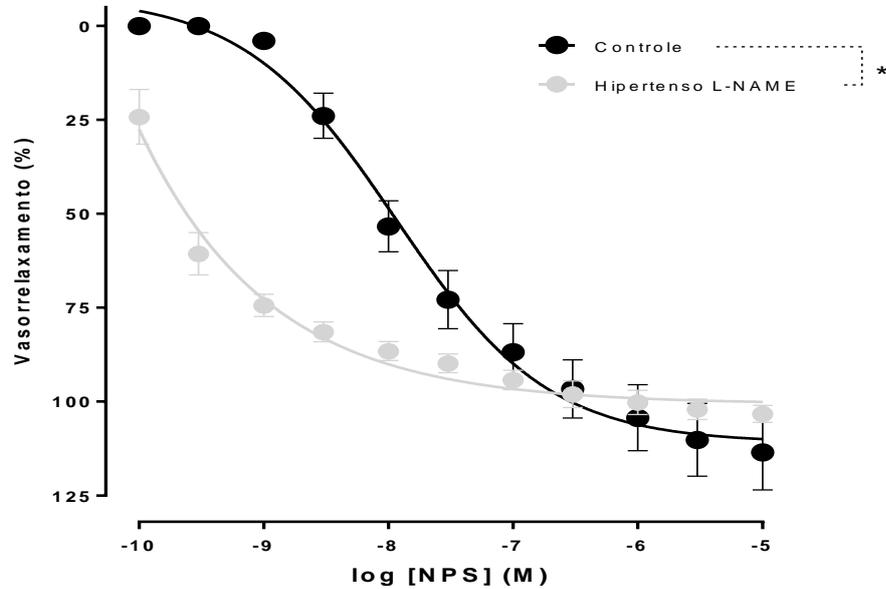
Considerando que a administração de L-NAME bloqueia a síntese de NO, podemos supor que uma atividade NOS maior encontrada em tecidos *ex vivo* resulta de um nível mais alto de expressão do gene NOS. De fato, a presença de L-NAME aumenta *in vitro* a taxa de expressão de iNOS e eNOS (GRUMBACH, *et al.*, 2005; PARK, *et al.*, 1994), talvez influenciando o equilíbrio entre NO e fator de transcrição fator nuclear kB (NF-kB), que é o principal fator na expressão da NOS (GRUMBACH, *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2011). Considera-se que o NO inibe a ativação de NF-kB, sua ligação ao DNA (PARK *et al.*, 1997) ou induz e estabiliza o inibidor de NF-kB (DAVIS *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 1995) e, portanto, modula a taxa de transcrição de NOS. Nesse sentido, a diminuição do nível de NO induzida pelo LNAME leva à ativação do NF-kB e, conseqüentemente, ao aumento da expressão da NOS (BERNÁTOVÁ, *et al.*, 1999; KOPINCIVÁ, *et al.*, 2012).

No entanto, a regulação da retroalimentação induzida por L-NAME da expressão da NOS é mais complicada do que a regulação da atividade da NOS. Temos que raciocinar que a ativação do NF-kB pode ser evocada por vários fatores, dos quais mais de alguma forma estão associados à produção de NO. Primeiramente, a carga oxidativa induz a ativação de NF-kB da mesma maneira que a deficiência de NO e a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode, assim, evocar maior expressão de eNOS ou iNOS (GOMEZ-CABRERA, *et al.*, 2005; ZHEN, *et al.*, 2008) . Assim, às vezes é impossível resolver se o aumento na expressão de NOS é causado pela depleção de NO ou melhor, pela ativação de NF-kB mediada por ROS (KOPINCIVÁ, *et al.*, 2012).

Quanto à resposta independente do endotélio, obteve-se uma curva concentração resposta ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) percebendo-se que o efeito vasorrelaxante induzido pelo NPS foi potencializado em preparações de animais hipertensos (Figura 24). Liu e colaboradores (2019) em seus estudos demonstraram que os análogos da L-arginina contendo grupos nitro, como L-NAME, potencializam a vasodilatação mediada por nitrovasodilatadores e que o NO é liberado do grupo nitro dos análogos da L-arginina por meio de reações de Fenton. O tratamento *in vivo* com MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg não promoveu alterações significativas no vasorrelaxamento induzido pelo NPS em comparação com o grupo L-NAME

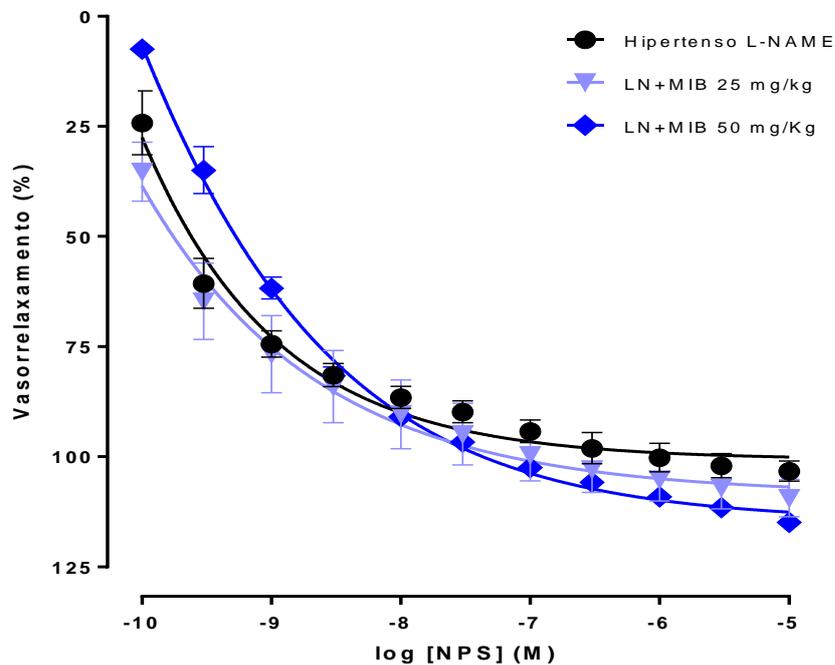
(Figura 25).

**Figura 24:** Curva concentração-resposta do Nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-Name. \* $p < 0,05$  vs controle. Two way anova



Fonte: Aatoria Própria

**Figura 25:** Efeito do Tratamento agudo com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg na resposta vasorelaxante do NPS em anéis de aorta de ratos hipertensos induzidos pelo L-NAME. \* $p < 0,05$  vs hipertenso. Two way anova



Fonte: Aatoria Própria

Os resultados apresentados demonstraram que as mudanças fisiológicas decorrentes do quadro hipertensivo, em que os animais se encontravam, são inúmeras e estas podem gerar respostas divergentes das mensuradas *in vitro* para o L-NAME, uma vez que o estresse oxidativo desencadeado pela depleção de NO (PAULIS, *et al.*, 2008), ao atingir os principais órgãos do sistema vascular, podem ativar mecanismos compensatórios (PAULIS, *et al.*, 2008; PAULIS, *et al.*, 2009), gerando assim uma nova resposta.

### **5.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo***

Quando ocorre um desequilíbrio na relação das ERO e de ERN as defesas antioxidantes, observa-se lesões em organelas, membranas, tecidos e enzimas, culminando em perda de função celular e/ou tecidual, gerando uma patologia específica. Dessa forma, o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças, entre elas, os distúrbios cardiovasculares (BLACK e GARBUTT, 2002).

Nesse aspecto, os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações comparados à do substrato oxidável, significativamente retardam ou inibem a oxidação dos mesmos (HALLIWELL, 2000). Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem como detoxificadores do agente antes que ele cause lesão (glutathiona reduzida-GSH, superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT e glutathiona-peroxidase-GPx) ou como reparadores da lesão ocorrida (vitamina C, vitamina E, glutathiona-redutase - GR e glutathionaS-transferase – GST) (WIESE, 2008).

