

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Edla de Azevedo Herculano

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE EXTRATO SECO DE
PRÓPOLIS VERMELHA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Maceió – AL

2017

EDLA DE AZEVEDO HERCULANO

**Avaliação da Atividade Cardiovascular do Extrato Seco de Própolis Vermelha em Ratos
Espontaneamente Hipertensos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo
Júnior

Co-orientadora: Prof^{ca}. Dr.^a. Êurica Adélia
Nogueira Ribeiro

Maceió – AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

H539a Herculano, Edla de Azevedo.
Avaliação da atividade cardiovascular de extrato seco de própolis vermelha em ratos espontaneamente hipertensos / Edla de Azevedo Herculano. – 2017. 92 f. : il., tab.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientadora: Éurica Adélia Nogueira Ribeiro.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 76-92.

1. Própolis vermelha brasileira. 2. Hipertensão. 3. Disfunção endotelial.
I. Título.

CDU: 543.066:638.135



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA





BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Edla de Azevedo Herculano** intitulada: “**Avaliação da Atividade Cardiovascular de Extrato Seco de Própolis Vermelha em Ratos Espontaneamente Hipertensos**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 23 de março de 2017, às 09h00, no Auditório do Severinão da UFAL

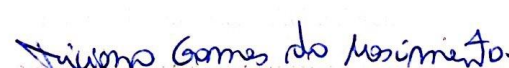
COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Luciano Meireles Grillo
(Esenfar/UFAL)


Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
(Esenfar/UFAL)

Aos meus pais, José Maria Herculano (*in memoriam*) e Ivania Maria Herculano, que nunca mediram esforços por minha educação e formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por permitir minhas conquistas e dar-me forças diante dos obstáculos;

Aos meus irmãos **Wagner** e **Yuri**, pelo carinho e apoio;

Ao meu tio **Severino Mendes**, pelo incentivo e por sempre apoiar minhas decisões;

Às minhas amigas **Cintia Danieli**, **Amanda Karine** e **Jessyka Galvão** pelo apoio, companheirismo e incentivo apenas encontrados em uma amizade verdadeira como a que construímos;

Aos colegas do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular** que contribuíram direta ou indiretamente para realização do trabalho, especialmente **Carlos Alberto**;

A Prof.^a Dr.^a **Êurica Adélia Nogueira Ribeiro**, pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. **João Xavier** pela oportunidade e apoio aos projetos em que estive inserida desde minha iniciação científica;

Ao **CNPq**, **Fapeal**, **CAPES** e **FINEP** pelo apoio financeiro.

Muito obrigada

Edla de Azevedo Herculano

RESUMO

Estima-se que hipertensão arterial é o principal fator de risco para doença cardiovascular. Sua prevalência parece ser cerca de 30-45% da população mundial. Contudo, apesar do conhecimento atual, a adesão ao tratamento da hipertensão a longo prazo ainda é baixa. A própolis vermelha brasileira apresenta grande teor de compostos fenólicos em sua constituição química, dentre os quais destacam-se as isoflavonas, metabólitos com efeitos benéficos para doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos cardiovasculares de um sistema gastrorresistente de própolis vermelha (ESPV, patentes registradas BR 10 2012 013590-6 A2 e WO 2014/186851) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A análise HPLC-UV demonstrou a presença dos marcadores químicos para propolis na composição química do ESPV: daidzeína, biochanina A, liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina e pinocembrina. A avaliação da citotoxicidade de ESPV, em macrófagos J774 através do ensaio de MTT, revelou $IC_{50} = 72,86 \mu\text{g/mL}$. A injeção intravenosa de ESPV causou um efeito hipotensor dependente de dose (0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg), sem alterar a frequência cardíaca em SHR consciente. O efeito hipotensor não foi afetado pela anestesia. Em anéis de artéria mesentérica pré-contráídos com fenilefrina $10 \mu\text{M}$, ESPV induziu vasorrelaxamento ($E_{\text{max}} = 100 \pm 0,4\%$; $pD_2 = 1,08 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) que foi afetado pela remoção do endotélio ($E_{\text{max}} = 56,7 \pm 2\%$; $pD_2 = 1,37 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$). Na avaliação do efeito anti-hipertensivo, o ESPV (75 e 150 mg / kg) foi administrado oralmente a SHRs jovens (11 semanas de idade) e adultos jovens (24 semanas de idade), a pressão sistólica foi então avaliada através do método de medida indireta de pressão arterial tail-cuff antes e 7, 14, 21 e 28 dias após o início do tratamento. Desta forma, observou-se um efeito anti-hipertensivo significativo a partir do 14º dia de tratamento apenas em SHR de adultos jovens, com diminuição de 56 mmHg em comparação com a pressão arterial sistólica basal. Além disso, o tratamento reduziu a hipertrofia ventricular esquerda em SHR de adultos jovens como evidenciado pela morfometria miocárdica. Além disso, a função vascular das artérias mesentéricas de SHR tratados com SHR também foi investigada, o relaxamento independente do endotélio foi avaliado através de uma curva concentração-resposta para nitroprussiato de sódio ($10^{-3} - 3.10^{-4} \text{ M}$), e sob estas condições permaneceram inalteradas em comparação ao controle. Por outro lado, o relaxamento dependentes do endotélio à avaliado através da curva para acetilcolina ($10^{-3} - 3.10^{-4} \text{ M}$) apresentou melhorara significativa ($E_{\text{max}} = 76,4 \pm 3,8\%$ e $pD_2 = -8,72 \pm 3,8 \text{ M}$). Por conseguinte, para avaliar o relaxamento dependente de NO, investigou-se a reatividade vascular à acetilcolina ($10^{-3} - 3.10^{-4} \text{ M}$) na presença do inibidor inespecífico de NOS, L-NAME (3.10^{-3} M). Nestas condições, a resposta relaxante foi abolida ($E_{\text{max}} = 18,9 \pm 1,65\%$ e $pD_2 = -5,12 \pm 0,33 \text{ M}$). Resultados similares, foram obtidos ao avaliar o relaxamento da acetilcolina na presença de L-NAME mais um antagonista da ciclo-oxigenase, a indometacina (10^{-3} M) ($E_{\text{max}} = 15,90 \pm 1,32\%$ e $pD_2 = -5,39 \pm 0,24 \text{ M}$), indicando que a resposta ao tratamento com ESPV envolve o aumento do relaxamento dependente de óxido nítrico via NOS. Estes resultados revelaram que o ESPV é eficaz para promover redução da pressão arterial apenas de SHR adultos jovens, que o efeito anti-hipertensivo está associado com a redução da hipertrofia ventricular esquerda e provavelmente pela diminuição da resistência vascular periférica, melhorando a função endotelial e aumentando o relaxamento dependente de NO através da NOS.

Palavras-chaves: Própolis vermelha brasileira; hipertensão, disfunção endotelial e SHR.

ABSTRACT

Arterial hypertension it is the leading risk factor for cardiovascular disease. Its prevalence appears to be about 30-45% of the general population. Despite current knowledge the long-term adherence to cardiovascular drugs is still low in hypertension treatment. The Brazilian red propolis has a large content of phenols compounds such as isoflavones, this have been reported to exert beneficial effects in cardiovascular disease, including hypertension. Therefore the objective of this study was to investigate cardiovascular effects from a red propolis gastroretentive system (ESPV, patents register numbers BR 10 2012 013590-6 A2 and WO 2014/186851) in spontaneously hypertensive rats (SHR). The HPLC-UV analysis showed in ESPV chemical composition the presence propolis chemical markers: daidzein, biochanin A, liquiritigenin, pinobanksin, isoliquiritigenin, formononetin and pinocembrina. The cytotoxicity from ESPV was evaluate on macrophage J774 by MTT assay and exhibited $IC_{50} = 72.86 \mu\text{g/mL}$. Intravenous injection of ESPV caused a hipotensive dose-dependent effect at 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 mg/kg, unchanges heart rate in conscious SHR. The hypotensive effect was not affected by anesthesia. In intact rings of rat mesenteric artery pre-contracted with $10 \mu\text{M}$ phenylephrine, ESPV induced relaxations ($E_{\text{max}} = 100 \pm 0.4 \%$; $pD_2 = 1.08 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$) that were affected by endothelium removal, ($E_{\text{max}} = 56.7 \pm 2 \%$; $pD_2 = 1.37 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$). In an antihypertensive study, ESPV (75 and 150 mg/kg) was orally administered to Juvenile (11-week-old) and young adult (24-week-old) SHRs, and the systolic pressure were measured using the tail-cuff method before and 7, 14, 21 and 28 days after beginning of treatment. Was observed a significant antihypertensive effect from 14th day of treatment only in young adult SHR, with decreased by 56 mmHg compared with baseline systolic blood pressure. Furthermore, the treatment reduced left ventricular hypertrophy in young adult SHR as evident by myocardial morphometry. The vascular function of mesenteric arteries was also investigated at the end of the treatment with ESPV in young adult SHR, the endothelium-independent relaxations to sodium nitroprusside (10^{-3} to 3.10^{-4} M) was unchanged compared to control. For other hand, endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (10^{-3} to 3.10^{-4} M) was markedly improve ($E_{\text{max}} = 76.4 \pm 3.8\%$ e $pD_2 = -8.72 \pm 3.8$ M). We therefore investigated vascular reactivity to acetylcholine (10^{-3} to 3.10^{-4} M) also in the presence of the nonspecific NOS inhibitor L-NAME (3.10^{-3} M), in order to assess NO-dependent relaxation. In these, relaxation response was abolished ($E_{\text{max}} = 18.9 \pm 1.65\%$ e $pD_2 = -5.12 \pm 0.33$ M). Similary, the acetylcholine relaxation in the presence of L-NAME plus a cyclooxygenase antagonist, indomethacin (10^{-3} M), was too antagonized ($E_{\text{max}} = 15.90 \pm 1.32 \%$ e $pD_2 = -5.39 \pm 0.24$ M), indicating that the response to ESPV treatment involves the enhancement of the nitric oxide via NOS relaxations. These results disclosed that ESPV is effective to lower blood pressure only of young adult SHR, its antihypertensive effect is associated with lowering left ventricular hypertrophy and probably by decrease peripheral vascular resistance, improving endothelial function and increasing the NO-dependent relaxation via NOS.

Keywords: Brazilian red propolis; hypertension, endothelial dysfunction and SHR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Própolis vermelha	21
Figura 2 – Estrutura química dos principais tipos de flavonoides	23
Figura 3 – Projeção de mortalidade de 2008 à 2030.	25
Figura 4 – Mecanismos de controle da pressão arterial.	28
Figura 5 – Mecanismos de acoplamento excitação–contração vascular.	29
Figura 6 – Relaxamento da célula muscular vascular lisa via difusão dos fatores relaxantes derivados do endotélio.	31
Figura 7 – Relaxamento da célula muscular vascular lisa através da ativação da PKG via NO	32
Figura 8 – Obtenção da fase clorofórmica de propolis vermelha alagoana.	39
Figura 9 – Processo de emulsificação da própolis vermelha.	40
Figura 10 – Secagem em Spray-Drier do sistema emulsificante.	41
Figura 11 – Representação esquemática referente ao protocolo experimental para avaliação do efeito de ESPV e ECPV sobre a PAM e FC em SHR não anestesiados.	44
Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito anti-hipertensivo induzido pelo ESPV em ratos SHR não anestesiados	45
Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de ESPV sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR.	47
Figura 14 – Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da resposta vascular e endotelial em anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adulto tratados por 28 dias com ESPV.	47
Figura 15 – Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da resposta endotelial em anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adulto tratados por 28 dias com ESPV.	48
Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de isoflavonas na concentração de 500 µg/mL.	49
Figura 17 – Cromatograma dos extratos de própolis à 200 µg/mL no comprimento de onda 280 nm, em A ECPV e B ESPV	50
Figura 18 – Cromatograma dos extratos de PVA à 200 µg/mL no comprimento de onda 366 nm, em A ECPV e B ESPV.	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da própolis vermelha alagoana sobre a viabilidade celular m macrófagos da linhagem (J774).	52
Gráfico 2 – Efeito do ESPV e ECPV sobre a PAM e FC em SHR adultos não-anestesiados.	54
Gráfico 3 – Efeito do ESPV sobre a PAM e FC em SHR adultos anestesiados.	55
Gráfico 4 – Efeito do ESPV em anéis de artéria mesentérica superior de SHR adultos pré-contraído com FEN.	56
Gráfico 5 – Efeito do ESPV na PAS de SHR jovens tratados por 28 dias.	57
Gráfico 6 – Efeito do ESPV em SHR adultos tratados por 28 dias	58
Gráfico 7 – Comparação do efeito do ESPV em SHR jovens e adultos tratados por 28 dias.	59
Gráfico 8 – Efeito do tratamento de ESPV sobre a morfometria do miocárdio.	59
Gráfico 9 – Avaliação da resposta vascular à ACh em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.	62
Gráfico 10 – Avaliação da resposta vascular ao NPS em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.	64
Gráfico 11 – Comparação da resposta vascular à ACh na presença e ausência de L-NAME em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.	65
Gráfico 12 – Comparação da resposta vascular à ACh na presença e ausência de L-NAME e INDO em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de própolis difundidos: origens botânicas e principais constituintes.	17
Tabela 2 – Classificação da própolis brasileira segundo Park et al. (2000).	28
Tabela 3 – Principais modelos experimentais desenvolvidos para o estudo da hipertensão arterial sistêmica.	33
Tabela 4 – Composição da solução nutritiva Tyrode.	38
Tabela 5 – Efeito de ESPV e ECPV sobre a viabilidade celular.	53
Tabela 6 – Comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 de ESPV em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	55
Tabela 7 – Peso corporal médio de SHR tratados com ESPV por 28 dias.	60
Tabela 8 – Efeitos da curva concentração-resposta à ACh em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos após tratamento por 28 dias com ESPV pré-contraídos com FEN.	62
Tabela 9 – Comparação dos $E_{máx}$ e pD_2 de anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos após tratamento por 28 dias com ESPV em diferentes condições experimentais.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADH	Hormônio antidiurético
AVE	Acidente vascular encefálico
ANG II	Angiotensina tipo 2
BHR	Ratos com Hipertensão Limítrofe
CAPE	Éster fenetil do ácido caféico
Ca ²⁺	Íon cálcio
CDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
CLMV	Célula Muscular Vascular
COX	Ciclooxigenase
DC	Débito cardíaco
DCBEN	2,2-dimetil-6-carboxietil-2H-1-benzopirano
DHCA	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinnamico
DOCA-sal	Ratos Hipertensos por Sal e Mineralocorticoides
DPB	Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano
ECPV	Extrato clorofórfimico de própolis vermelha alagoana
ESPV	Extrato seco de própolis vermelha alagoana
EVE	Espessura ventricular esquerda
FC	Frequência cardíaca
FCDE	Fatores contracturantes derivados do endotélio
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDE	Fatores relaxantes derivados do endotélio
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-2	Vírus da herpes simplex tipo 2

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICC	Insuficiência cardíaca
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% das células
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginina metil éster
MS	Espectroscopia de massa
MTT	Teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NO	Óxido nítrico
NOS	NO-sintase
NOSe	NO-sintase endotelial
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Peso corporal médio
PCA	Análise dos componentes principais
PCo	Peso cardíaco
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PVA	Própolis vermelha alagoana
PVE	Peso do ventrículo esquerdo
RVPT	Resistência vascular periférica total
SAD	Hipertensão por Desnervação do Barorreceptores Sino-Aórticos
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SHRSP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos ao AVE
SNC	Sistema nervoso central
SCV	Sistema cardiovascular
TGR	Ratos com Hipertensão Transgênica
UV- <i>vis</i>	Região de absorção nas regiões ultravioleta visível
v.o.	Via orogástrica
WKY	Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Própolis	16
1.1.1 Própolis brasileira	18
1.2 Hipertensão arterial sistêmica	24
1.3 Controle da pressão arterial e vasorrelaxamento	26
1.4 Modelos experimentais para o estudo da hipertensão	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 MATERIAL	37
3.1 Animais	37
3.2 Drogas e reagentes	37
4 MÉTODO	38
4.1 Obtenção da fase clorofórmica do extrato de própolis vermelha alagoana	38
4.2 Obtenção do extrato seco de própolis vermelha alagoana	39
4.3 Avaliação do conteúdo fenólico de ESPV e ECPV	41
4.4 Ensaios farmacológicos	42
4.4.1 Ensaios de viabilidade celular <i>in vitro</i>	42
4.4.2 Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i>	42
4.4.3 Ensaios farmacológicos para testes <i>ex vivo</i>	45
4.5 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Avaliação do conteúdo fenólico do ECPV e ESPV por hplc acoplado à uv-vis	49
5.2 Efeito de ECPV e ESPV sobre a viabilidade celular em macrófagos	52
5.3 Efeito do ESPV e ECPV sobre pressão arterial média e frequência cardíaca	53
5.3.1 Efeito do ESPV e ECPV sobre PAM e FC de SHR adultos.	53
5.3.2 Efeito do ESPV e ECPV sobre PAM e FC de SHR adultos anestesiados.	54
5.4 Efeito do ESPV sobre anéis de artéria mesentérica de SHR adultos	55
5.5 Avaliação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR adultos	56
5.6 Avaliação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR jovens	57
5.7 Comparação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR jovens e adultos	58
5.8 Avaliação do peso médio de SHR submetidos ao tratamento com ESPV	59
5.9 Avaliação da morfometria do miocárdio	60
5.10 Avaliação da reatividade vascular	61
5.10.1 Avaliação da presença do endotélio funcional na resposta vascular à adição de ACh	61

5.10.2	Avaliação da resposta vascular á adição de NPS	63
5.10.3	Avaliação da participação da via da NOS na resposta endotelial.....	64
5.10.4	Avaliação da participação da via da NOS na resposta endotelial à adição de ACh.	65
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis

A própolis (*pró* = em defesa e *polis* = cidade) é produzida pelas abelhas e empregada na proteção da colmeia e da colônia. Este produto consiste em uma mistura complexa de compostos químicos produzido a partir da coleta de substâncias de diversas plantas (GHEDIRA; GOETZ; LE JEUNE, 2009).

Sua análise física evidencia diferentes aromas e cores (verde, vermelho, marrom ou amarela), a depender tanto da idade quanto região de origem, além de uma consistência maleável e aderente sob temperaturas elevadas, enquanto que em ambientes frios enrijece e torna-se quebradiça, por isso é comumente denominada de “cola de abelha” (MARCUCCI, 1995). A análise química, por sua vez, revela uma constituição variável na qual observa-se em geral 50% de resina, 30% de cera, 5% de pólen, 10% de óleo essencial e 5% de outras substâncias, entre elas, ésteres, flavonas, flavononas, terpenos, aldeídos aromáticos, álcoois, ácidos graxos, estilbenos e β -esteróides, destacando-se flavonoides e os compostos fenólicos e aromáticos (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015)

Entretanto, apesar destas características bem delineadas, a própolis não possui um padrão quanto sua constituição orgânica, pois como as abelhas coletam substâncias de plantas, sua composição está diretamente relacionada aos aspectos botânicos destas, que por sua vez resulta das propriedades climáticas e geográficas locais (WALKER; CRANE, 1987; CRANE, 1990; MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2005b). Deste modo, pode-se afirmar que a comparação entre a constituição química de própolis produzidas em diferentes regiões do mundo, como por exemplo, Brasil e Bulgária, assemelha-se a comparar a complexidade de duas plantas de famílias distintas (BANKOVA, 2005a).

Devido a esta variabilidade química, muitos estudos acerca das atividades biológicas de seus compostos foram realizados nas últimas décadas (BURDOCK, G., 1998; KUJUMGIEV et al., 1999; BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; CASTALDO; CAPASSO, 2002; SFORCIN, 2007; BANKOVA, 2009; GHEDIRA; GOETZ; LE JEUNE, 2009; POPOVA et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011), o que possibilitou classificar os diversos tipos de própolis de acordo com os constituintes químicos biologicamente ativos e com base na planta utilizada pelas abelhas como principal fonte de substâncias (origem botânica) (BANKOVA, 2005b). A tabela 1 elenca os principais tipos de própolis de acordo com sua origem geográfica, botânica e principais constituintes biologicamente ativos.

Além das espécies citadas na tabela, outras também plantas são consideradas fontes botânicas para produção de própolis, e seus constituintes químicos despertam interesse da comunidade científica devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas.

Atualmente mais de 300 constituintes químicos foram identificados (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Essa identificação tornou-se possível devido ao desenvolvimento de técnicas de purificação, separação e identificação químicas mais sensíveis, como a cromatografia líquida de alta performance (CLAE ou HPLC), a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE), a cromatografia gasosa (CG) e a espectrometria de massa (MS) (ALENCAR et al., 2007; CASTRO et al., 2007).

Tabela 1 – Principais tipos de própolis difundidos: origens botânicas e principais constituintes.

Tipo de Própolis	Origem Geográfica	Origem Botânica	Principais Constituintes
Poplar	Europa, América do Norte, regiões não tropicais da Ásia, Nova Zelândia	<i>Populus</i> spp. da seção Aigeiros, mais frequente <i>P. nigra</i> L.	Flavonas, flavanonas, ác. cinâmico, outros ésteres
Verde (alecrim) Brasileira	Brasil	<i>Baccharis</i> spp., predominante <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Derivados prenilados do ác. p-cumárico, ác. diterpênicos
Bétula	Rússia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh	Flavonas, flavanonas (diferentes do tipo poplar)
Vermelha	Cuba, Brasil, México	<i>Dalbergia</i> spp.	Isoflavonoides (pterocarpanos e isoflavanos)
Mediterrânea	Sicília, Grécia, Creta, Malta	Cupressaceae (espécies não identificadas)	Diterpenos (principalmente do tipo labdânicos)
Clusia	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Pacífica	Região do pacífico	<i>Macaranga tanarius</i>	Flavonanas-C-preniladas

Adaptado de SFORCIN; BANKOVA, 2011.

Desta forma, tornou-se possível a identificação de compostos antes não encontrados em amostras de própolis, a exemplo de flavonoides, terpenos, ésteres fenólicos, minerais, e açúcares (HUANG et al., 2014).