O estresse oxidativo é uma causa primária na patogênese da hipertensão devido à disfunção das células endoteliais (VAZIRI, *et al.*, 1998). Evidências crescentes sugerem uma ligação cruzada entre a deficiência de NO e o desenvolvimento do estresse oxidativo no início e na progressão das deficiências vasculares (VAZIRI *et al.*, 2000). Durante a fisiologia normal, o NO reduz a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) por meio de uma supressão sustentada da NADPH oxidase, a principal fonte de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos (VAZIRI *et al.*, 1999).

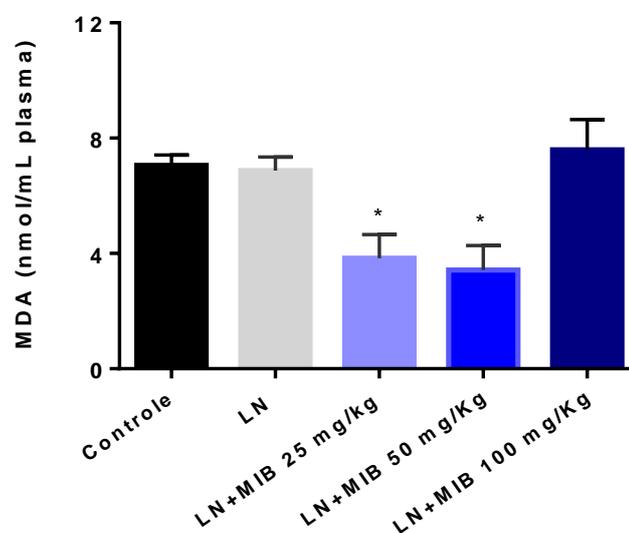
Os biomarcadores sanguíneos do balanço redox, são usados para refletir as lesões causados pelas ERO e a eficácia das defesas antioxidantes do organismo. Esses marcadores podem mensurar o dano oxidativo em componentes celulares como as estruturas lipídicas, através da peroxidação lipídica (LPO) e estimar o dano oxidativo a proteínas, através dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos (AMES *et al.*, 1993).

De acordo com Vrankova e colaboradores (2010), a administração de L-NAME está associada ao aumento da produção de ERO e de ERN e subsequentemente ao estresse

oxidativo no fígado e nos rins. O malondialdeído (MDA) é um pro-oxidante produzido como metabólito secundário da LPO e reflete indiretamente a degeneração oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados uma vez que a peroxidação lipídica sobrevém da reação dos radicais livres com os lipídeos insaturados das membranas, ocasionando a formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem afetar a integridade das membranas (WILCOX, 2005). Nessa reação ocorre à liberação de produtos de degradação de ácidos graxos, como o MDA, e a quantificação deste composto têm sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo (OHKAWA *et al.*, 1979).

No presente estudo, não se observou diferenças nos níveis plasmáticos de TBARS entre o grupo hipertenso L-NAME e o grupo controle normotenso. Todavia, nos animais tratados por 7 dias com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg foi observada uma redução significativa nos níveis de TBARS, sugerindo uma capacidade de proteção da MIB ao dano à membrana celular induzido pelo L-NAME (Figura 26). Esses achados corroboram com os resultados *in vitro* quanto a capacidade inibitória da peroxidação lipídica induzida pela AAPH, observada pela redução da quantidade de TBARS em todas as concentrações testadas da MIB. Por outro lado, os mesmos resultados não foram observados em hamsters submetidos a uma dieta hiperlipídica, tratados por 28 dias com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg, conforme relatado por LIMA (2017).

**Figura 26:** Avaliação da atividade antioxidante da MIB no plasma de animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da capacidade protetora contra a lipoperoxidação de membrana. \* $p < 0,05$  vs LN. One-way ANOVA.



Fonte: Autoria Própria

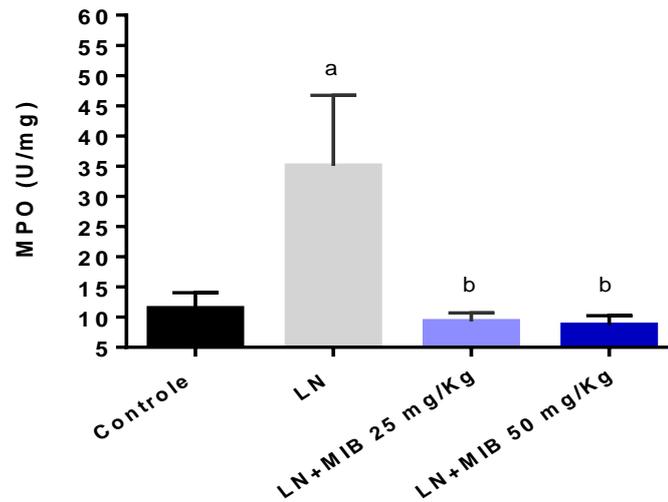
De acordo, estudos de atividade gastroprotetora induzida pelo extrato hexânico das sementes de *P. insignis* em sua forma livre e complexada com beta-ciclodextrina demonstraram uma diminuição nas áreas de úlcera gástrica e nas concentrações de MDA quando comparado ao controle negativo, comprovando que o extrato utilizado inibiu significativamente a formação de lesões gástricas possivelmente envolvendo ação em mecanismos antioxidantes (NASCIMENTO, 2014). Baseado nos relatos prévios, pode-se vislumbrar o imenso potencial farmacológico da *P. insignis* quanto a atividade antioxidante.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima membro da superfamília heme peroxidases derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas ERO (BADIMON *et al.*, 2012). Além de sua importância no combate a doenças infecciosas por meio da resposta imune inata, a MPO contribui para o dano tecidual durante inflamação destacando-se pelo seu papel no início e progressão da aterosclerose (PENNATHUR E HEINECKE, 2007) Ao reagir com o peróxido de hidrogênio, ela exerce múltiplos efeitos oxidativos teciduais, propiciando o desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica (TSIMIKAS, 2006). Além disso, ao se acoplar as glicosaminoglicanas presente nas paredes dos vasos, a MPO prejudica a liberação de NO derivado do endotélio e a função endotelial local (STORCH *et al.*, 2017). Portanto, os dados indicam que uma elevação dos níveis de MPO podem sinalizar a progressão de uma disfunção endotelial, enquanto a redução plasmática desses níveis foram retratados como cardioprotetores (BADIMON, *et al.*, 2012; STORCH, *et al.*, 2017).

Os resultados aqui demonstrados apontam que animais hipertensos L-NAME manifestaram um aumento da MPO plasmática, tendo a MIB (25 e 50 mg/kg) atenuado significativamente a migração de leucócitos polimorfonucleares, avaliada indiretamente através da atividade da MPO plasmática, indicando uma atividade antioxidante desta manteiga (Figura 27). Lima (2017), já havia demonstrado a atividade antioxidante da MIB através da diminuição da atividade da mieloperoxidase no modelo de dislipidemia induzida por uma dieta hiperlipídica em hamsters, o que corrobora os achados deste trabalho.

A glutatona (GSH) é o principal antioxidante gerado pela célula, cuja principal função é protegê-la de radicais livres que venham danificar ou destruir componentes celulares fundamentais, como o DNA, em segundos. Denominado marcador da saúde celular sua queda é indicativa de lesão oxidante cujo déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais, sendo, portanto, um importante agente antioxidante (GUTTERIDGE *et al.*, 1979).

**Figura 27:** Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida plasmática de MPO. \* $p < 0,05$  vs LN. One-way ANOVA.

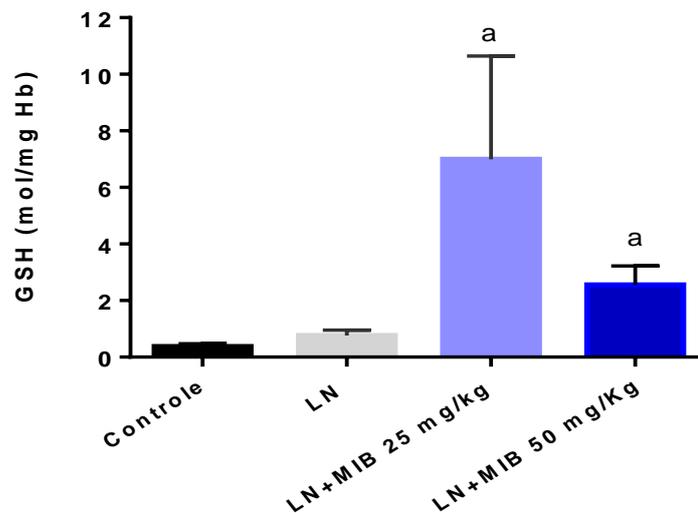


Fonte: Autoria Própria

Pesquisas indicam que o estresse oxidativo prédispõe à hipertensão essencial e que um dos principais sistemas alterados nessa condição é o da glutathiona, o qual, por meio da atividade de suas enzimas, é essencial para manutenção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (DUARTE *et al.*, 2001; ESLAMI, SAHEBKAR, 2014). Nessa perspectiva, também se relatou que a diminuição de glutathiona no vaso dificulta a vasodilatação induzida por acetilcolina, sugerindo uma correlação com a biodisponibilidade do NO (FORD *et al.*, 2006; VARGAS *et al.*, 2012).

No modelo de hipertensão com L-NAME, observou-se uma depleção do antioxidante em animais hipertensos L-NAME, tendo a administração diária da MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg desencadeado um aumento na produção de GSH. Lustosa (2012) também obsevou um aumento de GSH hepático 14 dias após a admistração aguda da MIB na dose de 2,0 g/Kg. Nessa perspectivas, alguns estudos consideraram a eliminação de EROs e ERNs como um mecanismo fortemente envolvido no efeito anti-hipertensivo (CHEN, *et al.*, 2001; GUMANOVA *et al.*, 2007; LEIGHTON *et al.*, 2006; VASCONCELOS, *et al.*, 2007), exibindo assim o potencial antioxidante e hipotensor da MIB frente à disfunção vascular causados pelo L-NAME ao inibir NOS.

**Figura 28:** Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida de GSH eritrocitária. \* $p < 0,05$  vs LN. One-way ANOVA



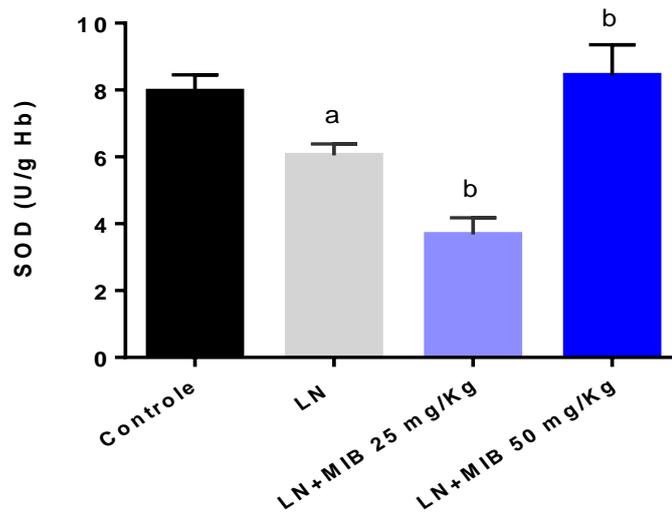
Fonte: Autoria Própria

A enzima superóxido dismutase (SOD), integra o sistema antioxidante endógeno, sendo capaz de dismutar o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este último é capaz de atravessar as membranas celulares para então ser convertido em  $H_2O$  por outras enzimas do sistema antioxidante, e dessa forma reduz o risco de estresse oxidativo (MRUK *et al.*, 2002).

A conservação da função endotelial, entre outros fatores, também é mediada pelo equilíbrio entre os níveis de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e a liberação de NO (FRAGA *et al.*, 1990; NAKAE *et al.*, 1997). Dessa maneira, a interação entre os dois, é o principal mecanismo de redução de biodisponibilidade do NO, uma vez que a reação do NO com o  $O_2^{\bullet-}$  é cerca de seis vezes mais rápida que a reação deste com a SOD. Assim, o NO torna-se um “sequestrador” de ânion superóxido mais potente que a SOD causando não só a redução da biodisponibilidade do NO como a geração do peróxido nitrito ( $ONOO^-$ ), um potente agente oxidante (BECKMAN & KOPPENOL, 1996; RUBANY & VANHOUTE, 1986).

No que se refere à atividade da SOD, os animais hipertensos L-NAME, manifestaram uma redução dessa defesa antioxidante ao relação ao grupo controle, sendo esta redução ainda mais acentuada nos animais tratados com a menor dose da MIB. Por outro lado, o tratamento com a dose de 50 mg/kg/dia promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) deste parâmetro, em relação ao grupo hipertenso não tratado. (Figura 29). Resultado semelhante foi reportado por Lima (2017) nos animais dislipidemicos tratados na dose de 50 mg/kg.

**Figura 29:** Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da SOD eritrocitária. \* $p < 0,05$  vs LN. One-way ANOVA



Fonte: Autoria Própria

Durante um processo fisiopatológicos, como a hipertensão, os níveis de SOD e MDA refletem a quantidade de estresse causada pela liberação de radicais livres *in vivo*, em virtude da ativação de macrófagos, neutrófilos e citocinas que produzem grande quantidade de  $O_2^{\bullet-}$ . Essa elevação da produção de  $O_2^{\bullet-}$  intensifica o consumo da SOD, fomentando uma exaustão enzimática, o que resulta no declínio dos níveis desta enzima no organismo (RAJA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2005). Tal fato poderia justificar a redução da SOD no animais hipertensos tratados com a MIB na dose de 25mg/kg.

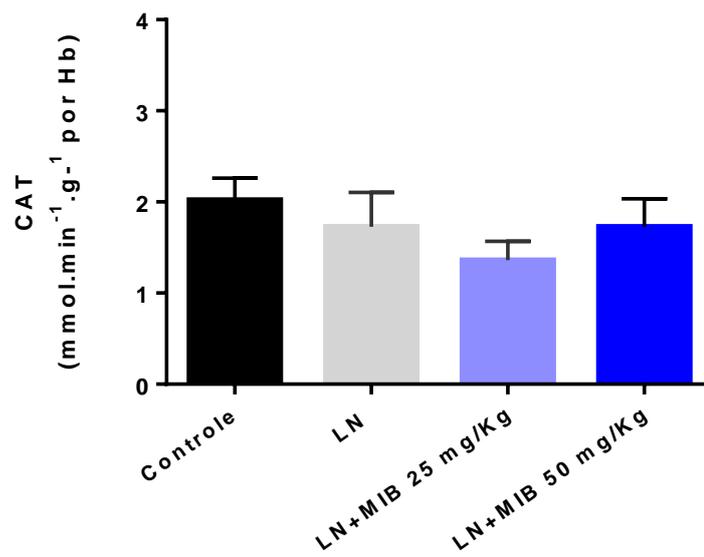
Sabe-se que, a enzima SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é bastante estável apresentando alta capacidade de permeação das membranas biológicas. Seu excesso é convertido em água pela ação da enzima catalase (CAT) glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GSH) dentre outras peroxidases, contudo o  $H_2O_2$  permite que os neutrófilos oxidem os íons cloreto em ácido hipocloroso via mieloperoxidases proporcionando atividade citotóxica, o que pode causar lesões dos tecidos vasculares (VICTOR *et al.*, 2009).