Além disso, tornou-se possível caracterizar a constituição química da própolis, também, através das características climáticas regionais de sua origem botânica (CASTRO et al., 2007; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Onde, países de regiões temperadas, apresentam maior concentração de flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000), enquanto que países tais quais, Grécia, Argélia e Croácia, situados na região do mediterrâneo destacam-se pela presença de diterpenos (POPOVA et al., 2009) na Áustria os estilbenos prenilados predominam (ABU-MELLAL et al., 2012), em Taiwan e regiões do Japão, as flavononas preniladas (CHEN et al., 2003; KUMAZAWA et al., 2004) e nos países tropicais, como o Brasil, uma diversidade de compostos fenólicos são considerados majoritários (BANKOVA, 2009; SARTORI 2012).

1.1.1 Própolis brasileira

1.1.1.1 Classificação

Em 1956, as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier) foram introduzidos no sudeste brasileiro e devido à uma fuga de abelhas rainhas, um processo de africanização ocorreu com as abelhas presentes no Brasil, dando origem às abelhas responsáveis pela produção de própolis (SHEPPARD et al., 1991). Estas abelhas apresentam preferências por certas características das plantas, distinguindo-as e podendo produzir os mais variados tipos de própolis de acordo com a variedade botânica local (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

O Brasil destaca-se por ser o país com maior biodiversidade do mundo, abrangendo mais de 20% das espécies da fauna e flora existentes na Terra (MMA, 2016). Várias são as possíveis fontes botânicas para produção de própolis pelas *A.m scutellata*, havendo predominância de determinada espécie botânica de acordo com a região do país (DUTRA et al., 2008; TORETI et al., 2013). Dentre as possibilidades destacam-se as espécies *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), *Populus alba* (Salicaceae) no sul (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PARK et al., 2004) e *Hyptis divaricate* e *Dalbergia ecastaphyllum* (Fabaceae) no nordeste (DAUGSCH et al., 2008) Diante do exposto, o Brasil apresenta uma vasta variedade de própolis quando comparados à outros países (SILVA et al., 2008), sendo essa, categorizada em 12 grupos segundo PARK et al. (2000) (Tabela 2).

A classificação de Park estabeleceu-se de acordo com a área geográfica das própolis analisadas, por meio de análises cromatográficas e espectrofotométricas (de absorção na região ultravioleta-visível, UV-*vis*; CLAE e CCDAE) e físicas, bem como avaliações das atividades antimicrobianas, anti-HIV, citotóxicas e antioxidantes (PARK et al., 2000). Desta forma, Park possibilita uma análise qualitativa e quantitativa destas características, através da qual observa-

se diferenças nas atividades biológicas de acordo com sua composição química (CASTRO et al., 2007).

Tabela 2 – Classificação da própolis brasileira.

Grupo	Cor	Área Geográfica
1	Amarelo	Sul (RS)
2	Castanho claro	Sul (RS)
3	Castanho escuro	Sul (PR)
4	Castanho claro	Sul (PR)
5	Marrom esverdeado	Sul (PR)
6	Marrom avermelhado	Nordeste (BA)
7	Marrom esverdeado	Nordeste (BA)
8	Castanho escuro	Nordeste (PE)
9	Amarelo	Nordeste (PE)
10	Amarelo escuro	Nordeste (CE)
11	Amarelo	Nordeste (PI)
12	Verde ou Marrom esverdeado	Sudeste (SP)

RS – Rio Grande do Sul; PR – Paraná; BA – Bahia; PE – Pernambuco; CE – Ceará; PI – Piauí; SP – São Paulo.

Adaptado de PARK, 2000.

Além da classificação de Park (2000; 2004), demais autores relataram a presença de marcadores químicos nos diversos grupos de própolis (ALENCAR et al., 2007; BANKOVA, 2009; MARCUCCI et al., 2000; POPOVA et al., 2009; SALANTINO et al., 2005; SILVA et al., 2008). Estes estudos, tornaram a identificação dos mesmos uma ferramenta fundamental na classificação da própolis brasileira.

Desda forma, tonou-se possível a identificação de um novo tipo de própolis, o 13º grupo, encontrado nas regiões litorâneas dos estados Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia e denominado de própolis vermelha (SILVA et al., 2008). Assim, a classificação de Park associada aos conhecimentos acerca dos marcadores químicos, são essenciais aos trabalhos científicos que têm em vista as propriedades da própolis brasileira (ADELMANN et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; DE MENDONÇA et al., 2015)

1.1.1.2 Características químicas e farmacológicas

Apesar da análise química da própolis ser considerada complexa devido ao fato de se tratar de uma mistura de compostos dependente da flora de cada região e da época do ano

(NASCIMENTO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010), as inúmeras propriedades biológicas benéficas à saúde têm aumentado o interesse não apenas de seu consumo por parte da população (BURDOCK, G. A., 1998; DAUGSCH et al., 2008), mas também das indústrias farmacêuticas e alimentícia no desenvolvimento de novos produtos derivados da própolis (CASTALDO; CAPASSO, 2002; FERNANDES et al., 2014). Neste contexto, a maior parte dos estudos quanto a composição química e relevância biológica da própolis brasileira corresponde à própolis verde, vermelha e marrom (MENEZES, 2005; TEIXEIRA et al., 2005; DA SILVA FROZZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; PIMENTA et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Esta última, encontra-se amplamente distribuída pelas regiões do país e apresenta coloração variada, do marrom escuro ao marrom avermelhado (FERNANDES et al., 2014). Uma vez que o interesse por parte da comunidade científica por este tipo de própolis é recente, dados a respeito de suas atividades biológicas ainda são escassos (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; SANTANA et al., 2014). Contudo, observaram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes com redução de lesões causadas pelo vírus da herpes simplex tipo 2 (HSV-2) em ratas. A avaliação do conteúdo fenólico revelou predominância de galangina (flavonoide) e éster fenil do ácido caféico (CAPE, cumarina) (SARTORI et al., 2012). Sendo a mistura total de compostos fenólicos responsável pelas atividades em questão, pois um único constituinte da própolis não apresenta uma atividade maior que o total do extrato (KUJUMGIEV et al., 1999). A esta mesma conclusão a cerca dos constituintes fenólicos chegaram Fernandes et al. (2014) e Pimenta et al. (2015) ao avaliarem as atividades de imunomodulação, antioxidante, antimicrobiana e antígenotóxica. Além de compostos fenólicos, a própolis marrom caracteriza-se por vasto conteúdo de diterpenos com atividades antileishmania e antitumoral (MIDORIKAWA et al., 2001; SANTANA et al., 2014; TAZAWA et al., 2016).

Por outro lado, diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura a respeito das propriedades químicas e farmacológicas da própolis verde (12º grupo). Sendo esta considerada uma importante fonte de metabólitos farmacologicamente ativos, devido à presença de uma variedade de constituintes químicos (CASTRO et al., 2007a; NUNES; GUERREIRO, 2012). Como resultado dessa complexidade química, a própolis verde pode apresentar subtipos, o que torna confusa a padronização de seu perfil químico (NEGRI; SALATINO; SALATINO, 2003).

Apesar disto, pode-se destacar como característica química a presença de fenilpropanóides prenilados, como a Artepilina C (PARK et al., 2004) e 3-prenilcinamato de alila proposto como um novo marcador químico de própolis verde, além de terpenos e derivados do ácido cinâmico prenilados e não prenilados (NASCIMENTO et al., 2008). A presença destes compostos é fortalecida pelos achados de Teixeira et al. (2005), entretanto, contrasta com os

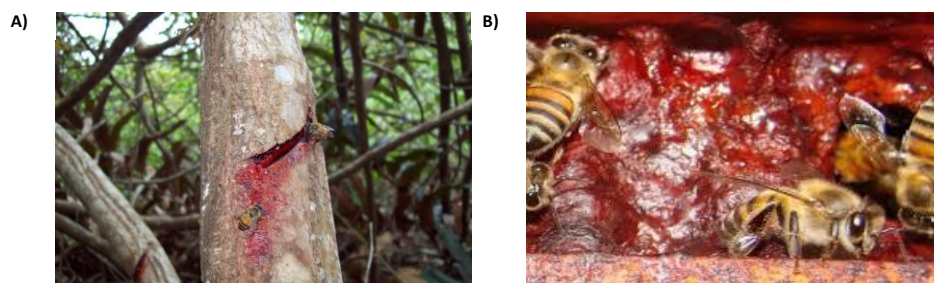
estudos que descrevem presença de ácidos clorogênicos, cafeoilquínicos (KUMAZAWA et al., 2004) e benzoicos (NEGRI; SALATINO; SALATINO, 2003) como constituintes majoritários.

Ainda sobre a própolis verde, no que se diz respeito ao seu perfil químico, está bem evidenciado na literatura um baixo teor de flavonoides (PEREIRA et al., 2000), compostos de alta relevância farmacológica (CORRADINI et al., 2011) e encontrados em altas concentrações nas própolis verdes da Europa, China e Uruguai (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). Estas diferenças são consequências da discrepância entre as origens botânica e características climáticas locais (KUMAZAWA et al., 2004), sendo a brasileira produzida principalmente através do arbusto alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) nas regiões sul e sudeste do Brasil (PARK et al., 2004).

Além do já exposto, a própolis verde, possui um alto potencial terapêutico e muitas ações farmacológicas foram estudadas (LUSTOSA et al., 2008) . Entre elas encontram-se as atividades antibacteriana (CASTRO et al., 2007b), anti-influeza (URUSHISAKI et al., 2011) ,anti-inflamatória (MOURA et al., 2011; SZLISZKA et al., 2013; SANTANA et al., 2014) , antitripanossoma (SANTANA et al., 2014) , anticâncer (SZLISZKA et al., 2011) , neuroprotetora (NAKAJIMA et al., 2009) e anti-hipertensiva (MARUYAMA et al., 2009; MOURA et al., 2011).

Como fonte de metabólitos ativos, destaca-se também a própolis vermelha, 13º grupo segundo a classificação de Park (ALENCAR et al., 2007). Esta denominação ocorre em razão de sua coloração vermelha, e deve-se ao fato de sua fonte botânica *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Fabaceae, nome popular: Rabo de Bugio) apresentar exsudatos e resina avermelhados (Figura 1) (SILVA et al., 2008).

Figura 1 – Própolis vermelha



A) Abelha *A.m scutellata* coletando exsudatos vermelhos de *D.ecastophyllum* e B) produção de própolis vermelha pelas *A.m scutellata*.

A composição química, de forma semelhante aos demais tipos de própolis, varia de acordo com as características regionais (DAUGSCH et al., 2008), e como a própolis vermelha está amplamente distribuída no nordeste os estudos quanto ao seu perfil químico são confusos. (DAUGSCH et al., 2008; NUNES et al., 2009; LÓPEZ; SAWAYA, 2012; LÓPEZ et al., 2014).

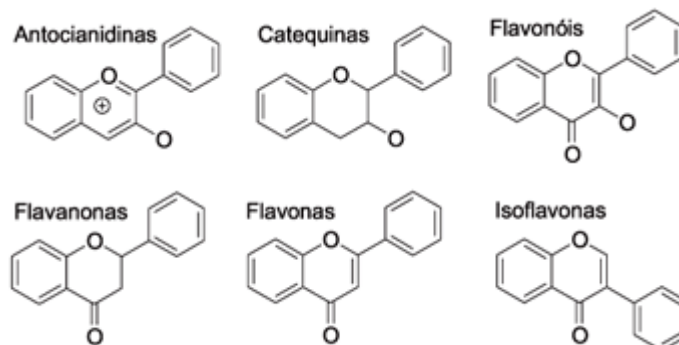
Por outro lado, diversos estudos encontrados na literatura descrevem o padrão fitoquímico da própolis vermelha originada no estado de Alagoas, chamada de Própolis Vermelha Alagoana – PVA (TRUSHEVA et al., 2006; ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; INUI et al., 2014; DE MENDONÇA et al., 2015).

A princípio, foram descritos 14 compostos na PVA onde seis estavam ausentes em outros tipos de própolis brasileira (TRUSHEVA et al., 2006). Em seguida, constatou-se a presença de compostos fenólicos como a quercetina, daidzeína e ácido felúrico, além de algumas isoflavonas não identificadas nas demais própolis brasileiras (ALENCAR et al., 2007). Desta forma, pôde-se observar que PVA apresenta alto teor de compostos fenólicos em sua composição química, onde destacam-se as isoflavonas (DE MENDONÇA et al., 2015).

Os compostos fenólicos consistem ampla família de metabólitos secundários com grande valor para comunidade científica devido a gama de atividades biológicas na qual está envolvida (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; CAROCHO; FERREIRA, 2013; RANGEL-HUERTA et al., 2015; TRACANNA et al., 2015; HUGEL et al., 2016; NICKEL et al., 2016). Por tratar-se de uma variedade de compostos químicos em um único grupo, este divide-se em várias subclasses como: flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, derivados do ácido caféico entre outras (SIMÕES, 2007).

Uma vez que a PVA apresenta alto teor de compostos fenólicos, principalmente de flavonoides na forma de isoflavonas (Figura 2) (DE MENDONÇA et al., 2015), pode-se sugerir que são essas as subclasses responsáveis pelas atividades farmacológicas da PVA. Como por exemplo atividade antimicrobiana, antileishmania, anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer, antinociceptiva e anti-hipertensiva (CALDERONE et al., 2004; ALENCAR et al., 2007; BUENO-SILVA et al., 2013; INUI et al., 2014; DE MENDONÇA et al., 2015; TELES et al., 2015; DO NASCIMENTO et al., 2016).

Figura 2 – Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.



Adaptado de CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007

As isoflavonas apresentam relevante potencial terapêutico e são indicados no tratamento e prevenção dos sintomas da menopausa, osteoporose, câncer (DUNCAN; PHIPPS; KURZER, 2003) e doenças que acometem o sistema cardiovascular (SCV) (KUBOTA et al., 2004; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007; MARTIN et al., 2008; GILANI et al., 2009; MARUYAMA et al., 2009; SUN et al., 2013).

Estas últimas são a principal de causa de morte no mundo (DORNAS; SILVA, 2011; DE FATIMA AHMAD BALDUINO et al., 2016) e neste contexto, as isoflavonas ganham destaque. A daidzeína, biochanina A, formononetina genisteína, vestitol e neovestitol por exemplo, são isoflavonas encontradas na PVA (ALENCAR et al., 2007; DAUGSCH et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014), e apresentam relevantes ações cardiovasculares como efeitos vasorrelaxante, anti-hipertensivo, antioxidante e cardioprotetor (WANG et al., 2005; WANG et al., 2006; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007; ZHU et al., 2007; MARTIN et al., 2008; GILANI et al., 2009; SUN; LIU; CAO, 2011; SUN et al., 2013) motivo pelo qual são empregados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, tal qual hipertensão arterial sistêmica (HAS) (DUNCAN; PHIPPS; KURZER, 2003; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007).

Desta forma, visto que as isoflavonas são metabólitos com expressiva ações benéficas sobre o sistema cardiovascular (SCV) e a PVA um produto natural rico em isoflavonas, pode-se afirmar que a PVA apresenta significativo potencial terapêutico para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares.

Neste sentido, o registro de patente nacional BR 10 2012 013590-6 A2 e internacional WO 2014/186851 A1 propôs a produção do objeto de estudo do presente trabalho, o microencapsulado gastrorresistente contendo própolis vermelha alagoana aqui referido como extrato seco de própolis vermelha (ESPV).

1.2 Hipertensão arterial sistêmica

A HAS é considerada uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de PAM ($\geq 140/90$ mmHg, para pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), respectivamente) (SBC, 2016). Essa, apesar de não apresentar causa específica pode ser influenciada por fatores ambientais e genéticos (SBC, 2016), além de estar associada a uma série de fatores de risco, tais quais obesidade, consumo elevado de álcool e sedentarismo (ISLAM, 2015).

Este estado patológico pode ser considerada uma síndrome quando acompanhada de alteração no metabolismo lipídico e glicídico, obesidade e resistência à insulina (LU et al, 2015). Ademais, quando não tratada de modo eficaz a HAS pode estar associada a uma gama de doenças cardiovasculares, como por exemplo, doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular (SHRIVASTAVA, 2014).

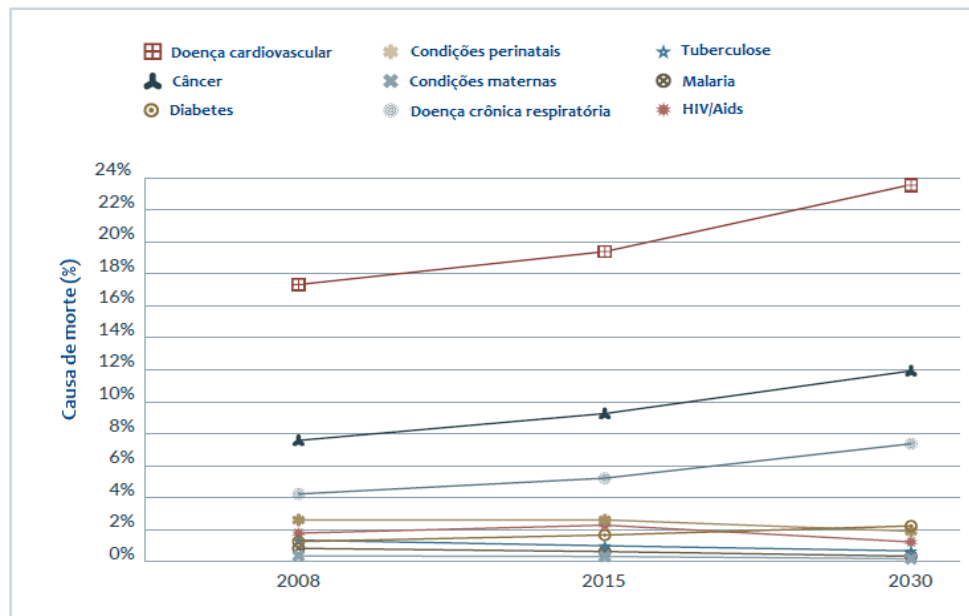
Este grupo de doenças cardiovasculares apresenta cerca de um terço do total de mortes no mundo, o que equivale aproximadamente a 71 milhões de morte, onde, 9,4 milhões são oriundas de complicações da HAS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). No Brasil, dados epidemiológicos acerca da HAS são escassos, contudo, estudos populacionais realizados em algumas cidades, estimaram que cerca de 22,3 a 43,9% da população do país é hipertensa (GUS et al, 2004).

Desta forma, a HAS apresenta-se como grave problema de saúde pública mundial, fato este fortalecido por meio da estimativa publicada pela Organização Mundial de Saúde em 2008, a qual projeta que até o ano 2030, ocorrerão 23 milhões de mortes em razão de doenças cardiovasculares devido a hipertensão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008) (Figura 3). Neste panorama, observa-se a necessidade de um tratamento de indivíduos hipertensos que vise o controle da doença a partir da redução dos valores pressóricos (MANCIA et al, 2007).

Para tal, a terapia anti-hipertensiva caracteriza-se por medidas farmacológicas e não farmacológicas, onde estas últimas, consistem no início da terapia e relacionam-se com a melhoria da qualidade de vida do hipertenso (GKALIAGKOUSI; GAVRIILAKI; DOUMA, 2015). As principais recomendações não medicamentosas para prevenção da HAS são: alimentação saudável, consumo controlado de sal e álcool, ingestão de potássio e combate ao sedentarismo e ao tabagismo. Com o agravamento da doença, de acordo com a necessidade de cada indivíduo, fármacos são adicionados ao tratamento. Esta adição considera o benefício que cada

medicamento oferece, ou seja, visa utilizar aqueles com menores probabilidades de efeitos adversos (SBC, 2010).

Figura 3 – Projeção da mortalidade mundial de acordo com estimativas da OMS no período entre de 2008 à 2030.



Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008

Estes medicamentos utilizados no tratamento da HAS são chamados de anti-hipertensivos e não devem apenas reduzir a PA, mas também os eventos cardiovasculares fatais (SBC, 2010). Os anti-hipertensivos atuam sob um ou mais dos seguintes parâmetros fisiológicos envolvidos no controle da PA: a) resistência vascular periférica total (RVPT), b) o débito cardíaco (DC), c) volume sistólico (VS) e d) frequência cardíaca (FC) (HOFFMAN, 2015).

Contudo, apesar das opções de medicamentos anti-hipertensivo e protocolos terapêuticos bem delineados, uma das principais causas para a falta de controle da HAS é a baixa taxa de adesão aos tratamentos anti-hipertensivos, que segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010), a taxa de abandono é crescente após o início da terapêutica.

Em parte, este fato deve-se aos efeitos adversos observados, bem como a politerapia e ao maior número de doses diárias muitas vezes necessário à eficácia do tratamento (FERREIRA; GRAÇA; CALVINHO, 2016).

Neste contexto, as preparações de liberação lenta ganham importância, pois formulações de liberação controlada proporcionam uma atividade mais rápida, mais prolongada, mais regular,

mais localizada, com menor toxicidade e efeitos secundários sem reduzir a eficácia terapêutica (HOFFMAN, 2008) além de promover diminuição do número de doses diárias levando-se a um tratamento ininterrupto e, conseqüentemente, ao desaparecimento de picos plasmáticos com aumento das concentrações eficazes (PRISANT et al., 1992).

1.3 Controle da pressão arterial e vasorrelaxamento

O sistema cardiovascular, composto por um coração e uma rede de vasos sanguíneos, é responsável pelo transporte de substâncias essenciais ou não ao metabolismo por todo o organismo (KOEPPEN, 2009). Por isso, uma série de alterações ocorrem em função do controle do SCV, tais quais modificações nos diâmetros dos vasos de resistência (principalmente arteríolas), do desempenho cardíaco e/ou do volume sanguíneo venoso (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). Estas alterações, apresentam influência direta em um parâmetro fisiológico, a Pressão Arterial Média (PAM).