Nessa perspectiva, a catalase é uma das enzimas responsáveis pela remoção de  $H_2O_2$  das células quando este radical encontra-se em altas concentrações intracelularmente (MICHIELS, *et al.*, 1994) cujo mecanismo catalítico assemelha-se bastante ao da SOD. Devido a presença do ferro em sua estrutura, a CAT pode interagir potencialmente com os grupos de ligação de ferro de L-NAME, inibindo assim sua atividade.

No protocolo proposto, não houve registro de alterações da atividade da catalase no

animais hipertensos não tratados em relação ao grupo controle e nem nos animais que receberam tratamento com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/kg. Estudos anteriores, também não registraram alterações hepáticas nos níveis de catalase 14 dias após uma dose (2 g/Kg) aguda da MIB (LUSTOSA, 2016). É improvável que a atividade inalterada de CAT esteja relacionada aos mecanismos envolvidos na manutenção do estresse oxidativo (FREITAS *et al.*, 2005). Esses dados sugerem que o protocolo proposto não utiliza a CAT como o principal sistema de eliminação de radicais livres.

**Figura 30:** Avaliação da atividade antioxidante da MIB em animais hipertensos induzidos pelo L-NAME, através da medida da CAT eritrocitária. \* $p < 0,05$  vs LN. One-way ANOVA



Fonte: Autoria Própria

## 5.6 Avaliação Bioquímica

Um biomarcador de lesão hepática ideal, deve ter: especificidade para o tecido hepático, forte correlação com variações histomorfológicas hepáticas, alto rendimento, acesso à amostra por métodos não invasivos e aplicação a modelos animais em fase pré-clínica. Atualmente, a grande deficiência dos marcadores utilizados deve-se ao fato de estes não serem específicos para o tecido hepático, apesar de sensíveis (OZER *et al.*, 2008).

A alanina aminotransferase (ALT) anteriormente denominada de transaminase glutâmico-pirúvica (GPT), é uma enzima encontrada livre no plasma dos hepatócitos, que no rompimento celular é liberada na corrente circulatória (THRALL *et al.*, 2015). Apesar de ser considerada o biomarcador de hepatotoxicidade com maior sensibilidade e especificidade, as fontes não hepáticas de ALT podem aumentar o risco de falsos positivos (ANTOINE *et al.* 2009).

A aspartato aminotransferase (AST) outrora chamada de transaminase glutâmicooxalacética (GOT), é encontrada predominantemente no citosol e em menor quantidade nas mitocôndrias dos hepatócitos, e nas células musculares esqueléticas e cardíacas (CAMINI, 2014; GONZALEZ e SILVA, 2006). Considerada uma enzima de fase aguda, seus valores podem ser induzidos por diversas situações fisiopatológicas tais como hipóxia, acúmulo de lipídeos hepáticos, doenças infecciosas, inflamações, neoplasias hepáticas, além de intoxicações medicamentosas. A razão AST/ALT é um parâmetro com grande utilidade no diagnóstico de doença hepática, principalmente ao nível do conhecimento da extensão da lesão (MINUK, 1998).

Sintetizada de forma integral no fígado, a albumina compõe cerca de 50% das proteínas plasmáticas (GONZALEZ e SILVA, 2006), podendo sua concentração ser afetada por perturbações hepáticas, processos inflamatórios, parasitismo, equilíbrio hidroeletrólítico e nível nutricional (THRALL *et al.*, 2015), sendo uma hipoalbuminemia constatada quando 60 a 80% da função hepática já está comprometida (TRALL, 2007).

Metabolizada no fígado, a glicose ao ser absorvida no intestino delgado é transportada através do sistema porta até os hepatócitos. Lá ocorre a transformação de glicose em glicogênio mantendo assim seu nível em homeostase (GONZALEZ e SILVA, 2006). Em animais com insuficiência hepática os valores glicêmicos podem sofrer variações. A menor atividade da glicogenólise nos hepatócitos, por exemplo, pode resultar em hipoglicemia. Enquanto um déficit de absorção hepática gera uma hiperglicemia pós-prandial prolongada (COLES, 1994; TRALL, 2007).

Nessa perspectiva, as determinações bioquímicas da concentração de proteínas totais, albumina, glicose e a atividade das transaminases AST e ALT, constituem marcadores importantes da função hepática (GONZALEZ e SILVA, 2006), sendo utilizados para mensurar o grau de deterioração funcional do fígado, visto que este órgão possui múltiplas funções que repercutem no organismo. (TAMPO, YONAH, 1990). Assim, neste trabalho, a utilização do L-NAME provocou aumento significativo da AST provavelmente em decorrência das lesões endoteliais e musculares causadas pelo L-NAME, uma vez que elevações isodas desse parâmetro está mais associada a doenças musculares e infarto agudo do miocárdio (NICOLAU *et al.*, 2014; PIEGAS, *et al.*, 1997). O tratamento com a MIB na dose de 25 e 50 mg/kg·dia não promoveu alterações estatisticamente significativas em nenhum dos grupos estudado

**Tabela 4:** Avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratas Wistar hipertensas induzidas pelo L-NAME tratadas com a MIB nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Os valores representam à média  $\pm$  EPM.

Paramêtro	Controle	LN		
		Sem tratamento	MIB 25 mg/kg	MIB 50 mg/kg
Proteínas Totais (mg/dl)	6,75 $\pm$ 0,226	7,51 $\pm$ 0,325	7,42 $\pm$ 0,088	7,46 $\pm$ 0,319
Albumina (mg/dl)	2,26 $\pm$ 0,092	2,24 $\pm$ 0,111	2,20 $\pm$ 0,125	2,35 $\pm$ 0,066
ALT (U/L)	36,71 $\pm$ 4,882	48,4 $\pm$ 7,338	47,0 $\pm$ 4,909	49,0 $\pm$ 5,986
AST (U/L)	84,57 $\pm$ 9,841	137,8 $\pm$ 16,44*	143,4 $\pm$ 19,84	116,25 $\pm$ 16,03
Glicose (mg/dL)	145,28 $\pm$ 7,791	130,2 $\pm$ 7,559	150,6 $\pm$ 17,235	125,5 $\pm$ 7,900

Fonte: Autoria Própria

## 6.0 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, podemos inferir que a MIB apresenta baixa toxicidade frente às linhagens celulares estudadas, macrófagos peritoneais e membranas eritrocitárias, e potencial antioxidantes *in vitro*, registrados através da redução da produção de TBARS, radical hidroxila e nitrito. Quanto aos ensaios *in vivo*, não se registrou nenhum tipo de sinal toxicológico após tratamento oral agudo em ratos, manifestando assim um perfil satisfatório de segurança, possibilitando averiguação dos potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos para este produto. Em relação a reatividade vascular, observou-se uma melhora na responsividade das preparações de artéria aorta à acetilcolina dos animais tratados com a MIB na dose de 25 mg/Kg, o mesmo não foi constatado em relação ao NPS. Além disso, percebe-se uma melhora nos níveis de MDA, MPO, GSH e SOD dos animais hipertensos tratados com a MIB, garantindo assim proteção contra os processos oxidativos presentes na hipertensão arterial, e ausências de alterações hepáticas mensuradas através de parâmetros bioquímicos. Todos esses resultados ressaltam o imenso potencial terapêutico da MIB frente às doenças hipertensivas e o estresse oxidativo correlacionado, abrindo caminho para o estudo de novos ramos terapêuticos no tratamento da hipertensão arterial sistêmica

## 7.0 REFERÊNCIAS

ANDRIOLO A. & ROCHA M.H. **Características e interpretação dos resultados dos exames laboratoriais**, 2ª ed. Sarvier, São Paulo, 2007. p.3-13.

AGRA, F. M. *et al.*, Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 183, n. 3, p. 472-508, 2008.

AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. **International Journal Molecular Sciences**. v. 9, n. 3, p. 35570, 2008.

AKI H .; YAMAMOTO M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.

ALMEIDA, A. A. C. *et al.*, Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**. v. 11, n. 1448, p. 56-62, 2012.

ALVES, A. B.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Constituintes químicos de *Burlemarxia rodriguesii* Menezes & Semir (Velloziaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá. v. 12, supl. 1, p.78 -79, 2002.

ALVES, C.Q. *et al.*, Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n 10, p. 2202-2210, 2010.

AMARAL, W. C. D. **Ação do antioxidante tempol na hipertensão em ratos com resistência à insulina induzida por frutose e alimentados com dieta rica em sal**. 2014. 118f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 2014.

AMBROSIO, G.; TRITTO, I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. **American Heart Journal**. v. 138, n. 8, p. S69-S75, 1999.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HEGEN, T.M.; **Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging**. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.90, p.7915-7922, 1993

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. 2013. 227p. Tese (Doutorado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2013.

ANDRIOLO, A.; ROCHA, M. H. **Características e interpretação dos resultados dos exames laboratoriais**. In: ANDRIOLO, A.; CARRAZA, F. R. *Diagnóstico laboratorial em pediatria*. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2007. Cap. 1; p. 3-13

ANTOINE, D. J. *et al.*, Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. **Xenobiotica**. v. 39, n. 8, p. 565–577, 2009.

ARCANJO, D. D. R. *et al.*, Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural product research**. v. 28, n. 12, p. 923-927. 2014.

ARCANJO, D. D. R. *et al.*, A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. **Plos One**, v. 10, p. e0145071, 2015.

ATCC – “American Type Culture Collection”. MTT Cell Proliferation Assay. Instructions. 2001. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/2273.Pdf>> . Acesso em: 20 março de 2018.

ARNAL, J.F.; WARIN, L.; MICHEL, J.B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 647–652, 1992.

BADER, G.; PLOHMANN, B.; HILLER, K.; FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, v. 51, n. 6, p. 414-417, 1996.

BADIMON, L. *et al.*, Circulating biomarkers. **Thrombosis Research**. v. 130, n. 10, p. 12-15, 2012.

BAGGETT, S. *et al.*, Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2005.

BANIN, T.M. **Consequências do estresse crônico ou agudo sobre as ações vasculares da angiotensina II e da angiotensina 1-7 em carótidas de ratos**. 2011. 112f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2011.

BARBOSA, K. B. F. *et al.*, Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, M. R. *et al.*, Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**. v. 20, n.10, p. 896-900, 2006.

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

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of oxide synthesis in the rat

produces systemic hypertension and glomerular damage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n.1, p. 278-81, 1992.

BECKMAN, J.S. *et al.*, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.87, p.1620-1624, 1990.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p.1424-1437, 1996.

BENTES, M. H. *et al.*, Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta amazônica**, Manaus, v.16; n.17, p. 363- 368, 1986.

BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁNOVÁ, O.; KRISTEK, F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 81, p. 99–106, 1999.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 61, p. 882–890, 1963.

BLACK, P. H.; GARBUTT, L. D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. **Journal of Psychosomatic Research**. v. 52, n.1, p.1-23, 2002.

BLOT, S. *et al.*, Spinal cord infarcts during long term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. **Stroke**. v.25, p.1666-1673, 1994.

BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits. 1: Bacuri. **Flavor and fragrance Journal**, v. 14, n. 10, p. 303-311, 1999

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, C. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Invest Dermato**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EURPHOBIACEAE). **Química Nova**, v. 25, n. 1, p.15-19, 2002.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUFFON, A. *et al.*, Large, sustained cardiac lipid peroxidation and reduced antioxidant capacity in the coronary circulation after brief episodes of myocardial ischemia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n; 3, p. 633-639, 2000.

BUSH, B.M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Roca, Caps 5, 6 e 7, 2004.

CAMARGO, M. T. L. A. **Medicina Popular**. Rio de Janeiro: Campanha de Defesa do Folclore Brasileiro, 47 p., 1976.

- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutical agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.
- CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. v.55 n.3, São Paulo. 2003.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR J. M.; Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Florianópolis, v.78, n.1, p.98-106, 2008
- CALIXTO J. Biopirataria: A diversidade biológica na mira de indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**. v. 28, n.167, p. 36-43, 2000b.
- CALZERRA, N T. M.; GOMES, C. F.; QUEIROZ, T. M. Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literature. **Acta Brasiliensis**. v. 2, n. 2, p. 69-73, 2018.
- CARVALHO, F. C. *et al.*, Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010.
- CATTANI, O. *et al.*, Correlation Between Metallothionein and Energy Metabolism in Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to Cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v.113, n. 2, p. 193-199,1996.
- CALVER, A. *et al.*, Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. **Journal of Hypertension**. v.10, p.1025-1031, 1992.
- CAMINI, F. C. **Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus Caraparu**. 99f, 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro preto. Instituto de Ciências exatas e biológicas. 2014.
- CELI, P. O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 348-363, 2010.
- CHENA, L.G., YANG, L.L., WANG, C.C.; Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2. p. 688-693, 2008.
- CHEN, X.Q. *et al.*, Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols and Chromone Oglucosides from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 196-204, 2010.
- CHE, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, 1013-24, 2012.
- COELHO, A. G. *et al.*, Optimization and standardization of extraction method from *Lippia*

origanoides H.B.K.: Focus on potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products**, v. 78, n. 12, p. 124-130, 2015.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole p.185-219, 1994

COSTA-JÚNIOR, J.S. et al. Evaluation of effects of ethanolic extract from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. **International Journal of Biological Sciences**. V. 10, n. 8, p. 747-753, 2010.

COSTA JÚNIOR, J. S. **Análise fitoquímica, farmacológica e toxicológica das sementes de *Platonia insignis* Mart.** 2011. 216 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2011a.

COSTA JÚNIOR, J.S. *et al.*, Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678684, 2011a.

COSTA JÚNIOR, J. S. *et al.*, Evaluation of antioxidant effects in vitro of Garcinielliptona FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 2, p. 293-299, 2011b.

COSTA JÚNIOR, J.S. *et al.*, Atividade de superóxido dismutase e catalase em hipocampo de ratos pré-tratados com garcinieliptone FC de *Platonia insignis*. **Pharmaceutical Biology**. v. 50, n. 4, p. 453-7, 2012.

COSTA JÚNIOR, J. S. *et al.*, Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. seed. **Basic Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 112, n. 1, p. 34-41, 2013.

COVAS M.I., FÍTO M., DE LA TORRE R. Olive oil and oxidative stress. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.51, n.10, p.1215-1224, 2007.

COVATTI, C. F. *et al.*, Fatores de risco para doenças cardiovasculares em adultos e idosos de um hospital universitário. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**. v. 36, n. 1, p. 24-30, 2016.

CUNHA, H. F. R.; ROCHA, E. E. M.; HISSA, M. Necessidades proteicas, morbidade e mortalidade no paciente grave: fundamentos e atualidades. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**. v.25, n.1, p. 49-55, 2013.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v.37, p.201-204, 2000.

DAVIS, M.E. *et al.*, Shear stress regulates endothelial nitric-oxide syn- thase promoter activity through nuclear factor kB bind- ing. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.163–168, 2004.

DENNY, K.H. *et al.*, **Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity**

**Testing for Preclinical Drug Development.** In Faqi, A.S. A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development, 2013. Amesterdão. Ed. Elsevier. Pp.87104.

DORA, K.A.; HINTON, J.M.; WALKER, D.S.; GARLAND, C.J. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**. v.129, n.2, P. 381-387, 2000.