A PAM representa matematicamente a pressão arterial pulsátil, de modo simplificado, a PAM pode ser expressa como produto do débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT) de acordo com a equação: $PAM = DC \times RVPT$. Onde DC é a quantidade de sangue ejetado do coração para o organismo a cada minuto e pode ser regulado em função dos parâmetros fisiológicos, volume sistólico (VS) e frequência cardíaca (FC): $DC = VS \times FC$. Desta forma, pode-se observar que mudanças sobre qualquer um dos parâmetros supracitados, podem induzir modificações na PAM (HOFFMAN, 2015).

Além disso, diversos mecanismos fisiológicos estão envolvidos no controle da pressão PAM, como por exemplo o barorreflexo, um mecanismo de controle da PAM a curto prazo considerado essencial para homeostase cardiovascular. Este mecanismo, é constituído por receptores específicos situados nos seios carotídeos e arco aórtico, denominados de barorreceptores (ou pressorreceptores) e respondem ao estiramento vascular induzida pelo aumento da PAM (DUSCHEK; WERNER; REYES DEL PASO, 2013). Uma vez ativados, os barorreceptores inibem as regiões vasoconstrictoras do bulbo, que por sua vez gera uma vasodilatação periférica e conseqüente redução da pressão arterial (LOHMEIER; ILIESCU, 2015). Ademais, somando a estes efeitos, ocorre uma bradicardia devido à estimulação vagal (GUYENET, 2006; KAREMAKER; WESSELING, 2008).

Além dos barorreceptores, os quimiorreceptores periféricos também são responsáveis pela regulação da PAM a curto prazo. Estes receptores, situam-se na bifurcação carotídea e na região do arco aórtico e estão primeiramente relacionados à regulação da respiração (SMITH et al., 2015). No que se diz respeito ao controle da PAM, os quimioceptores, atuam na regulação

local do tônus da musculatura lisa vascular, estimulando as regiões vasoconstritoras a partir de uma redução de O_2 ou excesso de CO_2 e H^+ , bem como regiões vasodilatadoras a partir do aumento de O_2 ou redução de CO_2 e H^+ (EDGELL et al., 2015)

Ainda sobre o controle da PAM, os mecanismos hormonais estão estreitamente relacionados com as alterações fisiológicas implicadas na sua regulação, pois, promovem aumento da pressão arterial (PA) através do hormônio antidiurético (ADH ou vasopressina) e sistema catecolaminérgico (adrenalina e noradrenalina) ou redução da PAM através da liberação do peptídeo atrial natriurético (PAN) e ativação do sistema caliceína-cininas (KOEPPEN, 2009). Além disso, podem estimular a liberação de substâncias produzidas pelo endotélio vascular, como óxido nítrico (NO), endotelinas e prostaglandinas, que promovem alterações na RVP e modificam a taxa de fluxo sanguíneo local (HOFFMAN, 2015).

Por outro lado, o controle da pressão arterial a longo prazo é determinado pelo equilíbrio dos fluidos no organismo, ou seja, equilíbrio entre a ingestão e eliminação de líquidos, pois uma vez que a RVP encontre-se constante, o aumento de líquido no organismo aumenta o DC e conseqüentemente a PAM (KOEPPEN, 2009). Para exercer este controle, os rins secretam renina, uma enzima proteolítica que é liberada pelas células do aparelho justaglomerular para a circulação, esta liberação ocorre mediante três estímulos: estimulação simpática, redução na carga de sódio na mácula densa e redução na pressão de filtração glomerular (FRY, 1981; SPARKS et al., 2014). No plasma a renina é responsável pela conversão do angiotensinogênio (produzido pelo fígado) em angiotensina I, que por sua vez é convertida em angiotensina II através da enzima conversora de angiotensina (ECA) (GOLDFARB; NOVICK, 1994; BRUNINI; FERREIRA, 2007; JIANG et al., 2014). Angiotensina II é um peptídeo que atua no sistema cardiovascular promovendo vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca e hipertrofia cardíaca (GOLDFARB; NOVICK, 1994; AKAZAWA et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2013), nos rins esse peptídeo promove reabsorção tubular de sódio, além de estimular a secreção de aldosterona (GOLDFARB; NOVICK, 1994). Este sistema é denominado sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) e seus mecanismos em conjunto são responsáveis pela elevação da PAM (ATLAS, 2007; TE RIET et al., 2015; MUNOZ-DURANGO et al., 2016).

Desta forma, constata-se que o controle da pressão arterial é realizado através de uma ação conjunta e integrada do sistema renal, neural e endócrino, que promovem alterações no sistema cardiovascular conforme ilustra a Figura 4 (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

Figura 4 – Mecanismos de controle da pressão arterial.



NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas

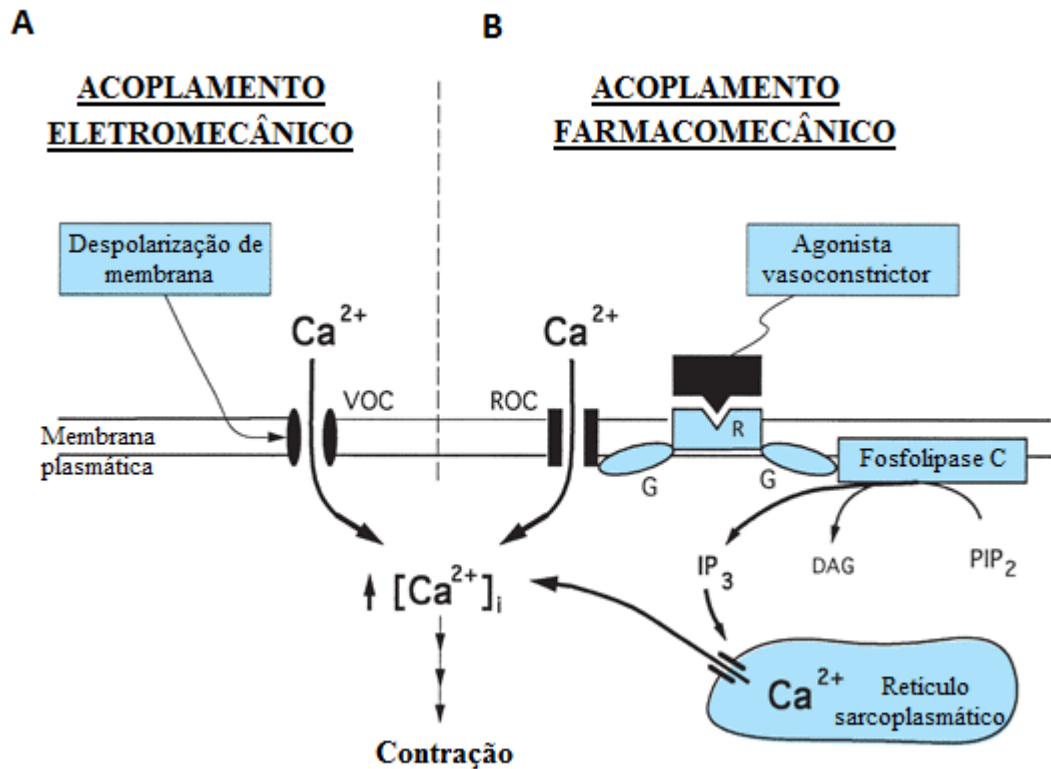
Fonte: AUTOR, 2017.

Por outro lado, tratando-se do processo de acoplamento excitação–contração vascular, observado no controle da RVPT, dois mecanismos principais estão envolvidos, o mecanismo eletromecânico e o farmacomecânico, ambos, embora por vias moleculares distintas, aumentam o nível intracelular de cálcio (SOMLYO, AVRIL V ; SOMLYO, ANDREW P, 1968; BÁRÁNY, 1996).

O acoplamento eletromecânico tem início com a despolarização da membrana plasmática devido à entrada de íons que alteram o gradiente eletroquímico e promovem a abertura de canais para cálcio voltagem dependentes (VOC) (NELSON et al., 1990; THORNELOE; NELSON, 2005), com conseqüente difusão de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula, obedecendo ao gradiente de concentração (NELSON et al., 1990) (Figura 5A).

Em contrapartida, o acoplamento farmacomecânico independe da despolarização celular inicial para desencadear a contração, mas envolve a interação de agonistas com seus receptores acoplados a proteína G na membrana plasmática (ITOH, 1991; CHEN; REMBOLD, 1995). Após ativação desta proteína, há fosforilação de fosfolipases, fosfolipase C_{β} (PLC_{β}), estas enzimas hidrolizam o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) associado à membrana liberando o inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 1995).

Figura 5 – Mecanismos de acoplamento excitação–contração vascular.



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
All rights reserved.

Adaptado de DROOGMANS, 1984.

O IP_3 liga-se à receptores específicos na membrana do retículo sarcoplasmático (IP_3R), causando a liberação de Ca^{2+} para o citosol celular (BERRIDGE, 2016). Adicionalmente, o influxo deste íon para o meio intracelular ocorre através dos canais para cálcio operados por receptores (ROC), pois como o cálcio se encontra em maior concentração no meio extracelular, o influxo é favorecido pelo gradiente de concentração do íon (NILSSON; JENSEN; MULVANY, 1994) (Figura 5B).

Concomitante ao mecanismo de aumento de Ca^{2+} via IP_3 , o DAG, devido às elevadas concentrações de Ca^{2+} intracelulares, ativa a proteína quinase C (PKC), que por sua vez promove elevação da condutância iônica dos canais transmembranais para cálcio (do tipo L) e redução dos canais para potássio. Além disso, a PKC modula a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} (ITOH, 1991; CHEN; REMBOLD, 1995; BERRIDGE, 2016).

Após aumento da concentração de cálcio intracelular ocorre a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina (quatro Ca^{2+} ligados à proteína calmodulina), este complexo liga-se a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), o que resulta em alteração da conformação e deslocando a sequência autoinibitória da MLCK, ativando a quinase e causando a fosforilação

da miosina (NELSON et al., 1990; LACINOVA, 2005; THORNELOE; NELSON, 2005; ZAMPONI et al., 2015).

Entretanto, o desenvolvimento de tensão do músculo liso depende não apenas da fosforilação direta da miosina, mas também da ativação da actina pela desinibição causada pela saída do complexo tropomiosina-caldesmon (SOMLYO, AVRIL V; SOMLYO, ANDREW P, 1968). O complexo tropomiosina-caldesmon localiza-se ao longo dos filamentos finos e são responsáveis pela obstrução dos sítios de ligação da actina com a miosina durante o repouso do músculo liso (BÁRÁNY, 1996). A mudança de conformação do caldesmon (induzida pelo Ca^{2+} -calmodulina) libera o complexo tropomiosina-caldesmon, este processo resulta no desbloqueio dos sítios de ligação da actina e permite a formação do complexo actomiosina, com consequente contração muscular (HOROWITZ et al., 1996).

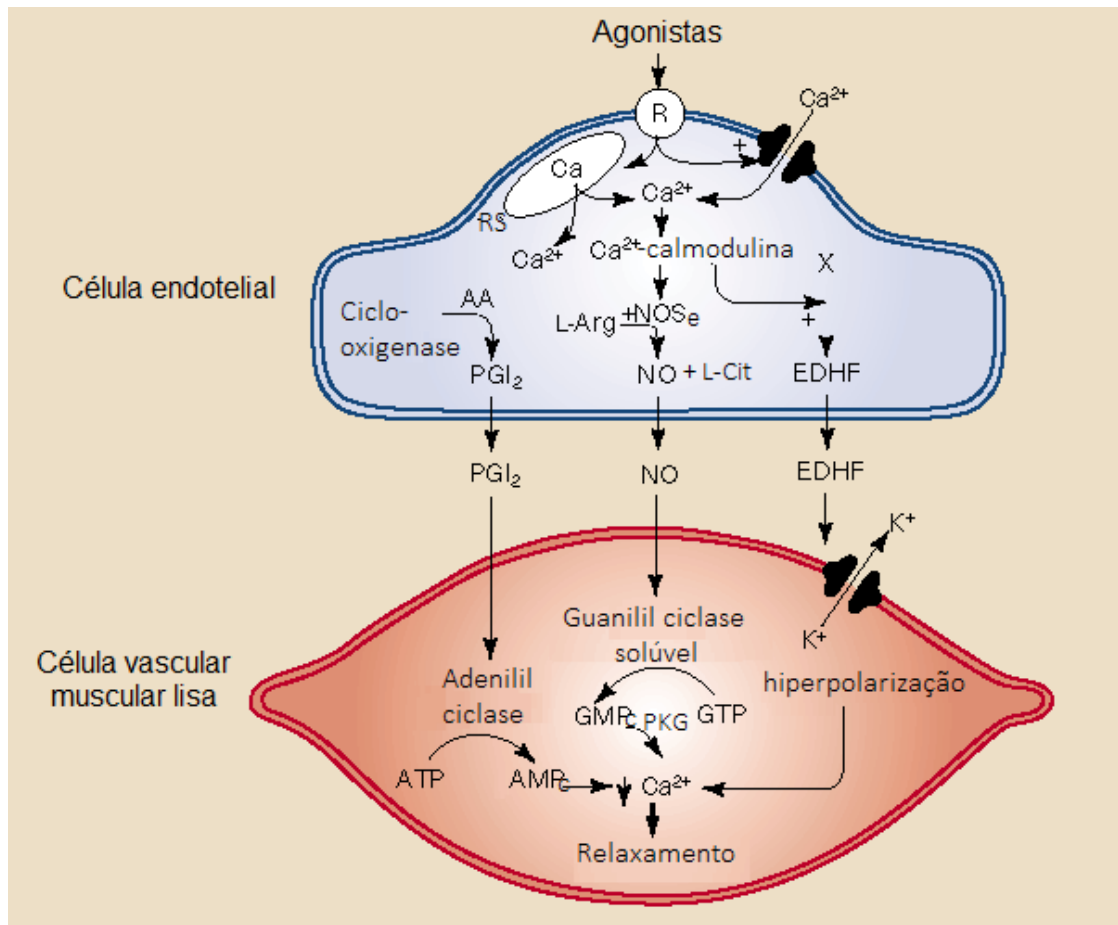
Para promoção do relaxamento do músculo liso vascular, de forma oposta aos mecanismos contráteis, há redução da concentração intracelular de cálcio com consequente dissociação do complexo calmodulina-MLCK.

Desta forma, alguns receptores acoplados a proteína G quando estimulados promovem a fosforilação da mesma (SOMLYO; SOMLYO, 2000), que por conseguinte fosforila a enzima adenilil ciclase (AC) elevando os níveis intracelulares do segundo mensageiro, Monofosfato de Adenosina Cíclico (AMPC), o qual via fosforilação da proteína quinase A (PKA) promoverá relaxamento vascular (OSTROM et al., 2002).

A PKA promove suas ações vasculares através da fosforilação de canais para Ca^{2+} e para K^+ , com consequente redução do influxo de Ca^{2+} e promoção de hiperpolarização celular, respectivamente (THORNELOE; NELSON, 2005) , além de promover diminuição da mobilização de Ca^{2+} através da inibição da formação do IP_3 e inibição do receptor para IP_3 (IP_3R) situado no retículo sarcoplasmático das células vasculares; estas ações conjuntas levam à inibição da MLCK e ativação da fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP) com consequente redução da fosforilação da cadeia leve de miosina (WEBB, 2003)

Ainda sobre relaxamento do músculo liso vascular, o endotélio vascular exerce importante papel, pois as células endoteliais promovem regulação do tônus por meio da liberação uma gama de substância, entre elas fatores relaxantes (FRDE), metabólitos do ácido araquidônico (como exemplos: prostaciclina PGI_2 , ácidos epoxieicosatetraenóicos EETs e derivados da lipoxigenase), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o óxido nítrico (NO), além de fatores contracturantes derivado do endotélio (FCDE) que incluem endotelina, tromboxano A_2 (TXA_2) e prostaglandinas F_2 (JIN et al., 2010) (Figura 6).

Figura 6 – Relaxamento da célula muscular vascular lisa via difusão dos fatores relaxantes derivados do endotélio.



AA = ácido araquidônico ; NOSe = NO sintase endotelial ; L-Arg = L- arginina ; R = receptor de membrana ; RS = retículo sarcoplasmático ; X = precursor desconhecido ; L-Cit = L-citrulina ; PKG = proteína dependente de GMPc.

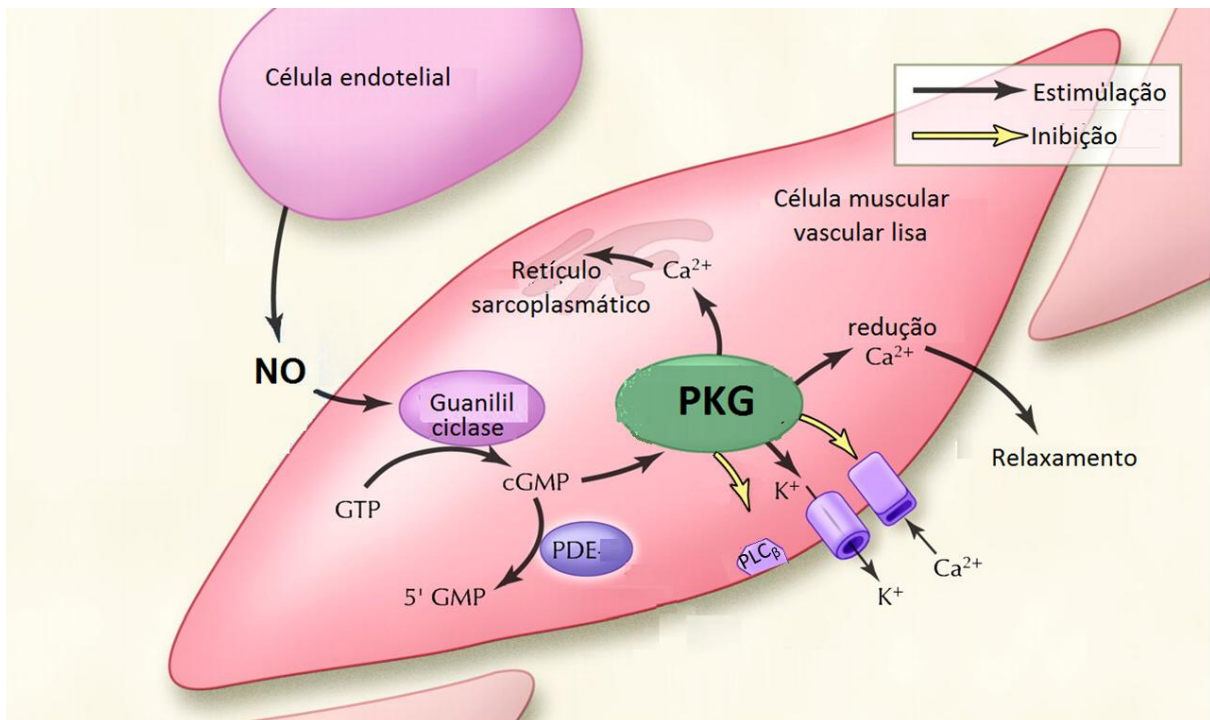
Adaptado de VANHOUTTE, 1998.

Mediante à diversos estímulos a produção de NO ocorre em diversos sistemas orgânicos (WIESINGER, 2001; ADUA et al., 2015; UEHARA; SHIDA BDE; DE BRITO, 2015), entretanto, o presente trabalho deter-se-á produção pelo sistema cardiovascular posto pois pelo mesmo em evidência. Assim, como representado na figura 6, o NO nas células endoteliais vasculares é produzido juntamente com L-citrulina através da enzima NO-sintase endotelial (NOSe) na presença do aminoácido L-arginina e oxigênio molecular (O_2) (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988).

Por ser um gás o NO difunde-se através das membranas celulares às células musculares vasculares lisas (CMLVs) adjacentes, uma vez no citosol destas células o NO ativa diretamente a enzima guanilil ciclase solúvel que eleva as concentrações intracelulares do nucleotídeo

Monofosfato de Guanosina Cíclico (GMPc) (CAWLEY et al., 2007) e por conseguinte, induz a fosforilação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (WALDMAN; MURAD, 1987; MURAD, 1994). A PKG ativa promove relaxamento do tônus vascular através da fosforilação da fosfolambam no retículo sarcoplasmático, ativação da captação Ca^{2+} pela cálcio-ATPase e principalmente, por inibir a $\text{PLC}\beta$ e conseqüentemente o processo de contração vascular (MICHEL, 1998; LUCAS et al., 2000) (Figura 7).

Figura 7 – Relaxamento da célula muscular vascular lisa através da ativação da PKG via NO.



NO = óxido nítrico; GTP = trifosfato de guanosina; GMPc = monofosfato de guanosina cíclico; 5'GMP = 5'-monofosfato de guanosina; PDE = fosfodiesterase; PKG = proteína quinase dependente de GMPc.

Adaptado de DIGITAL SCIENCE

Desta forma, faz-se possível perceber que diversos estudos fisiológicos possibilitaram o conhecimento a respeito da complexa interação entre inúmeras substâncias e sistemas para garantir níveis adequados de PAM em diversas situações. Disfunções nestes componentes podem, portanto, ocasionar à elevação crônica dos níveis pressóricos e desta forma à condição clínica de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) (CAIN E KHALIL, 2002).

1.4 Modelos experimentais para o estudo da hipertensão

O uso de modelos experimentais constitui uma ferramenta importante no âmbito científico (LEONG; NG; JAARIN, 2015), pois além de direcionar a compreensão, facilita a descobertas de novos alvos terapêuticos para determinadas doenças (DORNAS; SILVA, 2011).

Neste sentido, uma série de modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar a HAS e suas complicações (Tabela 3) (DOGGRELL; BROWN, 1998).

Tabela 3 – Principais Modelos Experimentais Desenvolvidos para o Estudo da Hipertensão Arterial Sistêmica.

Modelo Experimental	Referência
Hipertensão Genética	
Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)	OKAMOTO e AOKI (1963)
Ratos Espontaneamente Hipertensos Propensos ao AVE (SHRSP)	OKAMOTO et al. 1974
Dahl Sal-sensíveis	DAHL; HEINE e TASSINARI (1962)
Ratos com Hipertensão Transgênica (TGR)	MULLINS; PETERS e GANTEN (1990)
Ratos com Hipertensão Limítrofe (BHR)	HENRY; MEEHAN e STEPHENS (1967)
Hipertensão Renal	
Hipertensão Renovascular	GOLDBLATT et al. (1934)
Hipertensão Renopriva	LEDINGHAM e PELLING (1967)
Hipertensão Endócrina	
Ratos Hipertensos por Sal e Mineralocorticoides (DOCA-sal)	(PROVOOST; DE JONG, 1978)
Hipertensão Neurogênica	
Hipertensão por Desnervação do Barorreceptores Sino-aórticos (SAD)	(KRIEGER, 1964)
Hipertensão por Inibição Crônica da Síntese de NO	
Hipertensão por L-NAME	(BAYLIS; MITRUKA; DENG, 1992)
Hipertensão por ANG II	(MCBRYDE et al., 2007)

L-NAME – L-N^G-Nitroarginina metil éster; ANG II – Angiotensina tipo 2

Fonte: AUTOR, 2017.

Cada um dos modelos expostos na tabela 3 apresenta diferentes vias pelas quais a hipertensão pode se desenvolver (HALLBÄCK; WEISS, 1977; LEONG; NG; JAARIN, 2015), e por isso, a escolha de um modelo experimental para determinada pesquisa, deve ser realizada

através da associação do conhecimento das alterações cardiovasculares predominantes no modelo, com os objetivos propostos pelo trabalho (GRIEGER, 1971; BIANCHI et al., 1986; SEGAL-LIEBERMAN; ROSENTHAL, 2013), garantindo desta forma, uma maior eficácia da pesquisa.

O modelo genético de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi desenvolvido a partir de ratos normotensos, o Wistar Kyoto (WKY) através de cruzamentos consanguíneos (irmãos com irmãs), resultando em 100% dos animais com desenvolvimento espontâneo de hipertensão (OKAMOTO; AOKI, 1963; OKAMOTO; Tabei; et al., 1966). Este modelo consiste no mais referenciado pela comunidade científica (FAZAN JR; SILVA; SALGADO, 2001). Pois, para o entendimento adequado das funções orgânicas e adaptações fisiológicas decorrentes da hipertensão humana, bem como desenvolvimento de possíveis intervenções farmacológicas, deve-se optar por modelos que apresentem similaridade com a hipertensão desenvolvida em humanos (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). O SHR apresenta-se como o único modelo com tanta similaridade.

O desenvolvimento da hipertensão em ambos, humanos e SHR, é susceptível a alterações de fatores ambientais, tais quais dieta hipersódica, estresse e alterações sociais (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; DORNAS; SILVA, 2011). Além disso, caracteriza-se por ser poligênica e multifatorial ou seja, observa-se diversas alterações fisiológicas (hemodinâmicas, vasculares, neurais, renais e hormonais), sem no entanto apresentar uma causa específica (OKAMOTO; HAZAMA; et al., 1966; OKAMOTO; Tabei; et al., 1966; FOLKOW et al., 1973; PFEFFER; FROHLICH, 1973; LAIS et al., 1977; MULVANY; HANSEN; AALKJAER, 1978; FERRONE et al., 1979; SMITH; HUTCHINS, 1979; PUZSEROVA; KOPINCOVA; BERNATOVA, 2010; STERLEY; HOWELLS; RUSSELL, 2016).

Diversas diferenças são observadas entre o SHR e seu controle WKY, como alteração fundamental, encontra-se o aumento progressivo da PAM em função da idade (HALLBÄCK; WEISS, 1977). Neste caso, o estado hipertensivo do SHR se inicia com três a cinco semanas de vida (ratos jovens) aumentando progressivamente até alcançar um platô no início da fase adulta (20^o – 25^o semana de vida), em torno de 200 mmHg que equivale a 30% de aumento comparado ao WKY de mesma idade (YAMORI, 2013). Além disso, com o envelhecimento o SHR apresenta hipertrofia cardíaca (PARK et al., 1997) que pode evoluir para um quadro de insuficiência cardíaca (FROHLICH, 1977).

Apesar desta variação na PAM, a FC encontra-se elevada apenas entre a terceira e sexta semana de vida (DICKHOUT; LEE, 1998), em contraste com a RVPT que permanece elevada ao longo da vida do SHR (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; YAMORI, 2013).

Acredita-se que essa elevação da RVPT esteja associada à alterações estruturais e funcionais das células vasculares e endoteliais, como a disfunção endotelial (JUDY et al., 1976; WARSHAW; MULVANY; HALPERN, 1979). Tais alterações estão relacionadas ao envelhecimento do SHR, onde observa-se uma menor resposta aos FRDE e FHDE, associada ao predomínio dos FCDE em ratos adultos jovens (22 semanas de idade) (PUZSEROVA et al., 2014). Além de haver evidências de que o aumento do estresse oxidativo vascular está presente em SHR e por esta via haveria inativação oxidativa de NO, sendo este o responsável pela disfunção endotelial (PUZSEROVA; KOPINCOVA; BERNATOVA, 2010). Além disso, autores relacionam esta disfunção a uma hipertrofia vascular em função da hiperatividade simpática do SHR (GRISK e RETING, 2004) (MULVANY; HANSEN; AALKJAER, 1978; PUZSEROVA et al., 2014).

Desta forma, uma vez que as alterações fisiológicas do SHR decorrem de maneira dependente de idade e muitas destas precedam o estado propriamente dito da hipertensão, assemelhando-a da HAS em humanos, este é um modelo indicado à estudos farmacológicos que visam impedir a progressão, bem como a reversão da hipertensão. E por isso, apresenta-se como modelo escolhido ao desenvolvimento do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pela formulação gastroresistente, extrato seco de própolis vermelha alagoana (ESPV), em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2 Objetivos específicos

- Testes *in vivo*

- Caracterizar os efeitos de ESPV e ECPV sobre a PAM e FC em SHR não anestesiados;
- Caracterizar os efeitos crônicos na pressão arterial após tratamento de 4 semanas em SHR jovens e adultos;

- Testes *ex vivo*

- Avaliar os efeitos macroscópicos sobre o miocárdio de SHR jovens e adultos tratados com ESPV por 4 semanas;
- Avaliar a resposta vascular dependente e independente do endotélio em SHR adultos tratados com ESPV por 4 semanas, através do uso de ferramentas farmacológicas específicas;

- Testes *in vitro*

- Avaliar a viabilidade celular na presença de ESPV.

3 MATERIAL

3.1 Animais

Em todos os protocolos experimentais foram utilizados Ratos machos Espontaneamente Hipertensos (SHR) Adultos (24 semanas de idade). No protocolo de avaliação do efeito anti-hipertensivo induzido pelo derivado ESPV, também foram utilizados Ratos SHR Jovens (11 semanas de idade).

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da UFAL. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais da UFAL (CEUA), certidão número 09/2014.

3.2 Drogas e reagentes

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), cloridrato de acetilcolina (ACh), cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), nitroprussiato de sódio (NPS) e indometacina (INDO), todos da Sigma®. As soluções estoques de indometacina foram dissolvidas juntamente com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) em água destilada. As demais substâncias foram dissolvidas em água destilada (experimentos *ex vivo*) ou salina (experimentos *in vivo*).

3.3 Soluções nutritivas

Para a preparação da solução nutritiva Tyrode foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de magnésio (MgCl_2), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) todos da Merk. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio (NaH_2PO_4), fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio (KH_2PO_4) todos da Vetec. A tabela 4 a seguir mostram as composições da mesma:

Tabela 4 – Composição da solução nutritiva Tyrode.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄.H₂O	0,42
CaCl₂.2H₂O	2,0
KCl	4,0
MgCl₂.6H₂O	1,05
C₆H₁₂O₆	5,6

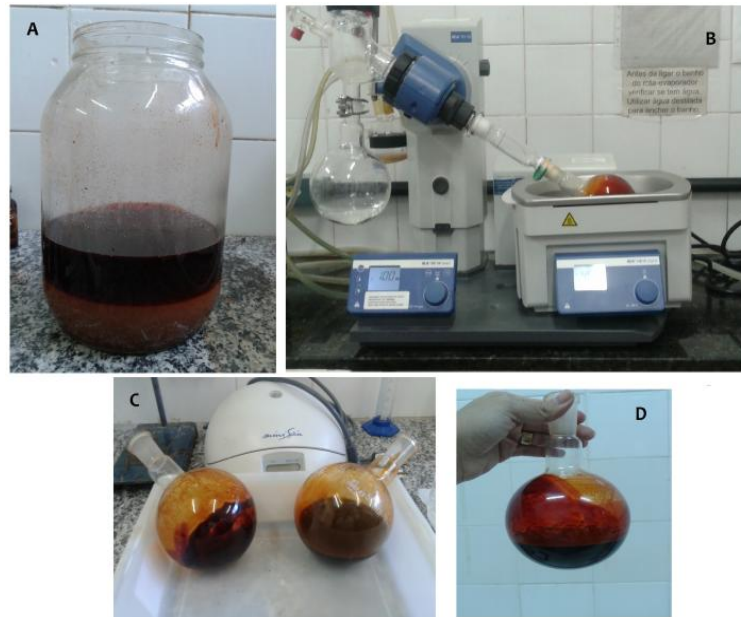
Fonte: AUTOR, 2017

4 MÉTODO

4.1 Obtenção da fase clorofórmica do extrato de própolis vermelha alagoana

A obtenção dos extratos deu-se em parceria com o Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento no Laboratório de Análises Farmacêutica e Alimentícia da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (ESENFAR, UFAL).

Para tal, uma amostra de 200 g de própolis foi submetida a processo de extração por maceração em álcool absoluto (96°GL, 1800 mL) por período de 48 horas (Figura 8A) . O processo de extração foi repetido por 3 vezes até o completo esgotamento do material. O material foi concentrado em rotaevaporador da marca IK HB-10 digital (Curitiba, Paraná, Brasil), acoplado a uma bomba de vácuo da Tecnal (São Paulo, Brasil), usando uma velocidade de rotação de 100 rpm, temperatura do banho Maria 40°C e pressão de 700 mmHg (Figura 8B). O extrato etanólico (153,0g) obtido foi solubilizado em sistema de solvente etanol 96°GL e submetido a processo de particionamento com hexano e clorofórmio. Realizou-se duas lavagens do extrato bruto livre de solvente com um volume de 350 mL de Hexano, o qual foi submetido a rotaevaporação. O extrato bruto, após remoção de ceras com hexano, foi submetido à lavagem com clorofórmio (350mL) (Figura 8C) e em seguida submetido a rotaevaporação. A fase clorofórmica de própolis vermelha (ECPV, 141,85g) obtido em maior quantidade foi concentrado em rotaevaporador e utilizado para obtenção dos extratos secos de própolis vermelha (ESPV) (Figura 8D).

Figura 8 – Obtenção da fase clorofórmica de propolis vermelha alagoana.

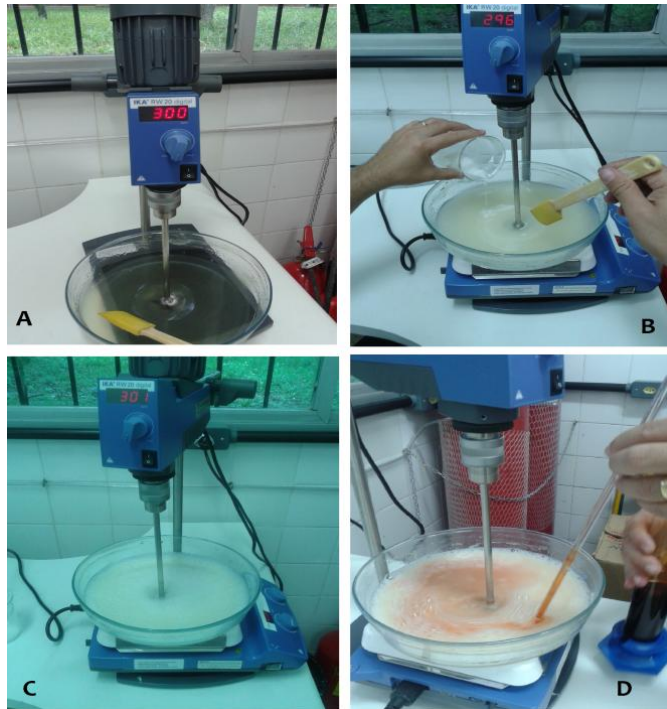
- A) Maceração da amostra de própolis em álcool absoluto; B) Rotaevaporação, C) Esquerda extrato bruto etanólico de própolis vermelha após remoção da cera e à direita extrato solubilizado em clorofórmio e D) Fase clorofórmica de própolis vermelha.

Fonte: AUTOR, 2017.

4.2 Obtenção do extrato seco de própolis vermelha alagoana

O extrato seco de própolis vermelha foi obtido através da técnica de emulsificação seguido pela secagem em Spray-Dryer, em parceria com o Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento no Laboratório de Análises Farmacêutica e Alimentícia da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (EENFAR, UFAL).

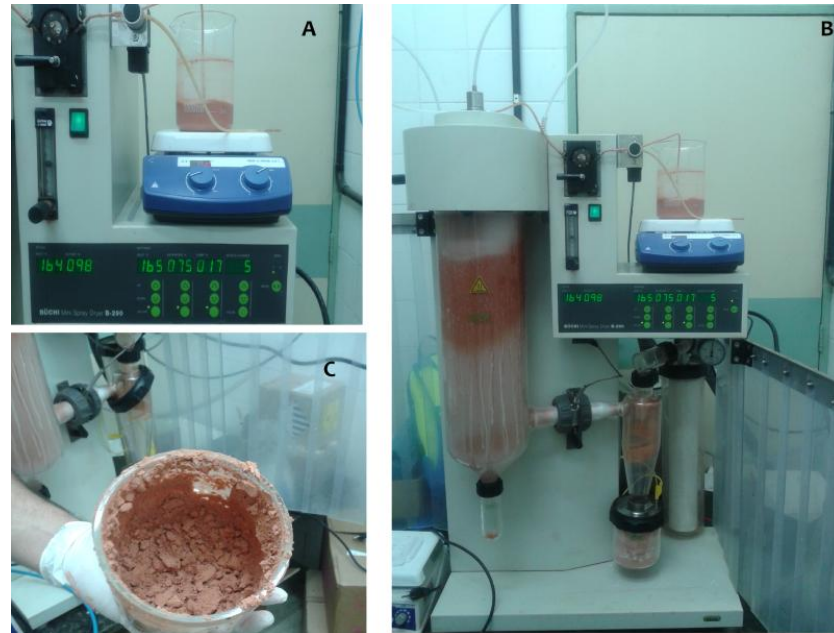
Para a preparação do ESPV foram utilizados adjuvantes gelatina (37,5 g), amido (12,5 g) e dióxido de silício coloidal (1g). Uma quantidade de 50g do extrato clorofórmico de própolis foi solubilizado em etanol (500 mL) a 80% etanol:água (400:100, v/v) e então para obter a concentração o peso seco foi obtido. Em outro recipiente com auxílio de mixer (IKA RW 20 digital) os adjuvantes foram preparados sob agitação constante de 300 rpm na seguinte ordem: gelatina solubilizada em 400 mL de água destilada à 37°C (Figura 9A), amido solubilizado em 50 mL de água destilada (Figura 9B) e dióxido de silício em 100 mL de água destilada (Figura 9C). Após preparação do sistema o extrato clorofórmico de própolis vermelha foi incorporado lentamente sob agitação constante (Figura 9D).

Figura 9 – Processo de emulsificação da própolis vermelha.

Solubilização dos adjuvantes de ESPV: A) gelatina, B) amido e C) dióxido de silício e D) incorporação do extrato de própolis.

Fonte: AUTOR, 2017.

A formulação resultante foi submetida a processo de secagem em mini Spray-Dryer, de marca BUCHI, modelo B-290, usando agulha injetora de 1 mm. O Spray-Dryer apresentou as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada 164°C, temperatura de saída 98°C e fluxo de bombeamento 10 mL/min (Figura 10). Após secagem o pó obtido (ESPV) foi pesado para determinação do rendimento, em que a quantidade obtida era dividida pela quantidade inicialmente adicionada multiplicada por 100 para obter-se os valores de rendimento em porcentagem.

Figura 10 – Secagem em Spray-Drier do sistema emulsificante.

A) Condições de secagem do mini Spray-Drier; B) secagem da formulação e C) ESPV pronto.

Fonte: AUTOR, 2017.

4.3 Avaliação do conteúdo fenólico de ESPV e ECPV

O monitoramento do perfil químico dos marcadores e dos ECPV e ESPV foram realizados pelo método de análise HPLC acoplado à UV-*vis* em parceria com o Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento no Laboratório de Análises Farmacêutica e Alimentícia da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (EENFAR, UFAL). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Shimpak C18 (250 mm × 4.6 mm id, 5µm) acoplada a uma pré coluna Phenomenex C18 (4.0 mm × 3.0 mm i.d.; 5 µm), ambas mantidas a 35°C. A fase móvel se caracterizou por um sistema gradiente, utilizando ácido fórmico/água (1:19 v/v) como solvente A e metanol grau CLAE como solvente B (JT Baker, Mallinckrodt, México). O fluxo da fase móvel foi de 0,80 mL/min e o detector ajustado para 281 ou 366 nm. O gradiente de solventes foi programado da seguinte forma: 30% de B no tempo de 0 a 7 min, 40% de B em 15 min, 45% de B em 30 min, 60% de B em 40 min, 80% de B em 50 min, 90% de B em 60 min, reduzindo para 30% de B em 65 min e permanecendo isocrático até 70 min. As amostras de dos extratos foram injetadas em volume de 20 µL. Em corridas individuais, foram injetados os padrões fitoquímicos (catequina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, biochanina A, pinobanksina e daidzeína) nas concentrações de 0,15 – 7,5 µg/mL, e os extratos, naa concentrações de 200 µg/mL.

4.4 Ensaios farmacológicos

Foram utilizadas três diferentes formas de abordagens: uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros, outra com ensaios farmacológicos *ex vivo*, utilizando artéria mesentérica superior isolada e uma utilizando cultura de células *in vitro*.

4.4.1 Ensaios de viabilidade celular *in vitro*

Os ensaios de Proliferação Celular foram realizados no Laboratório de Biologia Celular em parceria com o Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto do instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (ICBS, UFAL). O efeito citotóxico de ESPV e ECPV sob macrófagos da linhagem (J774) foi investigada usando o método de ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (MOSMANN, 1983). As células (1.5×10^5 células / poço) foram cultivadas em uma placa de 96 poços com meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e 40 ug / ml de gentamicina) durante a noite. Em seguida, a células foram tratados com cada extrato em concentrações de ESPV (1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e ECPV (50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Após incubação, o meio foi substituído com meio RPMI fresco contendo 5 mg/mL de MTT, após 4 h de incubação a 37°C, o sobrenadante foi retirado e solução de dimetilsulfóxido (150 μL / poço) foi adicionada a cada placa de cultura. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância do produto formazan MTT solubilizado foi medido espectrofotometricamente a 540 nm. Quatro poços individuais foram tratados, e a redução da atividade de MTT foi determinada como porcentagem das células controle ([absorbância de células tratadas / absorbância de células não tratadas] \times 100).

4.4.2 Ensaios farmacológicos *in vivo*

4.4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR adultos não anestesiados

Ratos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1: 20 v/v), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, Brasil) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital usando um software AQCAD (AVS Projetos, SP, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calcula a pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 min., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (10 mg/kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses crescentes de ESPV e ECPV (0,1; 0,5; 1; 5; 10mg/kg) foram administradas de forma randômica pela via endovenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornem aos seus valores da linha de base (Figura 11).

Os valores de PAM e FC foram expressos em porcentagem, computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, calculadas através das fórmulas (equação 1 e 2).

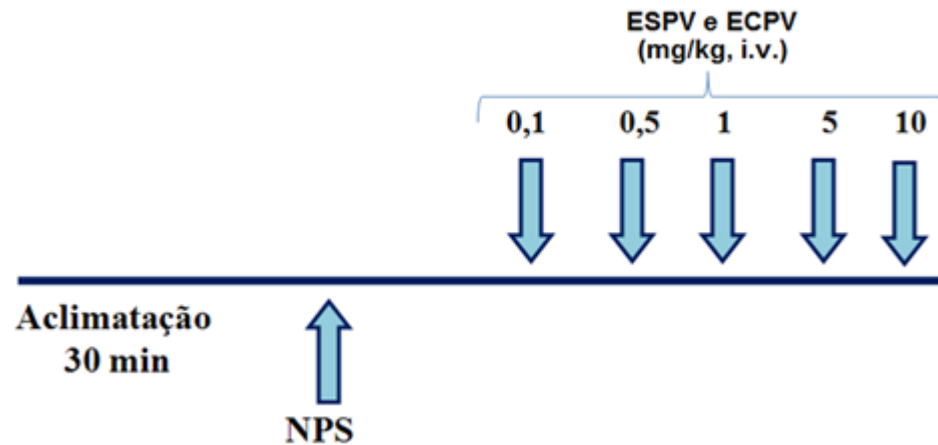
$$1) \text{ Valores de PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM após} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

$$2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC após} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

4.4.2.2 Verificação dos efeitos da anestesia com tiopental sódico sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida pela administração de doses crescentes do ESPV em SHR Adultos.

Após o procedimento cirúrgico descrito no item 4.2.2 sob efeito do anestésico tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), um barbitúrico com ação anestésica geral, foi obtido uma curva dose-resposta como descrito item 4.2.3.

Figura 11 – Representação esquemática referente ao protocolo experimental para avaliação do efeito de ESPV e ECPV sobre a PAM e FC em SHR não anestesiados.



Fonte: AUTOR, 2017.

4.4.2.3 Avaliação do efeito anti-hipertensivo induzida pelo derivado ESPV em SHR.

Os valores de PA sistólica foram medidos por meio do método indireto de pletismografia de cauda. Para tal procedimento, foram utilizados ratos SHR Adultos e Jovens, inicialmente os ratos foram mantidos em estufa a 37°C por 20 min e acondicionados em um meio de contensão, no qual a região proximal da calda encaixava-se a um manguito de borracha acoplado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos.