DUARTE, J. *et al.*, Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 221, p. 155–160, 2001.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 82, n. 1, p.70–77, 1959.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ESLAMI, S.; SAHEBKAR, A. Glutathione-s-transferase M1 and T1 null genotypes are associated with hypertension risk : A Systematic review and meta-analysis of 12 studies. **Current Hypertension Report**, v. 16, p. 432–441, 2014.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Bio Med**. v.11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FABIANI, J. N. *et al.*, Chromosomal aberrations and neutrophil activation induced by reperfusion in the ischaemic human heart. **European Heart Journal**. v. 14, p.12 – 17, 1993.

FARIAIS, D. S. *et al.*, Medicinal plants and herbal medicines used as additional therapy in systemic hypertension control. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. v. 12, n. 03, 2016.

Fraga, C.G.; Shigenaga, M.K.; Park, J-W.; Degan, P.; Ames, B.N. Oxidative damage to DNA during aging. 8-Hydroxy- 29-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.87, p.4533–4537, 1990.

FRANÇA, I. S. X., SOUZA, J. A., BAPTISTA, R. S., BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 2, p. 2001-8, 2008.

FENG, S. *et al.*, Simultaneous determination of nanomolar nitrite and nitrate in seawater using reverse flow injection analysis coupled with a long path length liquid waveguide capillary cell. **Talanta**, v. 117, p. 456-462, 2013.

FERREIRA, M.S.G., **Manejo da espécie *Platonia insignis* Mart – Bacurizeiro, em florestas secundárias da Amazônia Oriental: proposta para uma produção sustentável.** PhD Thesis, Centre for Sustainable Development, University of Brasília, Brasília, 246p, 2008.

FERREIRA, I. C.F.R; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, Bragança, v. 2, n. 2, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, F. R.; FERREIRA, S. A. N.; CARVALHO, J. D. U. Espécies frutíferas pouco exploradas, com potencial econômico e social para o Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 9, n.2, p. 11-22, 1987.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I.G.D.; GURGEL JUNIOR, G.D.; A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FINK, J. *et al.*, Contribution of endothelin to the acute pressor response of L-NAME in strokeprone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 31, n. 4, p. 618–622, 1998.

FITÓ, M.; LA TORRE, R.; COVAS, M.I. Olive oil and oxidative stress. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.51, p. 1215-1224, 2007

FONTENELE, M. A. *et al.*, Conservação pós-colheita de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) sob refrigeração e embalado em PVC. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, p. 292-296, 2010.

FORD, R. J. *et al.*, Glutathione depletion in vivo enhances contraction and attenuates endothelium-dependent relaxation of isolated rat aorta. **Free Radical Biology and Medicine**, v.40, n.4, p. 670-678, 2006.

FORMAN, H.J., RINNA, A., ZHANG, H. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v.30, p.1-12, 2009.

FREITAS, R.M , *et al.*, Estresse oxidativo no hipocampo após status epiléptico induzido pela pilocarpina em ratos Wistar. **The FEBS Journal**. v. 272, n. 2, p. 1307-1312, 2005.

GARDINER, S. *et al.*, Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. **Hypertension**.v. 15, p. 486-492, 1990.

GEBHART, C.J., WARD, G.E., CHANG, K. & KURT, Z.H., *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine lesion of proliferative ileitis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 44, n. 3, p. 361-367, 1983.

GIANNINI, M.C.; YUGAR-TOLEDO, J. C.; VILELA-MARTIN, J. F.; Emergência hipertensiva e acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico: conceitos atuais de tratamento. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 21, n. 4, p. 177-183, 2014.

GOMES, M. B., KIRSZTAJN, G. M.; Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v.33, n.1, p.93-108, 2011.

GOMEZ-CABRERA, M.C. *et al.*, Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **The Journal of Physiology**, v.567,

p.113–120, 2005.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a Bioquímica Clínica Animal**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. c. 8, p. 318-337, 2006.

GONSALEZ, S.R., *et al.*, Atividade inadequada do sistema renina-angiotensina-aldosterona local durante período de alta ingestão de sal: impacto sobre o eixo cardiorrenal. **Brazilian Journal of Nephrology**. São Paulo, v. 40, n. 2, p. 170-178, 2018.

GOLDSTEIN, S; CZAPSKI, G. Superoxide Dismutase. In PUNCHARD, N.A. & KELY, F.J. (ed) **Free radicals: a practical approach**. Oxford University Press, 1996.

GOTTIIEB, M.G.V., *et al.*, Excesso oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente. **Scientia Medica**, v. 20, p.243-249, 2010.

GOUVEIA, M.M.A.; FEITOSA, C.L.D.M.; FEITOSA, A.D.M.; Gênese e Fatores de Risco para a Hipertensão Arterial, **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 25, n. 1, p. 13-17, 2018.

GREAVES, P.; **Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation**. Academic Press, November 2011, 4 ed, 892p.

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

GRINBERG, L. N. *et al.*, Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

GRUMBACH, I.M. *et al.*, A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.39, p.595–603, 2005.

GUADAGNIN, V. *et al.*, Influence of oxidative stress on the regulation of vascular tone and the efficacy of antioxidant therapies. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.12, n. 1, p. 82-89, 2015.

GUIMARÃES, A.G. *et al.*, Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GUMANOVA, N. G. *et al.*, Effect of antioxidants pQ510 and resveratrol on regulatory Function of the endothelium in rats with modeled arterial hypertension. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 143, N.6, p.678-81, 2007.

GUTTERIDGE, J. M., ROWLEY, D. A., GRIFFITHS, E., HALLIWELL, B. Low-molecularweight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. **Clinical Science**, London, v. 68, n. 4, p. 463-467, 1979.

HADNAGY, W.; MARSETZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica-separated erythrocytes versus whole blood. **International Journal of Hygiene and Environmental**

**Health**, v. 206, n. 2, p. 103-107, 2003.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p.1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free radical in biology and medicine**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2015. 943p

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chemical Toxicology**, Oxford. v.33, n.7, p. 601-617, 1995.

HASIMU, B. *et al.*, Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. **Hypertension**. v. 41, n. 2, p. 308-312, 2003.

HOELZL, C. *et al.*, Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.56, n. 2, p.49-64, 2005.

HOMMA, A.; CARVALHO, J. E. U.; MENEZES, A. J. E. A.; Fruta amazônica em ascensão: BACURI. **Ciência Hoje**. v. 46, n. 271, p. 41-45, 2010.

HOPKINS A. L. *et al.*, Hibiscus sabdariffa L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. **Fitoterapia**, v. 85, n.1, p. 84-94, 2013.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P.C.; **A importância das plantas medicinais: princípios ativos de plantas superiores**. Série de Textos da Escola de Verão em Química IV, São Carlos, SP, EDUFSCAR, 2003, 152 P.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v.53, n. 3, p.1841-1856, 2005.

HU, W. *et al.*, Puerarin inhibits iNOS, COX-2 and CRP expression via suppression of NF- $\kappa$ B activation in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. **Pharmacological Reports**, v. 63, p.781-789, 2011.

JÄGER, A. K. *et al.*, Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 822-825, 2013.

JANAINA A. *et al.*, O Consumo Agudo de Etanol Induz a Ativação da NAD(P)H Oxidase e Translocação da RhoA em Artérias de Resistência. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v.107, n.5, p.427-436, 2016.

JUNG, H. *et al.*, Antioxidant Xanthenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2077-2082, 2006.

KAWANO, T. *et al.*, Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular Pain**. v. 5, p. 12-31, 2009.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. Ed. São Paulo: Roca, parte II, p. 81-163, 2003.

KOPINCOVÁ, J.; PÚZSEROVÁ, A.; BERNÁTOVÁ, I. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? **Pharmacological Reports**. v. 64, n. 3, p.511–520, 2012.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K. V. Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of aqueous extract of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schult. Stem (Amaranthaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6. n. 3, p. 180–187, 2013.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S.K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**. v. 89, p. 86–125, 2013.