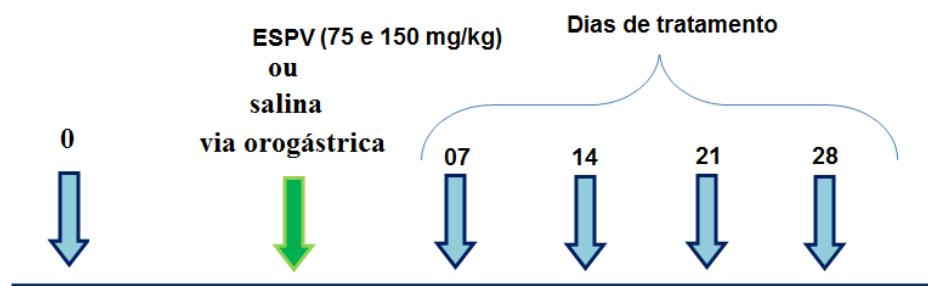
Próximo ao manguito o transdutor de pulso (sensor) captava os sinais a serem enviados e registrados em computador para a realização das medidas da PAS. A PAS era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso do retorno do processo de perda e retorno do sinal de pulso na insuflação e desinsuflação. O protocolo experimental teve início após período de adaptação dos animais de no mínimo três dias e da estabilização dos sinais de pulso.

A PAS foi considerada como a média de no mínimo cinco medidas. O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais, RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats And Mice (Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A comunicação de dados entre o powerlab e o computador se deu através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software "Chart for Windows" gerava os registros de pulso, a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital.

Os animais foram divididos em seis grupos de cinco animais cada, grupos controles, os quais foi administrado salina por via orogástrica e os grupos tratados, os quais receberam uma única dose diária durante 28 dias (4 semanas), de 75 ou 150 mg/kg do ESPV via orogástrica. Os Grupos foram divididos em: controle Jovem; controle Adulto; Jovem 75 mg/kg; Jovem 150 mg/kg; Adulto 75 mg/kg; Adulto 150 mg/kg. Os valores de PA foram registrados antes (dia 0) e após o tratamento (07, 14, 21 e 28 após administração) (Figura 12). A porcentagem de redução de PA foram calculadas considerando os valores antes do tratamento como 100% de atividade (VERGARA-GALICIA ET AL., 2008).

Para cálculo da dose de acordo com a massa corpórea (PC), os ratos foram pesados em balança semi-analítica SHIMADZU, de modo semelhante antes do início do tratamento (0 dia) e durante o tratamento (7°, 14°, 21° e 28° dia).

Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito anti-hipertensivo induzido pelo ESPV em ratos SHR.



Fonte: AUTOR, 2017.

4.4.3 Ensaios farmacológicos para testes *ex vivo*

4.4.3.1 Avaliação da morfometria do coração de SHR adultos e jovens tratados com ESPV.

Após a eutanásia os corações foram excisados, isolados (foram considerados isolados quando sem artérias aorta e veia cava), desprovidos de tecidos conectivos e lavados com solução salina 0,9%. Em seguida, os corações foram pesados em balança analítica em meio hidrostático por método de Sherle, baseado no princípio de Arquimedes. Este princípio consiste na suspensão do coração por um fio de algodão fixado em uma base fora da balança analítica em um béquer contendo solução salina 0,9% sem aplicações de tensão isométrica para realização da pesagem. Após dissecação o ventrículo esquerdo foi pesado segundo o mesmo princípio. Os pesos do coração e ventrículo esquerdo foram normalizados pelo peso corporal do animal. Então, com o auxílio de um paquímetro foi realizada a espessura da parede do ventrículo esquerdo.

4.4.3.2 Preparação com artéria mesentérica superior isolada de SHR adulto

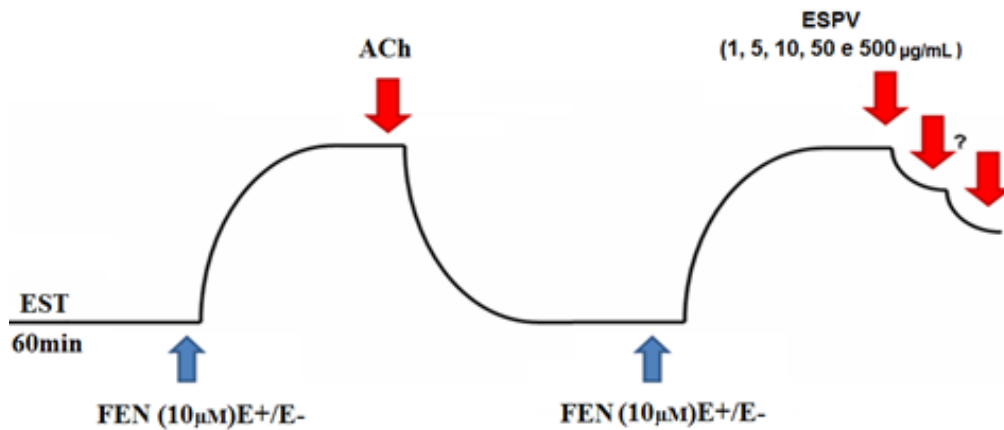
Os ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia com tiopental sódico (45 mg/kg). Em seguida, através de uma incisão no abdômen do animal, foi retirada a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo, e foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução nutritiva de Tyrode a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (DATAQ, Brasil) acoplado a um sistema de aquisição de dados (DATAQ, Brasil) para o registro das contrações isométricas. Cada anel será submetido a uma tensão constante de 0,5g por um período de no mínimo 60 min. Durante este tempo, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Anéis sem endotélio funcional foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso. A presença ou ausência do endotélio funcional foi verificada pela habilidade, medida em porcentagem (%), da ACh (10 µM) em relaxar os anéis pré-contraídos com 10 µM de FEN. Foram considerados com endotélio funcional, os anéis que apresentaram relaxamentos superiores a 70% sobre a pré-contracção com FEN. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio funcional (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) para os protocolos realizados em anéis com ausência de endotélio o mesmo foi removido mecanicamente e foi obtida uma nova curva concentração-resposta.

4.4.3.3 Avaliação da resposta vasorrelaxante de ESPV anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adultos na presença e ausência do endotélio funcional

Após o período de estabilização de 60 min e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito no item anterior 4.4.3.2 foi induzida uma contração com FEN (10 µM) (aproximadamente 30 minutos) e concentrações crescentes de ESPV (1, 5, 10, 50 e 500 µg/mL), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na ausência e na presença do endotélio vascular (Figura 13). O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração produzida pelo FEN na ausência do endotélio vascular. A eficácia do efeito vasorrelaxante de ESPV foram avaliadas através dos valores do Emáx e pD₂.

Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de ESPV sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR.

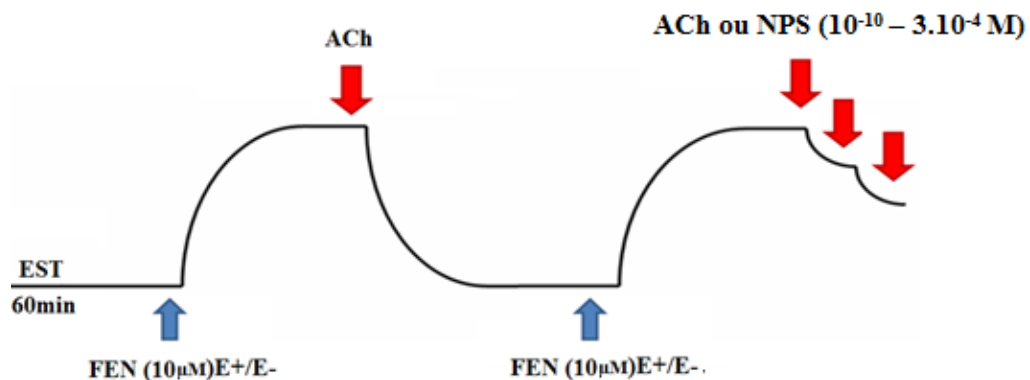


Fonte: AUTOR, 2017.

4.4.3.4 Avaliação da resposta vascular e endotelial em anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adulto tratados por 28 dias com ESPV.

Após o tratamento de 28 dias com ESPV, realizou-se a avaliação da resposta vascular dos três grupos de SHR Adultos (Controle Adulto, Adulto 75 e Adulto 150). Para tal procedimento, após o período de estabilização de 60 min e posterior verificação da integridade do endotélio funcional, como descrito no item 4.4.3.2, induziu-se uma nova contração com FEN (10 µM) e após aproximadamente 30 minutos, concentrações crescentes de NPS (10^{-10} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) ou ACh (10^{-10} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa (Figura 14).

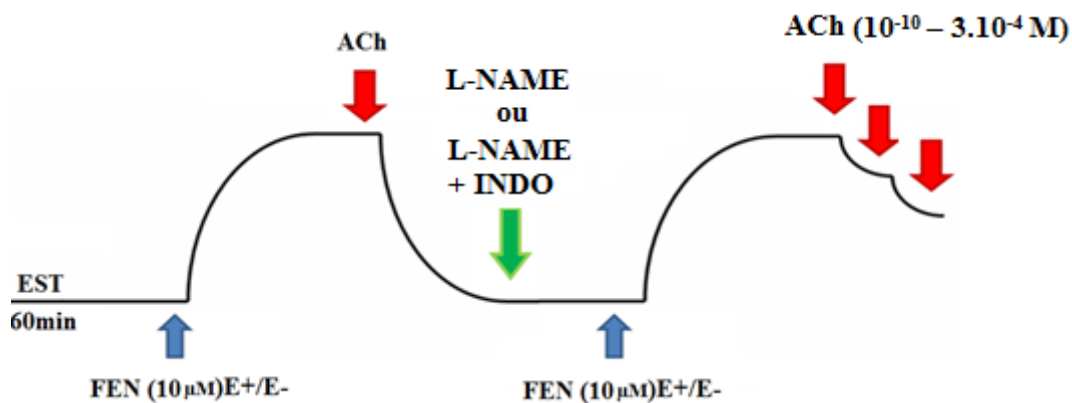
Figura 14 – Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da resposta vascular e endotelial em anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adulto tratados por 28 dias com ESPV.



Fonte: AUTOR, 2017.

Para avaliação da via da NOS e FHDE no vasorrelaxamento observado após o tratamento com ESPV. Após a verificação da integridade do endotélio os anéis foram pré-incubados por 30 min com L-NAME 3.10^{-3} M ou L-NAME (3.10^{-3} M) e INDO (1.10^{-3} M) e uma nova contração com FEN ($10 \mu\text{M}$) foi obtida, após aproximadamente 30 minutos, concentrações crescentes de ACh ($10^{-10} - 3.10^{-4}\text{M}$) foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa (Figura 15). Para todos os protocolos, a eficácia do efeito vasorrelaxante para NPS ou ACh foram avaliadas através dos valores do $E_{\text{máx}}$ e pD_2 .

Figura 15 – Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da resposta endotelial em anéis de artéria mesentérica isoladas de SHR adulto tratados por 28 dias com ESPV.



Fonte: AUTOR, 2017.

4.5 Análise estatística

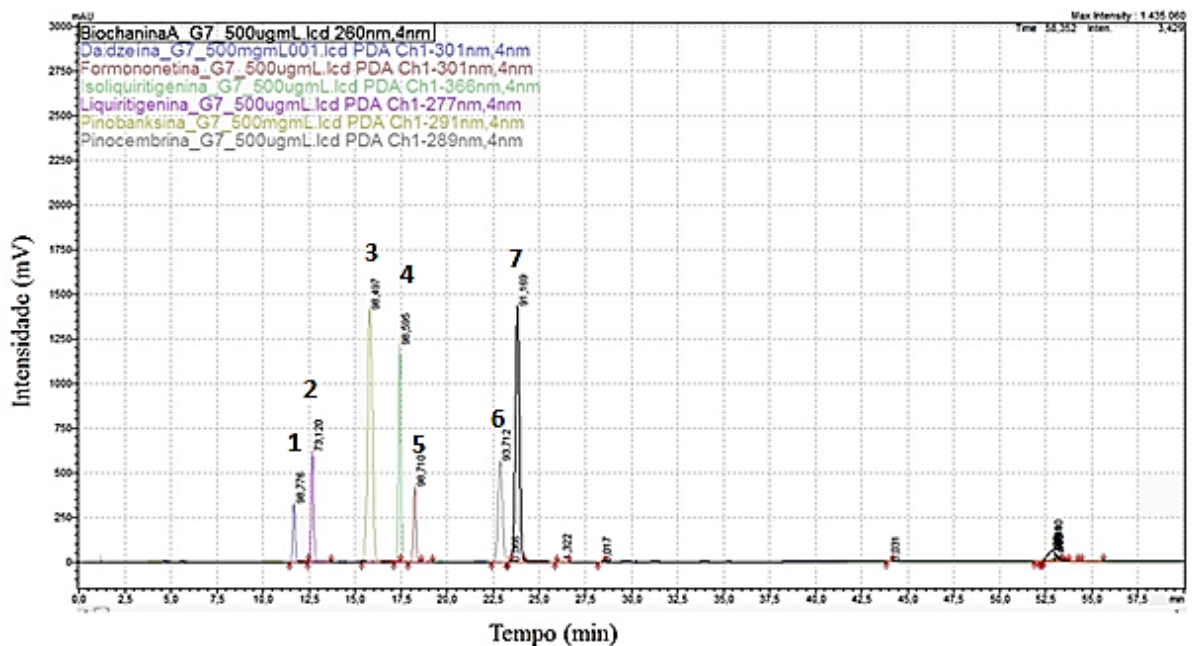
Todos os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Para os testes *in vivo* e *ex vivo* foram realizados testes “t” de Student pareado ou não-pareado para análise entre dois grupos e para análise de diferença entre todas as médias ANOVA “one way” seguida do pós-teste de Bonferroni. As curvas foram obtidas através de regressão não-linear, e representam os valores de $E_{\text{máx}}$, que correspondem à média percentual de relaxamento do ESPV para cada condição estudada. O parâmetro farmacológico pD_2 representa o $-\text{Log}$ da concentração capaz de realizar 50% do $E_{\text{máx}}$ (CE50). Para os experimentos de viabilidade celular as diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos do pós-teste de Newman-Keuls-Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “P” foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$). Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism 6.0[®].

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do conteúdo fenólico do ECPV e ESPV por hplc acoplado à uv-vis

Através da comparação entre os tempos de retenção (tR) dos analitos em estudo e dos padrões (Figura 16), buscou-se determinar a presença de compostos fenólicos em 200 µg/mL dos extratos de própolis. Deste modo, foi possível a identificação de sete isoflavonas (1) daidzeína com tR de 11,5 min; (2) liquiritigenina, 16 min; (3) pinobankisina, 15,5 min; (4) isoliquiritigenina, 16 min; (5) formononetina, 18 min; (6) Pinocebrina, 22,5 min e (7) biochanina A, 24 min, em ambos extratos a 280 nm (Figura 17 A e B). No comprimento de onda de 366 nm, observa-se a presença de um pico de maior área indentificado como isoliquiritigenina (4) com tR de 16 min (Figura 18 A e B).

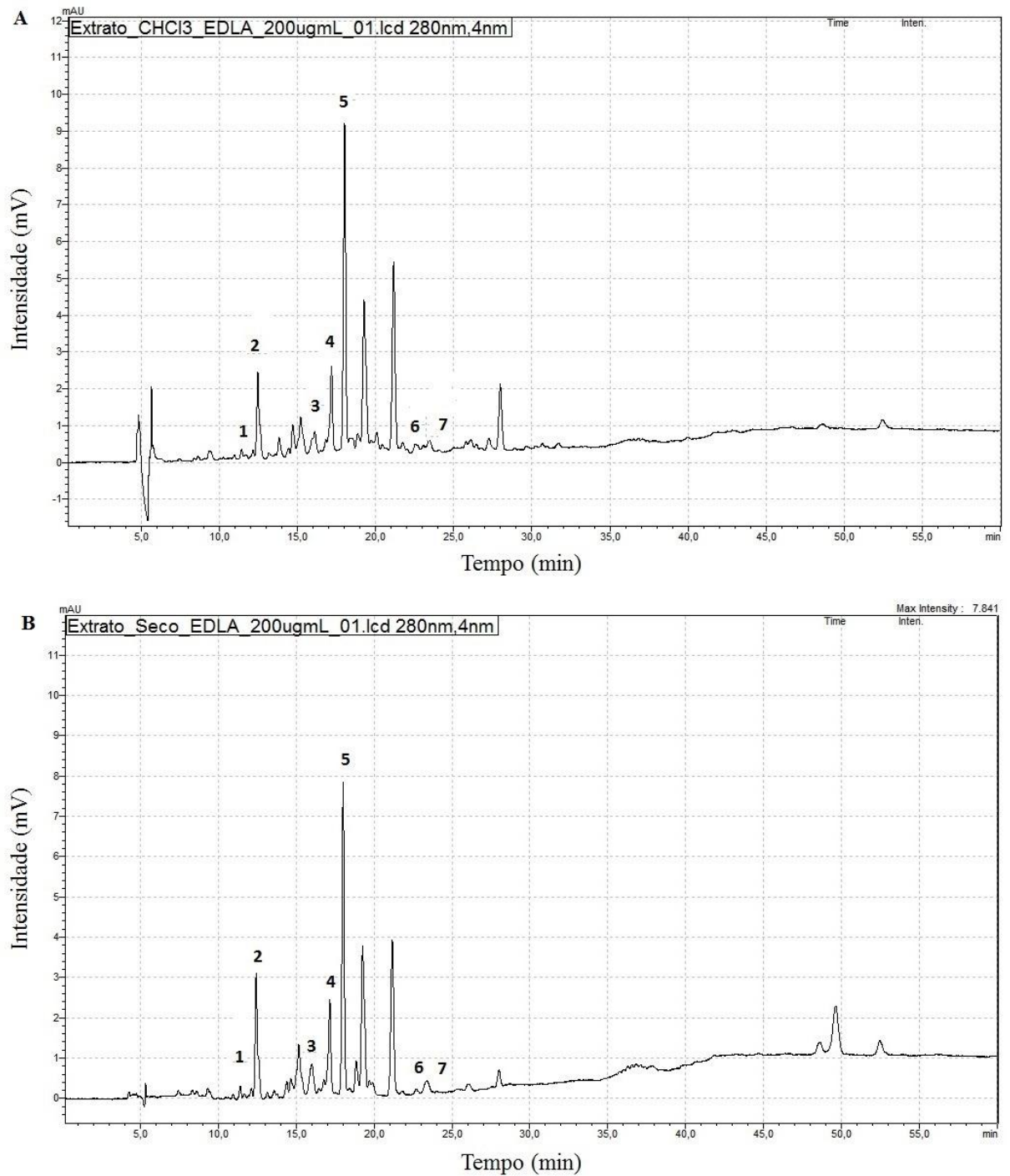
Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de isoflavonas na concentração de 500 µg/mL.



(1) daidzeína; (2) liquiritigenina; (3) pinobankisina; (4) isoliquiritigenina; (5) formononetina; (6) Pinocebrina e (7) biochanina A.

Fonte: AUTOR, 2017.

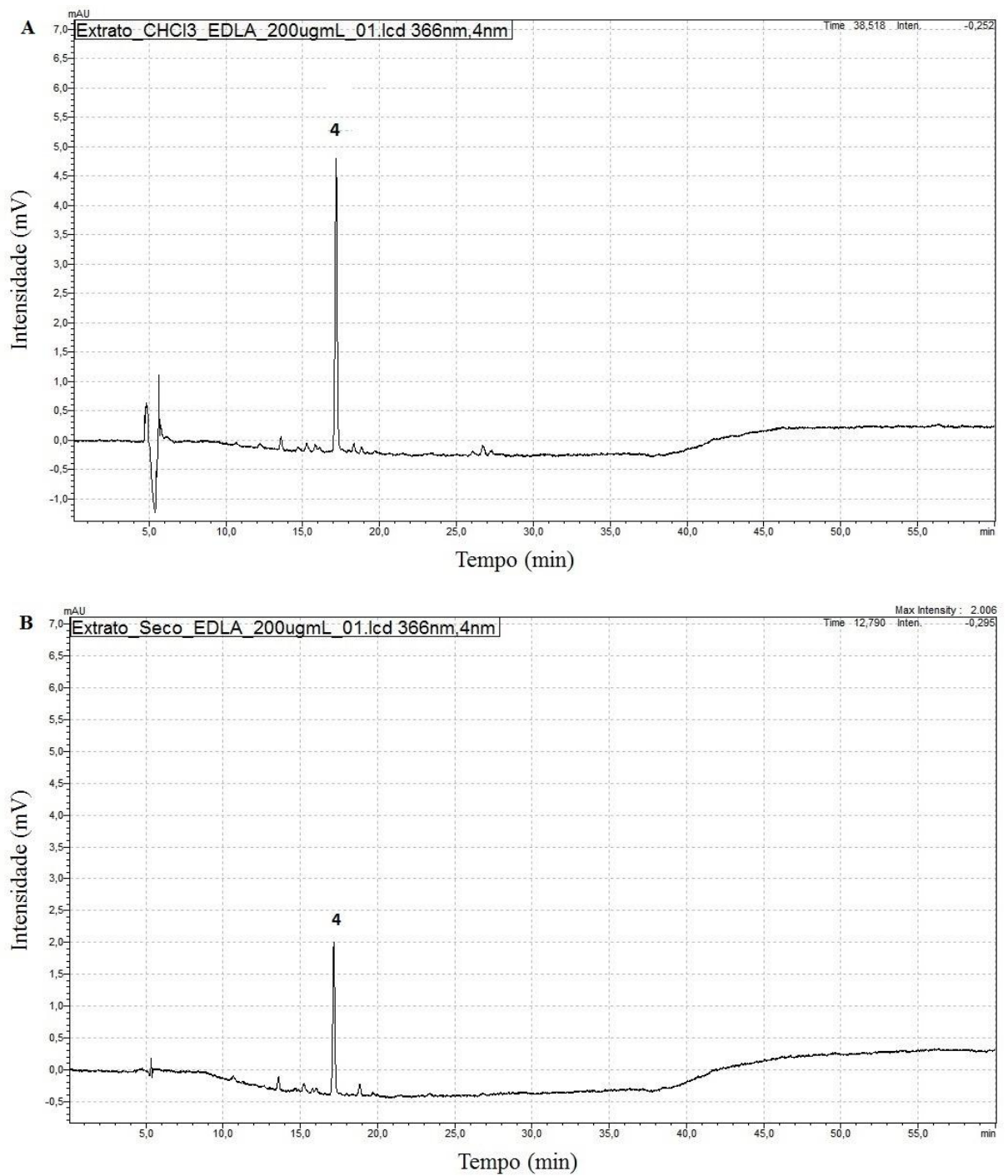
Figura 17 – Cromatograma dos extratos de PVA à 200 µg/mL no comprimento de onda 280 nm, em A ECPV e B ESPV.



- (1) daidzeína; (2) liquiritigenina; (3) pinobankisina; (4) isoliquiritigenina; (5) formononetina; (6) Pinocebrina e (7) biochanina A.

Fonte: AUTOR, 2017.

Figura 18 – Cromatograma dos extratos de PVA à 200 µg/mL no comprimento de onda 366 nm, em A ECPV e B ESPV.



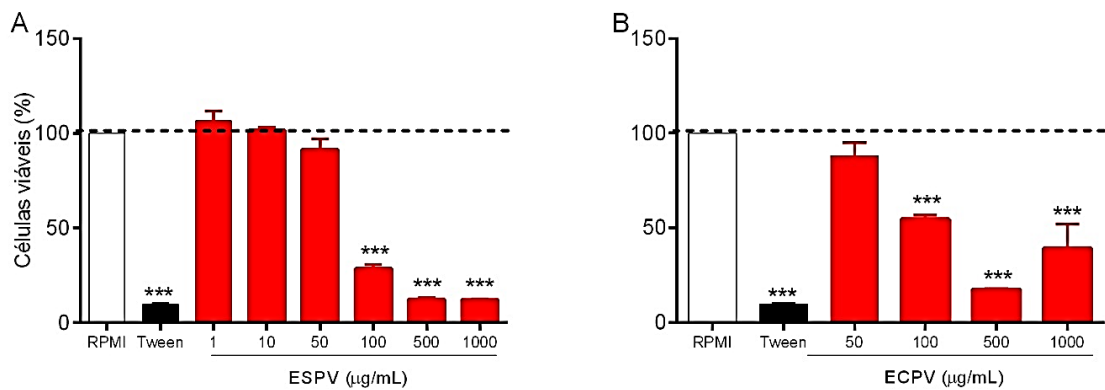
(4) isoliquiritigenina

Fonte: AUTOR, 2017.

5.2 Efeito de ECPV e ESPV sobre a viabilidade celular em macrófagos

Inicialmente foi avaliado o efeito citotóxico ESPV e ECPV sob macrófagos da linhagem (J774), os quais foram expostos aos extratos em concentrações de 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em meio de cultura suplementado durante 24 h. O ESPV apresentou redução entre (71,44 – 87,67%) a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1A). De modo semelhante ECPV reduziu em 45,46 – 82,55% a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1B). Em ambos os gráficos observa-se diminuição de 90,24% de células viáveis após tratamento com Tween 20 (3%). Os valores estão expressos na Tabela 6.

Gráfico 1 – Efeito da Própolis Vermelha Alagoana sobre a viabilidade celular em macrófagos



(A) ESPV (1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{M/mL}$). (B) ECPV (50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{M/mL}$). As células foram expostas ao composto por 24h antes da avaliação da viabilidade pelo teste de MTT. Valores expressos como média \pm e.p.m. da viabilidade das células. *** $P < 0,001$ versus grupo de células viáveis representado pela linha pontilhada.

Fonte: AUTOR, 2017.

Tabela 5 – Efeito de ESPV e ECPV sobre a viabilidade celular.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	ESPV	ECPV
1	106.7 \pm 4.84	-
10	101.6 \pm 1.40	-
50	91.34 \pm 5.80	88.04 \pm 7.61
100	28.56 \pm 2.27 ***	54.54 \pm 2.37 ***
500	12.33 \pm 0.87 ***	17.45 \pm 0.37 ***
1000	12.08 \pm 0.46 ***	39.37 \pm 12.70 ***

Valores expressos como média \pm e.p.m. da viabilidade das células. *** P < 0,001 *versus* grupo 100% de células viáveis.

Fonte: AUTOR, 2017.

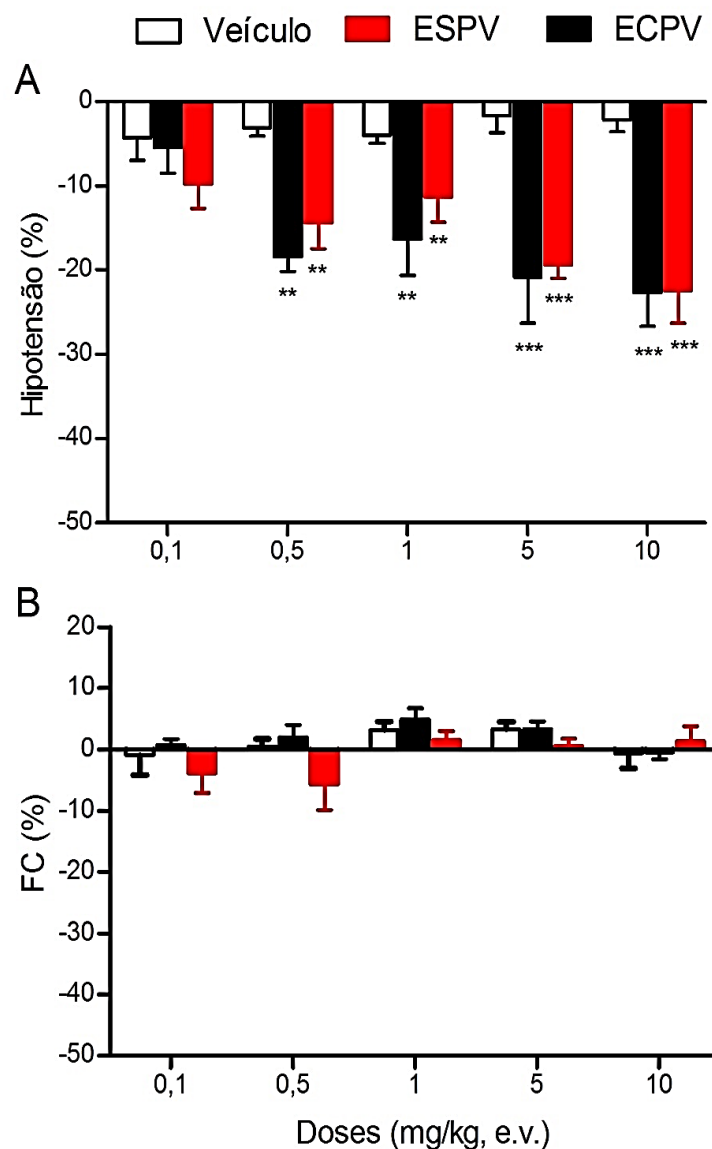
5.3 Efeito do ESPV e ECPV sobre pressão arterial média e frequência cardíaca

5.3.1 Efeito do ESPV e ECPV sobre PAM e FC de SHR adultos.

Após o período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, a administração randômica de doses de ESPV (0,1; 0,5; 1; 5, 10 mg/kg, e.v.) promoveu hipotensão dependente de dose (-9,8 \pm 2,9; -14,4 \pm 3,1; -11,3 \pm 3,0; -19,4 \pm 1,6; -22,5 \pm 3,8%, respectivamente), sem efeito na FC (-3,9 \pm 3,2; -5,7 \pm 4,2; 1,6 \pm 1,4; 0,6 \pm 1,2; 1,4 \pm 2,4%, respectivamente) quando comparada aos efeitos observados pela administração de salina (0,15 mL/dose) na PAM (-3,3 \pm 2,0; -3,1 \pm 1,0; -4,0 \pm 1,0; -1,7 \pm 2,0; -2,2 \pm 1,4%), e FC (-1,0 \pm 3,2; 0,5 \pm 1,2; 3,2 \pm 3,3; 3,3 \pm 1,2; -0,7 \pm 2,4%, respectivamente) de SHR não-anestesiados (Gráfico 2).

De modo semelhante após a administração randômica de doses de ECPV (0,1; 0,5; 1; 5, 10 mg/kg, e.v.) pôde-se observar no Gráfico 2 uma hipotensão dependente de dose (-5,5 \pm 3,0; -18,4 \pm 1,9; -16,3 \pm 4,3; -20,8 \pm 5,5; -22,7 \pm 4,0%, respectivamente) sem alterações significativas na FC. Não houve diferença significativa em nenhuma dose entre os efeitos sobre a PAM e FC de ESPV e ECPV.

Gráfico 2 – Efeito do ESPV e ECPV sobre a PAM e FC em SHR adultos.

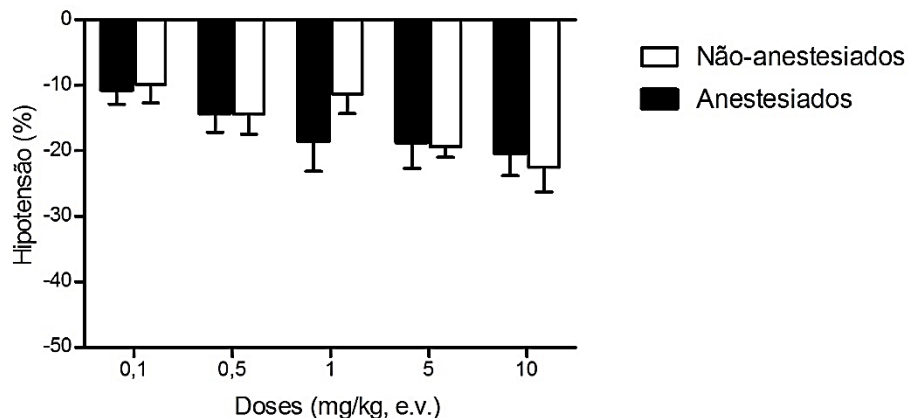


Efeito hipotensor (A) e FC (B) induzidos pela administração aguda de doses crescentes ESPV e ECPV (0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg, e.v.) em SHR adultos não-anestesiados (n = 5). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. ** p < 0,01 e *** p < 0,001 *versus* veículo (salina).

Fonte: AUTOR, 2017.

5.3.2 Efeito do ESPV e ECPV sobre PAM e FC de SHR adultos anestesiados.

A depressão do controle central (SNC) sobre a PAM, através da administração de Tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) em SHR adultos, não provocou diferença significativa no efeito hipotensor induzido por doses do ESPV (0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg, e.v.) ($-10,7 \pm 2,2$; $-14,2 \pm 3,3$; $-18,5 \pm 4,6$; $-18,7 \pm 4,0$; $-20,3 \pm 4,5\%$, respectivamente) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeito do ESPV sobre a PAM e FC em SHR adultos anestesiados.

Efeito hipotensor induzidos pela administração aguda de doses crescentes ESPV (0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/kg, e.v.) em SHR adultos anestesiados com Tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) (n = 5). Valores estão expressos como média \pm e.p.m.

Fonte: AUTOR, 2017.

5.4 Efeito do ESPV sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR

ESPV (1, 5, 10, 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por FEN (10 μM) em anéis de artéria mesentérica isolada de SHR com endotélio funcional ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 0,4\%$ e $\text{pD}_2 = 1,08 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$). Nas preparações em que o endotélio foi removido mecanicamente houve um deslocamento para direita da curva concentração-resposta ($E_{\text{máx}} = 56,7 \pm 2\%$ e $\text{pD}_2 = 1,37 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 7, Gráfico 4). O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de 5 min, com uma duração máxima de relaxamento total de 30 min.

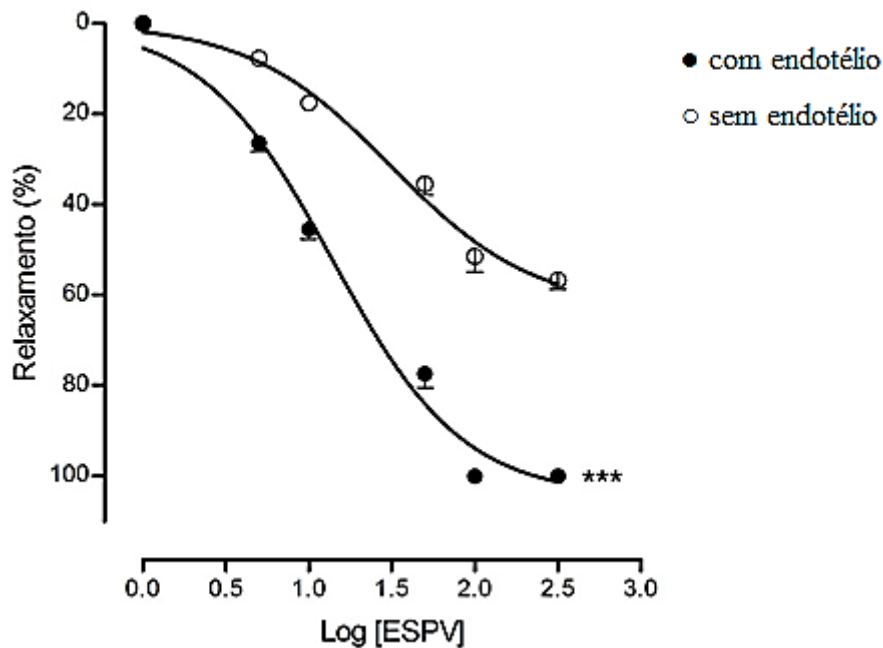
Tabela 6 – Comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 de ESPV em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Condições Experimentais	pD_2 ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%) relaxamento
Adulto com endotélio	$1,08 \pm 0,02^{**}$	$100 \pm 0,4^{***}$
Adulto sem endotélio	$1,37 \pm 0,04$	$56,7 \pm 2$

Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 5 experimentos. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Fonte: AUTOR, 2017.

Gráfico 4 – Efeito do ESPV em anéis de artéria mesentérica superior de SHR adultos pré-contraindo com FEN.



Efeito do ESPV (1, 5, 10, 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de SHR adultos, na presença e ausência do endotélio funcional, pré-contraindo com 10 μM de FEN ($n = 5$). *** $p < 0,001$ versus endotélio ausente.

Fonte: AUTOR, 2017.

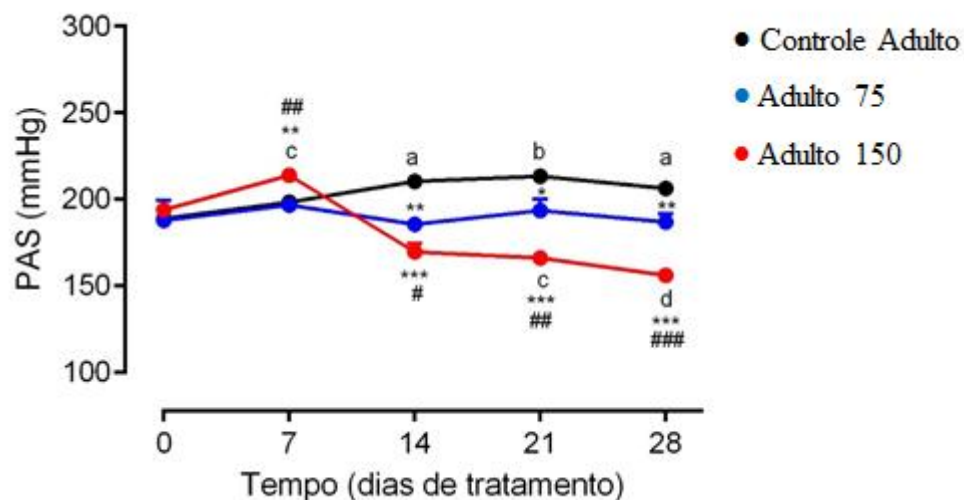
5.5 Avaliação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR adultos

O gráfico 5 expressa os valores de PAS de SHR adultos em função do tempo de tratamento com ESPV e veículo. A PAS do grupo Controle Adulto apresentou aumento significativo após 14, 21 e 28 dias de tratamento com veículo ($198,35 \pm 0,40$; $210,40 \pm 1,19$; $213,40 \pm 0,64$; $206,30 \pm 1,73$ mmHg, respectivamente) comparada ao dia 0 ($188,93 \pm 1,5$ mmHg, valor basal). Por outro lado, o tratamento de SHR com ESPV pertencentes ao grupo Adulto 75 foi capaz de impedir o aumento da PAS observada no grupo Controle Adulto, efeito observado a partir da análise da curva dos valores de PAS nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 ($187,92 \pm 5,85$; $196,73 \pm 1,64$; $185,57 \pm 1,61$; $193,68 \pm 3,25$ e $187,00 \pm 2,35$ mmHg, respectivamente).

Por sua vez, o tratamento com ESPV de SHR do grupo Adulto 150 demonstrou alterações significativas na PAS comparada ao dia 0 ($193,95 \pm 1,64$ mmHg). Onde observou-se aumento significativo da PAS no 7º dia de tratamento ($213,96 \pm 1,49$ mmHg) com reversão no 14º dia ($169,67 \pm 2,25$ mmHg) e significativa redução nos dias 21 e 28 ($166,17 \pm 1,67$ e $156 \pm 1,6$ mmHg).

Além disso, o gráfico 5 demonstra a ausência de diferenças significativas entre as PAS basais dos grupos Controle Adulto, Adulto 75 e Adulto 150 e significativa redução da PAS após 14 dias de tratamento com ESPV em ambos os grupo. A redução da PAS observada no grupo Adulto 150 apresentou-se significativamente maior em comparação à redução do grupo Adulto 75 ao longo do tratamento.

Gráfico 5 – Efeito do ESPV em SHR adultos tratados por 28 dias



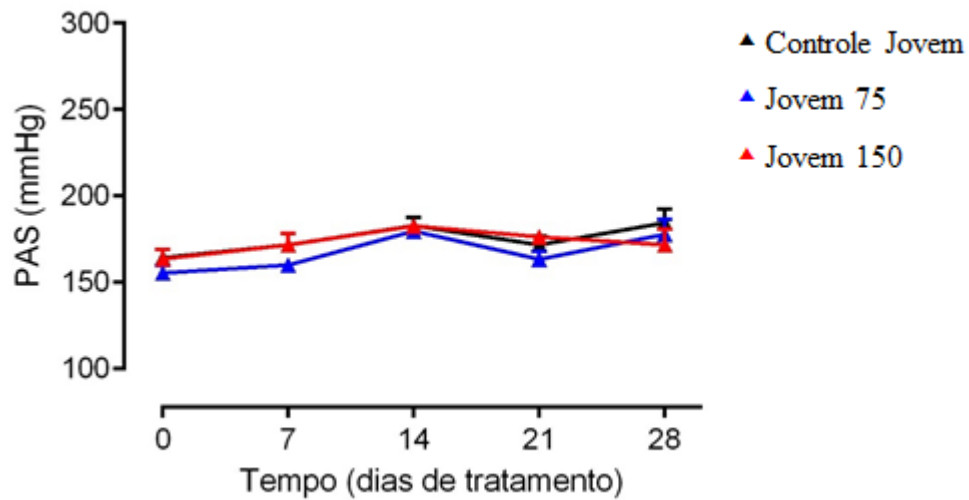
Efeito na PAS de SHR adultos após a administração de salina (1mL/kg, v.o.) e ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 5). a $P < 0,05$ versus dia 0 do grupo Controle Adulto; b $P < 0,01$ versus dia 0 do grupo Controle Adulto; c $P < 0,05$ versus dia 0 do grupo Adulto 150; d $P < 0,01$ versus dia 0 do grupo Adulto 150 (n=5); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo Controle Adulto; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ versus grupo Adulto 75.

Fonte: AUTOR, 2017.

5.6 Avaliação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR jovens

Os valores basais de PAS representados no Gráfico 6 como dia 0. O Grupo Controle Jovem exibiu PAS basal de $164,44 \pm 2,33$ mmHg sem oscilações significativas ao longo do tratamento ($171,71 \pm 1,33$; $182,92 \pm 2,64$; $171,67 \pm 3,02$; $184,45 \pm 4,58$ mmHg, dias 7; 14; 21 e 28, respectivamente). Da mesma forma, comparados aos valores basais (dia 0: $155,4 \pm 2,63$ e $153,58 \pm 0,23$ mmHg), o grupo Jovem 75 (ESPV, 75 mg/kg, v.o.) e Jovem 150 (ESPV, 75 mg/kg, v.o.) não apresentaram alterações significativas na PAS após o tratamento (dia 7: $160,09 \pm 1,15$ e $171,78 \pm 3,75$; dia 14: $179,65 \pm 0,16$ e $182 \pm 2,29$; dia 21: $163,50 \pm 2,51$ e $176,46 \pm 2,41$; dia 28: $177,84 \pm 4,08$ e $180,75 \pm 0,26$ mmHg, respectivamente). Os valores de PAS não diferiram de maneira significativa entre os grupos compostos por SHR jovens.

Gráfico 6 – Efeito do ESPV na PAS de SHR jovens tratados por 28 dias.



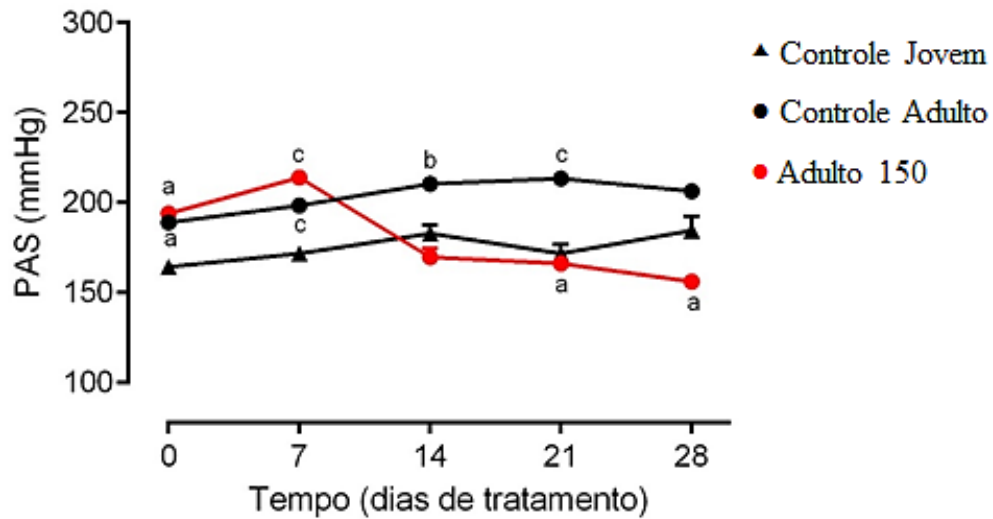
Efeito na PAS de SHR jovens após a administração de salina (1mL/kg, v.o.) e ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m (n = 5).