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

LAKSHIMI, S. V. *et al.*, Oxidative stress in cardiovascular disease. **Indian Journal os Biochemistry & Biophysics**. v. 46, n. 6, p. 421-440, 2009.

LAVANDEIRA, F.M.F. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto 2014.

LEIGHTON, F.; MIRANDA-ROTTMANN, S.; URQUIAGA, I A central role of eNOS in the protective effect of wine against metabolic syndrome. **Cell Biochemistry &Function**. v. 24, n.4, p. 291–298, 2006.

LEMASTERS, J. J. *et al.*, The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 174, n. 9, p. 159 – 165, 1997.

LIMA, M. M. O., VIEIRA, L. F., COSTA-JÚNIOR, J. S., 2007. **Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae)**. Anais do II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica de João Pessoa, pp. 27-30.

LIMA, G. M. **Efeitos da manteiga da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) em hamsters com hipercolesterolemia induzida por dieta hipercolesterolêmica**. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

LIU, T. *et al.* L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation. **Redox Biology**. v. 26, n.101238, p. 1-10, 2019.

LONG, G.G.; SYMANOWSKI, J.T.; ROBACK, K. Precision in Data Acquisition and Reporting of Organ Weights in Rats and Mice. **Toxicologic Pathology**, v.26, n. 3, p. 316-318, 1998.

LOPES, G. A. D. *et al.*, Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão**. v. 6, n. 2, p. 143-155, 2010.

LUONA, J.S. *et al.*, Expression of Extracellular SOD and iNOS in Macrophages and Smooth Muscle Cells in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. v.18, p157-167, 1998.

LUSTOSA, A. K. M. F. *et al.*, Efecto de las semillas del fruto de *Platonia insignis* contra las formas amastigotes de *Leishmania amazonensis* en el interior de los macrófagos. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s. v. 23, n.2. 2018.

LUSTOSA, A. K. M. F. *et al.*, Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n.1, p. 77-82, 2016.

LUSTOSA, A.K.M.F. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e obtenção tecnológica de forma farmacêutica de uso tópico**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012

MATSUBARA, T.; DHALLA, N. S. Relationship between mechanical dysfunction and depression of sarcolemmal  $Ca^{2+}$ -pump activity in hearts perfused with oxygen free radicals. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 160, n. 1. p. 179 -185, 1996.

MEIRA, E. *et al.*, O Uso de Fitoterápicos na Redução e no Tratamento de Hipertensão Arterial Sistêmica. **Revista multidisciplinar de Psicologia**. v.11, n. 37, p. 27-36, 2017

MELO, A.C.; COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F. C. HPLC quantification of kaurene diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v.72, n. 1, p.40-45, 2001.

MEYER, B. N, *et al.*, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plants Medicinal*. v.45, n. 5, p.31–34,1982.

MEYER, P.; FLAMMER, J.; LÜSCHER, T. Local action of the renin angiotensin system in the porcine ophthalmic circulation: effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists. **Investogative Ophthalmology & Visual Science**. v.36, p.555-562, 1995.

MICHAEL, B. *et al.*, Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. **Toxicologic Pathology**. v.35, n. 5, p.742-750, 2007.

MINUK, G.Y. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. **Canadian Journal of Gastroenterology**.v. 12, n. 6, p.417–21, 1998.

MIWA, K. *et al.*, Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina. **Cardiovascular Research**, v. 41, n. 1, p. 291-298, 1999.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidants assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 57, p. 1655-1668, 2009

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v.43, p.109-114, 1991.

MONCORVO, M.C.R. *et al.*, Tratamento homeopático da hepatotoxicose aguda induzida por tetracloreto de carbono em coelhos. **Ciência Rural**. v.28, n. 3, p.405-409, 1998.

MONTEIRO, A. R. *et al.*, Extraction of the soluble material from shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO<sub>2</sub> and other solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 11, n. 12, p. 91-102, 1997.

MORAIS, L.R.B.; GUTJAHR, E. **Química de Oleogenosas: Valorização da Biodiversidade Amazônica**. Brasília-DF. Ed. GTZ, 2009. 83 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 12, p. 55–63, 1983.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório – Princípios e Interpretações**. Editora Médica Missau, 4 ed, 2003.

MOURAO, K. S. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). II. Morfo-anatomia dos frutos e sementes maduros. **Acta Amazônica**. Manaus, v. 25, n. 12, p. 33-46, 1995.

MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide desmutase – a review: its function, regulation in the testis and role in male fertility. **Contraception**, v.65, p.305-311, 2002.

NAKAE, D. *et al.*, Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. **Cancer Research**. v. 57, p.1281–1287, 1997.

NASCIMENTO, J. L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e  $\beta$ -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante in vitro**. 2014. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí. Teresina-PI, 2014.

NASCIMENTO, J. L. *et al.*, Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2014.

NEVES, J.A; NEVES, J. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 15, n. 3, p. 224-233, 2016.

NGAWHIRUNPAT, T. *et al.*, Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 55-62, 2010.

NOFIANI, R.; KURNIADI, R.; ARDININGSIH, P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coral-associated fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, v.2, n.2, p.212-216, 2011.

NICOLAU, J. C. *et al.*, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 3, p. 1-61, 2014.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351-358, June, 1979.

OZER, J. *et al.*, The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. v. 245, n.3, p.194–205, 2008

PALMER, R.; ASHTON, D.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**.v.333, p.664-666, 1988

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Atenção à Saúde. P2231 Linha guia de hipertensão arterial / SAS. – 2. ed. – Curitiba : SESA, 2018. 52p. Disponível em : [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/HIPER\\_R\\_4\\_web.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/HIPER_R_4_web.pdf). Acesso em 10 de maio de 2019

PARK, W.H., YOU, B.R. Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v.24, n.5, p. 13561362, 2010.

PARK, S.K.; LIN, H.L.; MURPHY, S. Nitric oxide limits transcriptional induction of nitric oxide synthase in CNS glial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.201, p.762–768, 1994.

PARK, S.K.; LIN, H.L.; MURPHY, S. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF- $\kappa$ B binding to DNA. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 609–613, 1997.

PATITUCCI, M. L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; ZOGHBI, M. G. SILVA, J. R. A. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, v. 18, n .3, p. 262-266, 1995.

PAULIS, L. *et al.*, Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-L-arginine-methyl ester hypertensive rats. **Journal of Hypertension Suppl**, v.27, S11–S16, 2009.

PAULIS, L. *et al.*, Regression of L-NAME- induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. **Hypertension Research**, v.31, p.793–803, 2008.

PAYÁ, M., HALLIWELL, B., HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**. v.44, n.2, p. 205-214, Jul.,1992.

PEÇANHA, F.M. **A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos** - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanoídes da via da ciclooxigenase. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES; 2009.

PENNATHUR, S.; HEINECKE, J.W. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. **Current Diabetes Reports**.v.7, n.4, p.257-64, 2007.

PENG, H.B.; LIBBY, P.; LIAO, J.K.; Induction and stabilization of IκBα by nitric oxide mediates inhibition of NF-κB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.14214–14219, 1995.

PFEIFFER, S. *et al.*, Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **British Journal of Pharmacology**. v.118, n.6, p.1433–1440, 1996.

PICCINELLI, A.L. *et al.*, Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n.9, p. 1688-1698, 2009.

PIEGAS, L. S. *et al.*, V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 2, p. 1-105, 2015.

PÓVOA, F. F. Hipertensão como fator de risco cardiovascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 25, n.1, p. 18-22. 2018.

PRABHU, S. D. Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart. **Circulation Research**. 2004v. 14, n.94, p.1155–1157, Mayo, 2004.

PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially. In: (Ed.). Food antioxidants: **Springer**, p. 171-191, 1990.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J. *et al.*, Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 21, n.3, p.1043-105, 2011.