Fonte: AUTOR, 2017.

5.7 Comparação do efeito anti-hipertensivo do ESPV em SHR jovens e adultos

A comparação entre os valores basais dos grupos Controle Jovem ($164,44 \pm 2,33$ mmHg) e Controle Adulto ($188,93 \pm 1,5$ mmHg) demonstrou aumento significativo no grupo Controle Adulto, entretanto, a diferença observada foi abolida no 28º dia ($184,45 \pm 4,58$ e $206,3 \pm 1,73$ mmHg) (Gráfico 7). O gráfico também revela redução da PAS do grupo Adulto 150 equiparou-se aos valores do grupo Controle Jovem no 14º dia de tratamento ($169,67 \pm 2,25$ e $182,92 \pm 2,64$ mmHg, respectivamente), apresentando-se significativamente menor após 21º e 28º dia de tratamento.

Gráfico 7 – Comparação do efeito do ESPV em SHR jovens e adultos tratados por 28 dias.



Efeito na PAS de SHR adultos e jovens após a administração de salina (1mL/kg, v.o.) e ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 5) P < 0,05; b P < 0,01 e c P < 0,001 *versus* grupo Controle Jovem.

Fonte: AUTOR, 2017.

5.8 Avaliação do peso médio de SHR submetidos ao tratamento com ESPV.

As médias dos pesos médios antes e ao longo do tratamento estão descritos na Tabela 8. A partir desta, observa-se a ausência de alterações no peso corporal médio (PC) ao longo do tratamento nos grupos Controle Adulto, Adulto 75 e Adulto 150. Entretanto, o mesmo não foi observado nos grupos com animais jovens, onde, apenas o grupo Controle Jovem não apresentou alteração no peso médio. Além disso, observa-se aumento significativo no peso médio do grupo Jovem 75 após o dia 0, ademais significativa redução do peso médio no 14º dia de tratamento no grupo Jovem 150 comparado ao dia 0 e aos demais grupos.

Tabela 7 – Peso corporal médio de SHR tratados com ESPV por 28 dias.

Grupo	Peso dia 0 (mg)	Peso dia 7 (mg)	Peso dia 14 (mg)	Peso dia 21 (mg)	Peso dia 28 (mg)
Controle Adulto	301,4 ± 6,06	324,6 ± 8,51	324,6 ± 8,51	316,2 ± 7,32	314,6 ± 7,4
Adulto 75	301,6 ± 1,0	301,6 ± 1,0	290,0 ± 2,45	289,6 ± 3,15	301,67 ± 0,96
Adulto 150	318,0 ± 1,61	311,6 ± 6,53	315,2 ± 6,87	305,6 ± 6,4	287,0 ± 12,57
Controle Jovem	269,6 ± 5,72	285,40 ± 3,32	294,6 ± 2,04	293,00 ± 3,33	279,6 ± 1,15
Jovem 75	265,00 ± 5,43	287,4 ± 5,8 ^f	291,2 ± 3,95 ^e	294,00 ± 3,50 ^e	288,67 ± 7,5 ^e
Jovem 150	299,2 ± 1,68	276,8 ± 10,47	258,4 ± 1,59 ^{d***##}	282,00 ± 1,94	282,33 ± 4,3

Peso corporal médio após 28 dias de tratamento. Valores estão expressos como média ± e.p.m. (n = 5) P < 0,01 *versus* dia 0 do grupo Jovem 75; e P < 0,05 *versus* dia 0 do grupo Jovem 75; d P < 0,01 *versus* dia 0 do grupo Jovem 150; ** P < 0,01 *versus* grupo Controle Jovem e ## P < 0,01 *versus* grupo Jovem 75.

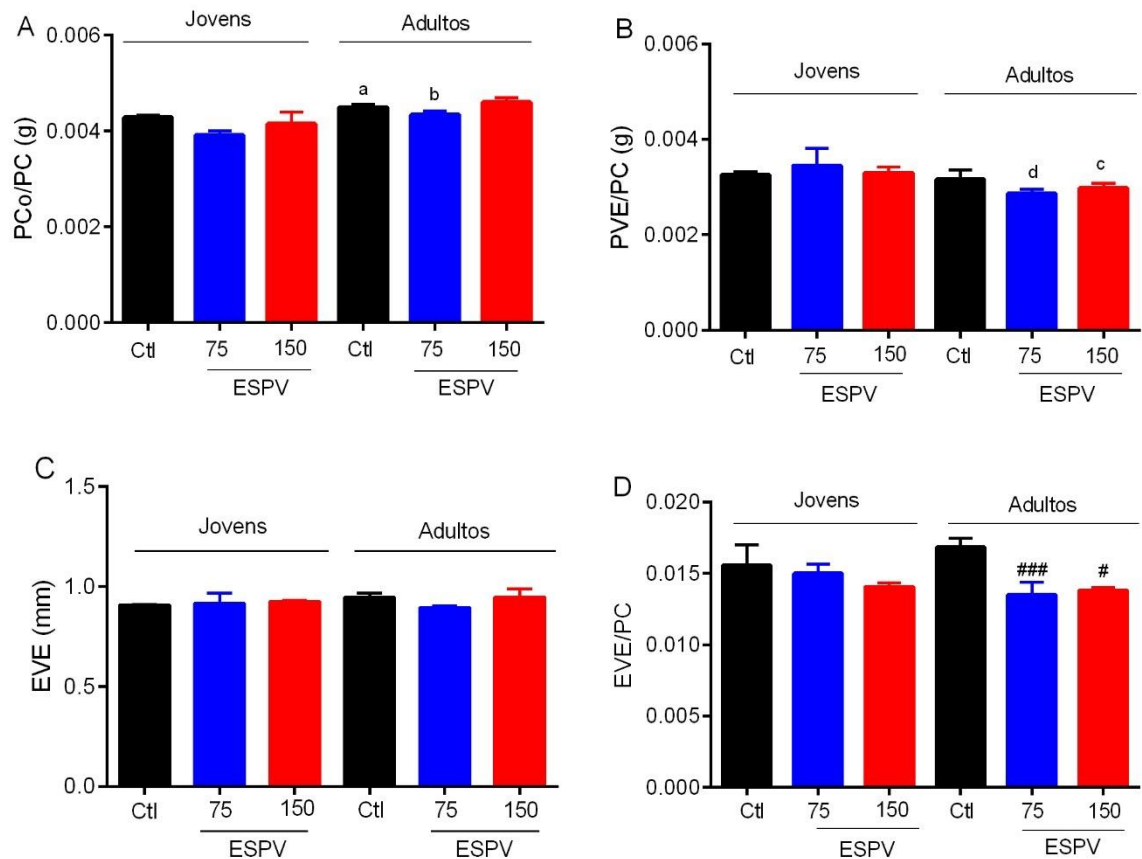
Fonte: AUTOR, 2017.

5.9 Avaliação da morfometria do miocárdio

Na avaliação da razão peso médio do miocárdio e peso corporal médio (PCo/PC), expressa no Gráfico 8A, o grupo Controle Adulto apresentou o aumento de 4,96% quando comparado ao grupo Controle Jovem, enquanto grupo o grupo Adulto 75 demonstrou aumento de 10,97% em relação ao grupo Jovem 75. Por outro lado, não observou-se qualquer alteração entre os grupos tratados com ESPV e seus respectivos controles.

Por outro lado, a razão entre o peso do ventrículo esquerdo e peso corporal médio (PVE/PC) revelou significativa diminuição de 17,09% e 9,67% nos grupo Adulto 75 e Adulto 150 em comparação ao grupo Jovem 75 e Jovem 150, respectivamente Gráfico 8B.

Em relação à espessura do ventrículo esquerdo (EVE) não houve diferença significativa entre os grupos como observa-se no Gráfico 8C. Entretanto, na avaliação da razão entre a espessura do ventrículo esquerdo e peso corporal médio (EVE/PC) os grupos Adulto 75 e Adulto 150 apresentaram redução significativa de 19,64% e 17,86%, respectivamente, quando comparados ao grupo Controle Adulto.

Gráfico 8 – Efeito do tratamento de ESPV sobre a morfometria do miocárdio.

A) Razão entre o peso médio do miocárdio e peso corporal médio; B) razão entre o peso do ventrículo esquerdo e peso corporal médio; C) espessura do ventrículo esquerdo e D) da razão entre a espessura do ventrículo esquerdo e peso corporal médio de SHR tratados com salina (1mL/kg, v.o.) ou ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média ± e.p.m. (n = 5).

a P < 0,05 versus grupo Controle Jovem; b P < 0,01 grupo Jovem 75; c P < 0,01 versus grupo Jovem 150; d P < 0,05 versus grupo Jovem 75; # P < 0,05 e ## P < 0,05 versus grupo Controle Adulto.

Fonte: AUTOR, 2017.

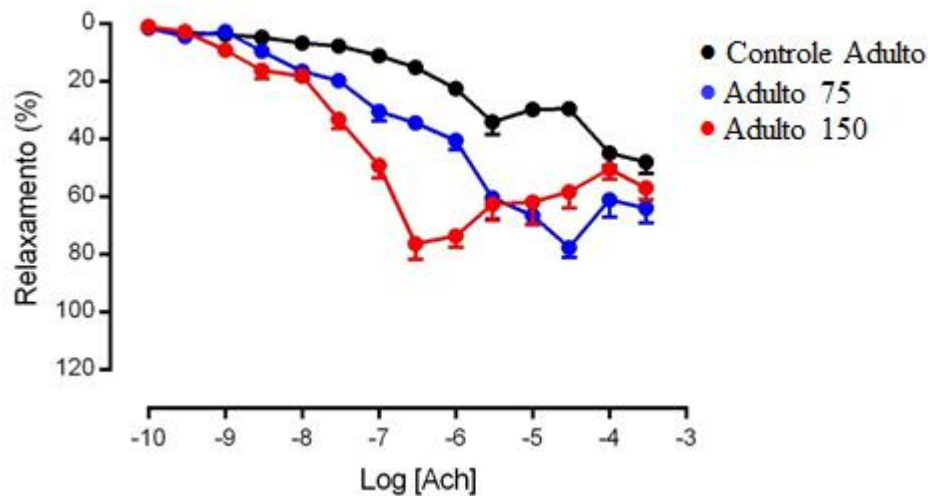
5.10 Avaliação da reatividade vascular

5.10.1 Avaliação da presença do endotélio funcional na resposta vascular à adição de ACh

A exposição à ACh (10^{-10} – 3.10^{-4} M) promoveu efeito trifásico dependente de concentração, caracterizado por relaxamento seguido por contração vascular e relaxamento concomitante (Gráfico 9). O grupo Controle Adulto apresentou primeiramente efeito relaxante de $34,02 \pm 4,8\%$ com conseguinte $4,9 \pm 2,7\%$ de contração, enquanto os grupos Adulto 75 e 150 apresentaram curva concentração-resposta deslocadas significativamente para esquerda com fase vasorrelaxante primária prolongada apresentando relaxamento máximo de $77,68 \pm$

3,92% e $76,4 \pm 3,8\%$, respectivamente. A fase contrátil dos grupos Adulto 75 e 150 ($13,62 \pm 5,94\%$ e $19,32 \pm 4,76\%$, respectivamente) apresentou-se significativamente maior em relação ao grupo Controle Adulto, sem alterações significativas no efeito vasorrelaxante final da curva (Tabela 8). A Tabela 9 descreve as diferenças entre os $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 nas respostas vasorrelaxantes à curva concentração-resposta à ACh.

Gráfico 9 – Avaliação da resposta vascular à ACh em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.



Curva concentração-resposta ao ACh (10^{-10} – 3.10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos tratados por 28 dias com salina (1mL/kg, v.o.) ou ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m (n = 5).

Fonte: AUTOR, 2017.

Tabela 8 – Efeitos da curva concentração-resposta à ACh em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos após tratamento por 28 dias com ESPV pré-contraídos com FEN.

Condição Experimental	Controle Adulto	Adulto 75	Adulto 150
Fase relaxante %	$34,02 \pm 4,8$	$77,68 \pm 3,92^{***}$	$76,4 \pm 3,8^{***}$
Fase Contrátil ($\Delta\%$)	$4,9 \pm 2,7$	$13,62 \pm 5,94$	$19,32 \pm 4,76$
Efeito Final	$48,08 \pm 4,7$	$64,06 \pm 4,44$	$57,08 \pm 4,07$

Valores expressos como média \pm e.p.m. (n = 5). *** P < 0,001 versus Controle Adulto

Fonte: AUTOR, 2017.

Tabela 9 – Comparação dos $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos após tratamento por 28 dias com ESPV em diferentes condições experimentais.

Condição Experimental	Controle Adulto	Adulto 75	Adulto 150
$E_{m\acute{a}x}$ NPS (%)	100,5 ± 0,98	100,8 ± 0,97	101,3 ± 0,85
pD_2 NPS (µg/mL)	-7,45 ± 0,04	-7,35 ± 0,39	- 7,55 ± 0,04
$E_{m\acute{a}x}$ ACh (%)	48,06 ± 4,2 ^{c,d}	77,68 ± 3,92 ^b	76,4 ± 3,8 ^{b,e}
pD_2 ACh (µg/mL)	- 5,74 ± 0,14	-6,46 ± 0,15	-8,72 ± 3,8 ^a
$E_{m\acute{a}x}$ L-NAME (%)	16,07 ± 0,98	-	18,9 ± 1,65
pD_2 L-NAME (µg/mL)	-6,27 ± 0,19	-	-5,12 ± 0,33 ^a
$E_{m\acute{a}x}$ L-NAME + INDO (%)	35,66 ± 2,32	-	15,90 ± 1,32 ^b
pD_2 L-NAME + INDO (µg/mL)	-6,2 ± 0,23	-	-5,39 ± 0,24 ^a

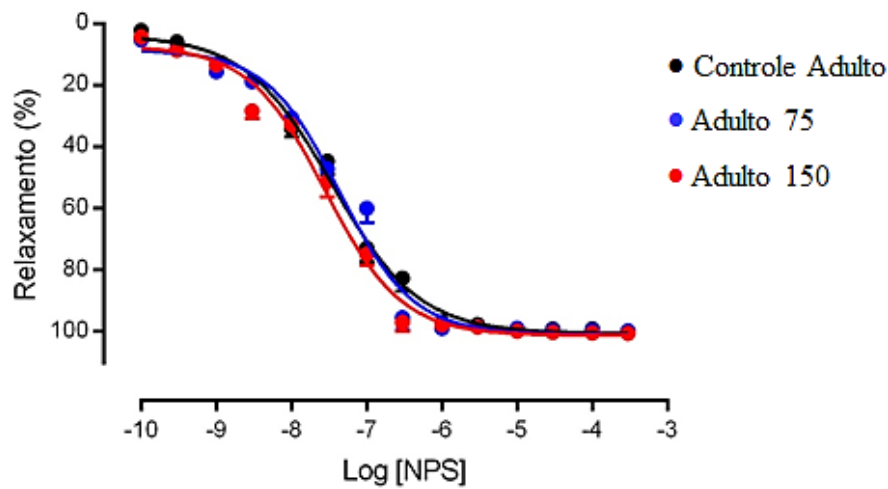
Valores expressos como média ± e.p.m. (n = 5). a P < 0,05 e b P < 0,001 *versus* Controle Adulto; c P < 0,05 *versus* pD_2 L-NAME Controle Adulto; d P < 0,001 *versus* $E_{m\acute{a}x}$ L-NAME Controle Adulto; e P < 0,001 *versus* $E_{m\acute{a}x}$ L-NAME Adulto 150. (-) condição experimental ausente

Fonte: AUTOR, 2017.

5.10.2 Avaliação da resposta vascular á adição de NPS

A adição cumulativa de NPS (10^{-10} – 3.10^{-4} M) em anéis pré-contraídos com FEN (10 µM) (Gráfico 10). Nesta condição, NPS foi capaz de promover efeito vasorrelaxante dependente de concentração nos grupos Controle Adulto ($E_{m\acute{a}x}$ = 100,5 ± 0,98%, pD_2 = -7,45 ± 0,04 µg/mL), Adulto 75 ($E_{m\acute{a}x}$ = 100,8 ± 0,97%, pD_2 = -7,35 ± 0,39 µg/mL) e Adulto 150 ($E_{m\acute{a}x}$ = 101,3 ± 0,85%, pD_2 = -7,55 ± 0,04 µg/mL) sem diferença significativa (Tabela 9).

Gráfico 10 – Avaliação da resposta vascular ao NPS em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.



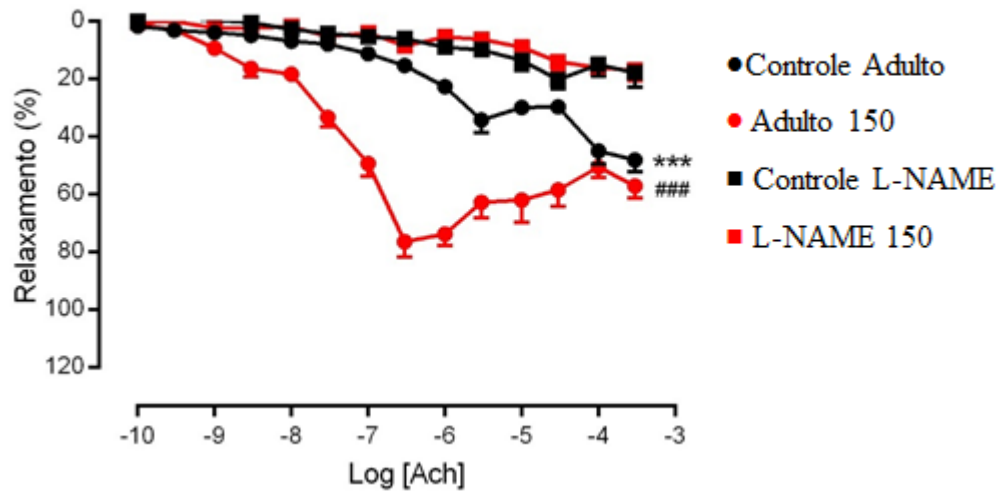
Curva concentração-resposta de NPS (10^{-10} – 3.10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos tratados por 28 dias com salina (1mL/kg, v.o.) ou ESPV (75 mg/kg ou 150 mg/kg, v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 5).

Fonte: AUTOR, 2017.

5.10.3 Avaliação da participação da via da NOS na resposta endotelial à adição de ACh.

Afim de investigar a participação da via da NOS na resposta endotelial de animais SHR tratados com ESPV por 28 dias, os anéis de artéria mesentérica foram pré-incubados com L-NAME ($300 \mu\text{M}$), um bloqueador não seletivo da NOS. A presença do L-NAME foi capaz de abolir a resposta vascular às concentrações crescentes de ACh (10^{-10} – 3.10^{-4} M) no grupo Controle Adulto e em ambos os grupos com redução significativa do $E_{\text{máx}}$ e pD_2 como demonstrado através da Tabela 9 e Gráfico 11.

Gráfico 11 – Comparação da resposta vascular à ACh na presença e ausência de L-NAME em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.

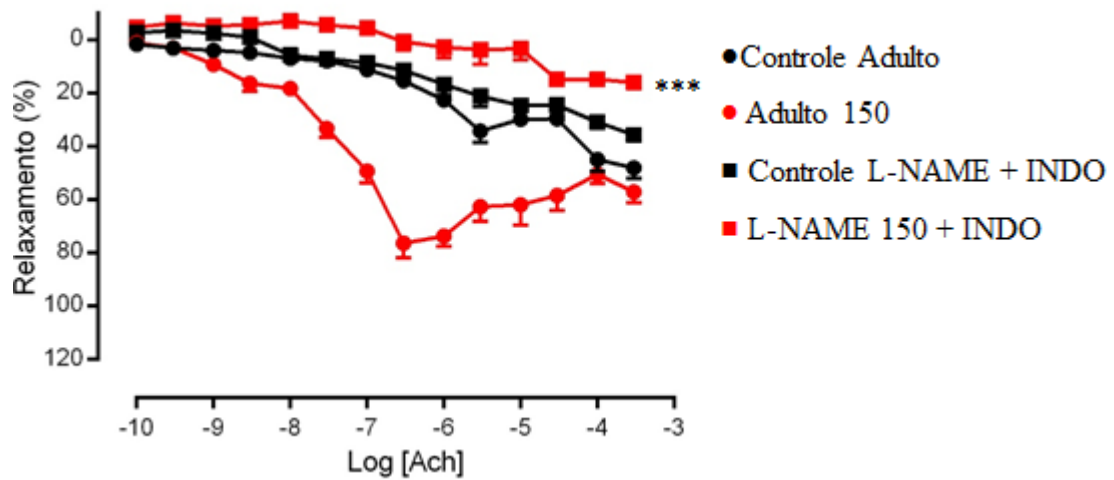


Curva concentração-resposta ao ACh (10^{-10} – 3.10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos tratados por 28 dias com salina (1mL/kg, v.o.) ou ESPV (150 mg/kg, v.o.); na ausência e presença de L-NAME (300 μ M). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 5) *** P < 0,001 *versus* Grupo Controle Adulto na presença de L-NAME; ### P < 0,001 *versus* Grupo Tratado 150 na presença L-NAME.