RADOVANOVIC, C. A. T., SANTOS, L. A., CARVALHO, M.D.B., MARCON, S. S. Hipertensão arterial e outros fatores de risco associados às doenças cardiovasculares em adultos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. v. 22, n. 4, p. 547-553, 2014.

RAJAKUMAR, A. R. *et al.*, Protection of coronary angioplasty-induced oxidative stress by Isovue used during angioplasty. **Canadian Journal of Cardiology**. v. 15, n.9, p. 989 - 998, 1999.

RAMOS, L. *et al.*, Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 12, n. 4, p. 169-174, Agosto de 2006.

RAVAROTTO, V. *et al.*, Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle. **Life Sciences**. v. 210, n. 1, p. 125-131, October, 2018.

RIBEIRO, A. G.; COTTA, R. M. M.; RIBEIRO, S. M. R., A Promoção da Saúde e a Prevenção Integrada dos Fatores de Risco para Doenças Cardiovasculares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro. v. 17, n. 1, p.7-17, Janeiro, 2012.

ROCHA, R.M.; MARTINS, W.A. **Manual de prevenção cardiovascular**. 1 ed. São Paulo: planmark; Rio de Janeiro: SOCERJ- Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

RODRIGUES, K. A. *et al.*, Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, n. 3, p. 32-40, 2015.

ROGERS, N.E.; IGNARRO, L.J. Constitutive nitric oxide syn- thase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. **Biochem Biophys Res Commun**, v.189, p.242–249, 1992.

RUBANYI, G.M.; VANHOUTE, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **American Journal of Physiology**., v. 250, p. 82-827, 1986.

RUBIO-MORAGA, A. *et al.*, Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven Helianthemum taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n.1, p. 287-296, June, 2013

RUFINO, M. S. M. *et al.*, Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, n.4, p. 996-1002, 2010.

SAKAGAMI, Y.; IINUMA, M.; PIYASENA, K.G.; DHARMARATNE, H.R. Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. **Phytomedicine**. v. 12, n. 3, p. 203-208, 2005.

SANTOS-JUNIOR, R. Q. *et al.*, Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (Platonia insignis Mart.). **ConScientiae Saúde**. v. 9, n. 4, p. 575581, 2010.

SANTOS, M. R. V. *et al.*, Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade

Federal de Sergipe. **Scientia Plena**. v. 6, n. 10, p. 1-6. 2010.

SANTOS, M. G., PEGORARO, M., SANDRINI, F., MACUCO, E. C.; Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v. 90, n.4, 2008.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais Livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p. 308-313, 2004.

SERAFINI, M.R. *et al.*, Morindacitrifolia Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**. v.14, n. 10, p. 1-8, 2011.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Pará: Belém, CIFOR, Imazon, 2005. 300p.

SHUKLA, V.K. *et al.*, Precise genome modification in the crop species Zea mays using zincfinger nucleases. **Nature** v. 459, n, 7245, p.437–441, 2009.

SILVA, M. V. B. **Avaliação da citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose por diterpenos de Xylopia langsdorffiana St.-Hil. & Tul (Annonaceae)**. 2007. 104. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007

SILVA, V. K. L. D. *et al.*, Stability of the bacuri pulp (*Platonia insignis* Mart.) frozen for 12 months. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.

SILVA BENTES, M. H. *et al.*, Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta Amazônica**, v. 16, p. 363-368, 1986.

SILVA, O. A. *et al.*, Potencial antioxidante in vitro do (-)- $\alpha$ -terpineol. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 140-152, 2012a.

SILVA, C.T. e JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e cultura**, v.66, p.38-42, 2014.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n. 4, 2008.

SINIMBÚ NETO, F. A.; MARTINS, A. B. G.; BARBOSA, J. C. Viabilidade in vitro de grãos de pólen de bacurizeiro – Clusiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 593-600, 2011.

SINGH, R. B.; NIAZ, M. A.; RASTOGI, S. S.; RASTOGI, S., Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarction (the Indian experiment of infarct survival-3). **American Journal of Cardiology**. v. 77, p. 232 – 236, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC. **VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Rio de Janeiro. v. 107, n.3, s. 3, Setembro 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v. 89, n. 3, p. 24-79, Setembro 2007.

SOUSA, C. M. M.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H., **Constituintes químicos voláteis e não voláteis de cascas do fruto do bacuri (Platonia insignis)**. Resumo da 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.

SOUSA, A.M., PRADO, W.A., The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**. v. 897, p. 9-19, 2011.

STORCH, A. S. *et al.* Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. Rio de Janeiro, v.30, n.3, p.262-273, Julho de 2017.

TAMPO, Y.; YONAHARA, M. Vitamin E and Glutathione are Required for Preservation of Microsomal Glutathione S-Transferase from Oxidative Stress in Microsomes, **Farmacology e Toxicology**. V.66, p. 259-265, 1990.

TANNO, A. P., MARCONDES, F. K., Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v..38 n.3, p.273-289, 2002

TAPIERO, H.; TEW, K.D. The importance of glutathione in human disease. Elsevier, **Biodedecine & Pharmacotherapy**, v.57, n. 3-4, p. 145-155, 2003

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Caps 21, 22, 23 e 26. São Paulo: Roca, 2007.

TEIXEIRA, B.C. *et al.*, Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**. Porto Alegre. v.13, n.2, p. 108-115, 2014.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. Roca: São Paulo, p. 335354, 2007

THRALL, M.A. *et al.*, **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015

TSIMIKAS S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**. v. 98, n.11A, p. 9-17, 2006.

VARGAS, F. Cardiovascular and Renal Manifestations of Glutathione Depletion Induced by Buthionine Sulfoximine. **American Journal of Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 629-635, 2012.

VAZIRI, N.D.; NI, Z.; OVEISI, F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in

young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 31, p. 1248–1254, 1998.

VAZIRI, N.D.; NI, Z.; OVEISI, F.; TRNAVSKY-HOBBS, D.L. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, p. 957–964, 2000.

VAZIRI, N.D. WANG, X.Q., cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. **Hypertension**, v.34, p.1237–1241, 1999.

VASCONCELOS S.M.L.; GOULART, M.O.F.; SILVA, M.A.M., GOMES, A.C.M.; Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v.14, n.4, p. 269-274, 2007.

VRANKOVA, S. et al., Effect of nuclear factor kappa B inhibition on L-NAME-induced hypertension and cardiovascular remodelling. **Journal Hypertension**, v. 28, Suppl 1, p. 45–49, 2010.

WATTANAPITAYAKULA, S. K.; BAUERB, J. A. Oxidative pathways in cardiovascular disease Roles, mechanisms, and therapeutic implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.89, p. 87 – 206, 2001.

WANG, Y. *et al.*, Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 6, p. 1915-1928, 2018.

WIESE, L. P. L.; **Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de Alternanthera tenella Colla**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, 2008. 79pg.

Wilcox, C.S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.289, p.913–935, 2005.

WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. **Journal of Free Radicals Biology and Medicine**, v.1, p.43-49, 1985.

WU, C. C. *et al.*, Phloroglucinols with prooxidant activity from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 246-250, 2008.

YANG, Z. *et al.*, Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. **Circulation Research**. v.68, p.52-60, 1991.

YUGAR-TOLEDO J.C. *et al.*, Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 22, n. 3, p.84-92, 2015

ZARENA, A.S.; UDAYA SANKAR, K. Supercritical carbon dioxide extraction of xanthenes with antioxidant activity from *Garcinia mangostana*: Characterization by HPLC/LC–ESI-MS.

**The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, n. 3, p. 330-337, 2009

ZHEN J. *et al.*, Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. **American Journal of Hypertension**, v.21, p.28–34, 2008.

ZIN, Z.M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**. v.78, n.2, p.227-231, August 2002.