5.10.4 Avaliação da participação da via da NOS na resposta endotelial à adição de ACh.

De forma semelhante, o bloqueio concomitante da NOS (L-NAME, 300 μ M) e COX (INDO, 100 μ M) promoveu abolição da resposta às concentrações-crescentes de ACh nos grupos Controle Adulto e Adulto 150 (Gráfico 12 e Tabela 9).

Gráfico 12 – Comparação da resposta vascular à ACh na presença e ausência de L-NAME e INDO em artéria mesentérica superior de SHR adultos tratados com ESPV por 28 dias.



Curva concentração-resposta ao ACh (10^{-10} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) na presença de L-NAME ($300 \mu\text{M}$) e INDO ($100 \mu\text{M}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos tratados por 28 dias com salina (1mL/kg , v.o.) ou ESPV (150mg/kg , v.o.). Valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 5$). *** $P < 0,001$ versus Grupo Controle Adulto.

Fonte: AUTOR, 2017.

6 DISCUSSÃO

A PVA corresponde à um produto produzido pelas abelhas *A.m. scutellata* a partir de substâncias coletadas da *D. ecastophyllum* em regiões litorâneas do estado de Alagoas. Dentre os vários tipos de própolis encontrados no Brasil, a PVA apresenta um alto teor de isoflavonas, metabólitos que exibem diversas ações farmacológicas, como por exemplo, antimicrobiana, antileishmania, anticâncer, antinociceptiva, além de possuir elevado potencial terapêutico para doenças que acometem o SCV, pois apresenta atividade anti-inflamatória, anti-hipertensiva e antioxidante. As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte no Brasil e no mundo, e a HAS representa o principal fator de risco para estas patologias. Entretanto, apesar do alto índice de morbimortalidade em virtude desse estado patológico, a adesão ao tratamento farmacológico da HAS apresenta-se baixa. Assim sendo, com intuito de promover um melhor controle da HAS, as formulações de liberação lenta contendo fármacos anti-hipertensivos mostram-se como uma opção promissora.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as ações cardiovasculares do extrato seco de própolis vermelha (ESPV), uma formulação gastroresistente, em ratos espontaneamente hipertensos. O modelo de hipertensão genética SHR foi escolhido devido à semelhança, no que diz respeito ao desenvolvimento e complicações com a HAS observada em humanos. Para atingir o objetivo proposto foram utilizadas diferentes abordagens experimentais, *in vivo* para os protocolos de medidas direta e indireta de pressão arterial e *ex vivo* para avaliação da reatividade vascular em artéria mesentérica superior isolada. Desta forma, ESPV promoveu efeito anti-hipertensivo em SHR adultos tratados por 28 dias, devido a uma provável redução da disfunção endotelial.

O ESPV, conforme registro de patente BR 10 2012 013590-6 A2, foi desenvolvido a partir do extrato clorofórmico de PVA para fins de se obter uma preparação gastrorresistente com granulometria estável, promovendo desta forma uma liberação lenta do extrato de PVA. Desta forma, para que o ESPV fosse obtido, primeiramente foi realizada uma extração de PVA em clorofórmio originando o ECPV (extrato clorofórmico de própolis vermelha). Devido a presença de compostos fenólicos de várias polaridade, observa-se uma maior presença destes em frações clorofórmicas de PVA quando comparadas a extrações realizadas em etanol, hexano e acetato de etila (ALENCAR et al., 2007), não havendo diferenças qualitativas entre a fração clorofórmica e extrato etanólico (DE MENDONÇA et al., 2015).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) constitui em uma técnica amplamente utilizada para separação de compostos de misturas complexas, como por exemplo produtos naturais (ENGELHARDT, 2012).

Entretanto, não fornece detalhes necessários à identificação desses compostos, deste modo, faz-se necessário o acoplamento de técnicas de espectrometria capazes de realizar tais identificações, como por exemplo a espectrofotometria de absorção nas regiões do ultravioleta visível (UV-*vis*), técnica analítica abrangente e indicada à identificação de compostos com instaurações, a exemplo dos fenólicos (BARNES, 1992).

Com base no exposto, para devida separação e identificação dos constituintes presentes no ECPV e ESPV, foi utilizado HPLC acoplado a UV-*vis*. Os cromatogramas revelaram a presença dos mesmos compostos fenólicos em ambos extratos, identificados como as isoflavonas: daidzeína, biochanina A, liquiritigenina, pinobankisina, formononetina e pinocebrina e uma chalcona a isoliquiritigenina. A presença destes compostos no perfil fitoquímico da PVA é difundida no meio científico o que confirma a qualidade da amostra de própolis utilizada na extração (DAUGSCH et al., 2008; FROZZA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014). Além de demonstrar que a preparação do ESPV foi capaz preservar a composição e concentrações da maioria dos compostos. Dado importante, visto que as isoflavonas identificadas apresentam diversas ações farmacológicas (RANGEL-HUERTA et al., 2015).

Diversos estudos foram realizados com as isoflavonas presentes nos extratos de forma isolada (ONDRIAS et al., 1997; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007; GAUR et al., 2014; LIU et al., 2015). Nos quais se observaram a formononetina, constituinte majoritário do ESPV e ECPV, capaz de reduzir a PAS de SHR tratados por oito semanas, provavelmente devido a uma melhora na função endotelial com aumento da expressão de NOSe e redução do receptor adrenérgico $\alpha 1$ vascular (SUN; LIU; CAO, 2011; SUN et al., 2013), a pinomcebrina a qual apresenta ações sobre o ritmo cardíaco de ratos e grande atividade antioxidante (RASUL et al., 2013; LUNGKAPHIN et al., 2015; LAN et al., 2016); e ainda, a daidzeína e biochanina A promovem vasorrelaxamento dependente e independente de endotélio (WANG et al., 2005; WANG; GAO; et al., 2006; WANG; QIU; et al., 2006; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007). Estes estudos fundamentam o potencial farmacológicos para ações do ESPV no SCV de SHR.

Além das já mencionadas, os compostos identificados apresentam uma gama de outras ações farmacológicas conhecidas (CALDERONE et al., 2004; MING et al., 2015; LIU; BAI; QI, 2016; TAN; KIM, 2016), entretanto, os demais constituintes presentes no ESPV ainda não apresentam identificação, desta forma, tornou-se necessário avaliação da toxicidade dos extratos. Para esse fim, realizou-se a avaliação da viabilidade celular através do ensaio do MTT, este teste avalia o dano mitocondrial provocado pelo composto/extrato, através da capacidade

celular de reduzir o MTT à formazan. Desta forma, a concentração de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória celular e por conseguinte sua viabilidade (MOSMANN, 1983).

Para realização do MTT macrófagos da linhagem (J774), foram expostos ao ECPV e ESPV, e após 24h a concentração de formazan demonstrou que ambos extratos apresentam toxicidade com IC₅₀ 72,86 e 83,28 µg/mL, respectivamente. Em contrapartida, em linhagem de célula embrionária do epitélio renal (Hek-293) o extrato etanólico de própolis vermelha apresentou IC₅₀ maior que 150 µg/mL (FROZZA et al., 2013) e em linhagem de fibroblastos de pulmão (MCR-5) IC₅₀ de 36,4 µg/mL (DE MENDONÇA et al., 2015). Esta discrepância nos valores de IC₅₀ deve-se às diferentes linhagens celulares empregadas nos ensaios, bem como à diferenças nos protocolos, como por exemplo, tempo de incubação que variou de 24 à 72h. Ademais, estudos de citotoxicidade *in vitro* são parte de uma triagem inicial para identificar se o composto/extrato interfere na viabilidade celular, sendo necessário outras metodologias para atestar ou não a segurança de ESPV e ECPV (DE MENDONÇA et al., 2015).

Após confirmação da presença de isoflavonas e análise da citotoxicidade, tendo em vista o favorável potencial farmacológico sobre o SCV, avaliou-se o efeito do ESPV e ECPV sobre os parâmetros cardiovasculares de SHR. Para isso, utilizou-se uma abordagem *in vivo*, onde foram avaliados os parâmetros PAM e FC, através do protocolo de medida direta da pressão arterial. Para evitar alterações no funcionamento dos principais sistemas de regulação da pressão, realizou-se o protocolo de medida direta da pressão arterial em animais não anestesiados com livre movimentação, pois a anestesia altera as respostas autonômicas através da inibição de algumas sinapses do sistema nervoso central (KORNER et al, 1968; WHITE e MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al, 1982),

A administração randômica de doses ESPV e ECPV induziu hipotensão de maneira dependente de dose, sem qualquer efeito na FC de SHR. Uma vez que alterações na PAM podem estar associadas a FC e/ou RVPT (MOHRMAN, 2008). Esta ausência de efeito na FC, indica que ambos extratos não exercem ação direta sobre o ritmo cardíaco e que a hipotensão observada não é mediada ou associada à alterações na FC e sim, provavelmente, por ações sobre a RVP (CRESTANI et al., 2009; MADLALA et al., 2016).

Visto que nenhuma diferença foi observada no efeito hipotensor induzido pelo ESPV em comparação ao ECPV, além das semelhanças na composição química e no que diz respeito aos resultados sobre a viabilidade celular, os demais protocolos experimentais foram realizados apenas com o ESPV.

Desta forma, com o propósito de avaliar o envolvimento do sistema nervoso central no efeito hipotensor do ESPV, o mesmo protocolo foi realizado com um grupo de animais anestesiados com tiopental sódico, pois, a anestesia altera os principais sistemas de regulação da PAM (KORNER et al., 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982), através da depressão do SNC com conseqüente inibição do sistema nervoso simpático (FLUCKIGER et al., 1985; DORWARD et al., 1985). Sob estas condições o efeito hipotensor do ESPV não foi alterado, assim sendo, a hipotensão induzida pela administração do ESPV, deve-se provavelmente à efeitos periféricos e não centrais.

Para confirmar a possível ação periférica vascular do ESPV foram utilizados protocolos *ex vivo* com anéis de artéria mesentérica superior isolada. A escolha da técnica, deu-se devido ao pequeno diâmetro da artéria mesentérica, pois vasos de pequeno calibre constituem o principal local de geração de resistência vascular e por isso apresentam uma maior participação na regulação da pressão arterial e perfusão de órgãos (KWANA et al, 2004). Para isto foram obtidas curvas concentração-resposta para ESPV frente à pré-contrações induzidas por FEN. A partir dos resultados, observou-se um efeito vasorrelaxante dependente de concentração. Desta forma, pode-se dizer que ESPV promoveu hipotensão em SHR provavelmente em função de uma redução da RVP (MUNHOZ et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012)

Todos os vasos sanguíneos, com exceção dos capilares, são constituídos por três camadas de células, a adventícia (tecido conjuntivo externo), a média (tecido muscular liso) e a íntima (endotélio) (MELLO et al, 2007). Esta última, através da síntese e secreção de diversos mediadores químicos, desempenha um papel importante no controle da homeostase vascular, pois promove o equilíbrio na liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores liberados (FURIAN, 2009).

A síntese desses fatores vasodilatadores ocorre por meio do aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelular via estimulação de receptores acoplados a proteína G expressos na membrana plasmática das células endoteliais (VIARO; NOBRE e EVORA, 2000). Os principais fatores relaxantes são o NO, os produtos derivados da COX e o FHDE (DURAND; GUTTERMAN, 2013). Diante do exposto, torna-se fundamental a avaliação da participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio no efeito dilatador induzido pelo ESPV.

Para tanto, uma nova curva concentração-resposta para o ESPV foi obtida em anéis de artéria mesentérica na ausência do endotélio funcional. Sob estas condições, observou-se um atenuação do efeito vasorrelaxante com redução do $E_{máx}$, além de um deslocamento da curva para direita refletindo o aumento do pD_2 . Dados estes, proponentes de que o ESPV não

apenas exerce efeito vasorrelaxante, como esta ação depende da integridade do endotélio para ser observada em sua totalidade (100%).

Tendo por base a gama de fármacos utilizados como anti-hipertensivos que atuam através da redução da RVPT (MANCIA et al., 2007; SEGURA DE LA MORENA; GARCIA DONAIRE; RUILOPE URIOSTE, 2010) e que ESPV apresentou ação vasorrelaxante, objetivou-se avaliar se ESPV era capaz de promover efeito anti-hipertensivo. Para tal, foi realizado tratamento crônico de 28 dias através da administração de 75 e 150 mg/kg (v.o.) do ESPV em SHR, a PAS aferida de forma indireta a cada 7 dias, através da técnica de pletismografia de calda.

Estas doses foram estabelecidas de acordo com estudos sobre a toxicidade da PVA, nos quais foram observados que o tratamento por 28 dias (v.o.) de ratos com doses inferiores a 200 mg/kg de PVA não promoveu sinais tóxicos (DA SILVA et al., 2015).

Os resultados demonstraram que ESPV promoveu efeito anti-hipertensivo a partir do 14º dia após início do tratamento com maior eficácia na dose de 150 mg/kg, onde obteve-se valores de PAS semelhantes aos de ratos normotensos observado em outros estudos (ZHAO et al., 2013). De modo semelhante o extrato etanólico de PVA promoveu efeito anti-hipertensivo em ratos hipertensos por ablação cirúrgica renal (TELES et al., 2015). Entretanto, efeito menos eficaz, pois o extrato etanólico reduziu 20 mmHg, enquanto que o ESPV reduziu em 56 mmHg a pressão dos animais tratados. Deste modo, ESPV foi capaz de produzir um efeito anti-hipertensivo superior àqueles observados em SHR tratados com captopril, um bloqueador dos canais para cálcio utilizado como fármaco anti-hipertensivo, por outros autores (ZEMANCIKOVA; TOROK, 2009; XIE; ZHANG, 2012; ZHAO et al., 2013).

Visto que os SHR apresentam uma variedade de alterações cardiovasculares dependente do envelhecimento (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; ENGELMANN; VITULLO; GERRITY, 1987), objetivou-se avaliar se ESPV exerceria ação anti-hipertensiva também em animais cuja o estado hipertensivo não provocou alterações nos órgãos alvos da hipertensão. Desta forma, realizou-se o mesmo protocolo experimental em SHR com 11 semanas de idade, aqui referidos como Grupo jovem. No entanto, nenhum efeito sobre a PAS foi observado após tratamento de SHR jovens com ESPV. Provavelmente, o mecanismo pelo qual ESPV promove efeito anti-hipertensivo esteja associado às alterações observadas no envelhecimento do SHR (MATZ et al., 2000; CEZAR et al., 2015).

Entre as alterações fisiológicas associadas ao desenvolvimento da hipertensão, encontra-se a hipertrofia cardíaca e ventricular (ENGELMANN; VITULLO; GERRITY, 1987; PARK et al., 1997). Em humanos hipertensos e em SHR esta hipertrofia ocorre de forma lenta

e progressiva (PFEFFER; FROHLICH, 1973; HAN et al., 2015). Contudo, o tratamento com alguns anti-hipertensivos pode reduzir o desfecho desta complicação em ambos (CUTILLETTA et al., 1977; HALLBÄCK; WEISS, 1977; TRIPPODO; FROHLICH, 1981; NOLLY et al., 2015). Neste contexto, o principal tipo de hipertrofia cardíaca em função da HAS, caracteriza-se por um aumento da espessura da parede ventricular esquerda associada à elevação da massa cardíaca e por conseguinte uma redução na cavidade ventricular (GANAU et al., 1992).

Diante do exposto, realizou-se a morfometria do miocárdio após o tratamento com ESPV em SHR jovens e adultos através da relação dos pesos corporais com os respectivos pesos dos corações, além dos pesos e espessuras dos ventrículos esquerdos. A avaliação revelou que apenas em ratos adultos o ESPV, na dose de 150 mg/kg, impediu a hipertrofia ventricular esquerda, observada através da inibição do aumento da razão PCo/PC, além de redução das razões PVE/PC e EVE/PC.

O estado hipertrófico do coração caracteriza-se por ser uma resposta adaptativa aos aumentos de PAM com fins de reduzir o estresse na parede ventricular e desta forma manter o débito cardíaco em níveis normais, como observado nos SHR (PFEFFER; FROHLICH, 1973; FERRONE et al., 1979; SMITH; HUTCHINS, 1979). Diante do fato de que a hipertrofia pode evoluir à um quadro de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (HILL; OLSON, 2008; KEHAT; MOLKENTIN, 2010), a inibição da hipertrofia ventricular pela administração de 150 mg/kg do ESPV, reforça seu potencial terapêutico e demonstra que os efeitos cardiovasculares aqui observados, estão relacionados à alterações em função da idade dos animais, o que explica seus efeitos estarem presentes apenas no tratamento de SHR adultos.

Além de alterações cardíacas, o desenvolvimento da hipertensão no SHR e no humano leva à diversas desordens funcionais e estruturais nos vasos sanguíneos, onde destaca-se a disfunção endotelial (BARTON et al., 1997; CERNADAS et al., 1998; MATZ et al., 2000). Esta disfunção pode ser definida como a alteração de processos fisiológicos normais realizada pelo endotélio, o que inclui uma redução da suas propriedades anticoagulante e anti-inflamatória, a modulação do crescimento e remodelamento vascular, além de uma deficiência significativa no relaxamento vascular dependente endotelio (BERNATOVA et al., 2009). Desta forma, a disfunção endotelial é considerada como a incapacidade de artérias e arteríolas em dilatar totalmente em resposta a um estímulo apropriado, como por exemplo ao neurotransmissor Acetilcolina (ACh) (YOON et al., 2010).

Isto ocorre em função de que a ACh ao atuar em os receptores muscarínicos expressos na membrana endotelial (M_3), promove a fosforilação da enzima fosfolipase C que eleva as

concentrações de Ca^{2+} intracelulares que juntamente com a calmodulina fosforila a enzima NO-sintase (NOS), responsável pela síntese de NO a partir da conversão metabólica de L-arginina em L-citrulina (HUYNH; CHIN-DUSTING, 2006).

O NO é um mediador químico que apresenta papel fundamental na regulação e promoção da vasodilatação (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Pois, esta liberação de NO através do endotélio resulta em fosforilação direta de uma guanilil ciclase solúvel (GCs) na musculatura vascular lisa (SOMLYO, AVRIL V ; SOMLYO, ANDREW P, 1968) o que resulta no aumento do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (MURAD; BARBER, 2009). Este aumento nas concentrações de GMPc ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) com consequente hiperpolarização e vasodilatação (MARTIN et al., 2000).

Uma vez que ESPV foi capaz de promover hipotensão e vasorrelaxamento em artéria mesentérica de SHR, e sobretudo um efeito anti-hipertensivo, além de impedir a hipertrofia ventricular apenas em animais cuja disfunção endotelial estava presente, objetivou-se avaliar se o ESPV promoveria uma melhora na função vascular de SHR adultos, modelo e idade que apresenta relaxamento endotelial comprometido (PUZSEROVA et al., 2014).

Para isto, após o tratamento por 28 dias com ESPV nas mesmas doses na qual o efeito anti-hipertensivo foi observado, curvas concentração-resposta para ACh foram obtidas. Os resultados revelaram uma melhora significativa no vasorrelaxamento dependente de concentração para ACh em SHR tratados com ESPV nas doses de 150 e 75 mg/kg. Estes dados corroboram com o proposto de que ESPV promover uma melhora no relaxamento vascular na presença de disfunção vascular (CERNADAS et al., 1998; EHLERS et al., 2011)

Com o objetivo de confirmar se o efeito observado no relaxamento vascular após o tratamento com ESPV, deu-se em função de uma melhora na função endotelial, realizou-se uma curva-concentração resposta para o nitroprussiato de sódio (NPS), um nitrovasodilatador. Pois, em contrastes com os vasodilatadores dependentes do endotélio, nitrovasodilatadores causam relaxamento do tecido vascular, independente do endotélio, ao ativar a formação de GMPc em células musculares lisas adjacentes e liberar NO diretamente (KATSUKI et al., 1977; CERNADAS et al., 1998). Os resultados demonstraram que o tratamento com ESPV não promoveu nenhuma alteração significativa e que não houve alteração na função vascular relaxante independente do endotélio em comparação ao relaxamento obtido por outros experimentos (PUZSEROVA; KOPINCOVA; BERNATOVA, 2010; PUZSEROVA et al., 2014).

Diante do exposto, resolveu-se avaliar a participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio nos efeitos induzidos pelo ESPV, uma vez que o efeito anti-hipertensivo e anti-hipertrofico só foram observados no grupo de SHR adultos tratados com 150 mg/kg, os demais experimentos não foram realizados com o grupo Adulto 75.

Para isto, efetuamos uma curva concentração-resposta para ACh em anéis de SHR adultos pré-incubados com L-NAME, um bloqueador inespecífico e competitivo da enzima NOS. Nestas condições, a presença do L-NAME antagonizou completamente o relaxamento da ACh. Embora, no presente trabalho a atividade da NOSe não tenha sido mensurada, estudos indicam que em SHR adultos há uma redução significativa na atividade desta enzima (PUZSEROVA et al., 2014), e portanto, os dados obtidos sugerem que a melhora no vasorrelaxamento em respostas às concentrações de ACh em SHR tratados com ESPV, além de ser dependente de endotélio, podem ocorrer via NOSe.

Além do NO, o FHDE e FCDE são responsáveis pela regulação do tônus vascular, nos SHR (BERNATOVA et al., 2009). Na HAS observada humanos os FCDE mediados pelos derivados da enzima ciclo-oxigenase (COX), encontram-se elevados (BARTON et al., 1997). Desta forma, estes fatores provocam danos ao relaxamento dependente de endotélio em função das idade. Para avaliar a possível participação do FHDE, foi realizado uma nova curva concentração-resposta à ACh em anéis de SHR tratados com ESPV pré-incubados com L-NAME e INDO, um bloqueador não seletivo da COX. A curva concentração-reposta, não apresentou alterações significativas, corroborando com os dados anteriores de que a melhora do relaxamento vascular dependente do endotélio funcional em SHR adultos ocorreu via NOSe.

7 CONCLUSÕES

Os estudos acerca com extrato de própolis vermelha alagoana sugere que:

- A formulação gastroresistente encapsulado ao extrato seco (ESPV), preserva os constituintes químicos presentes no extrato clorofórímico, utilizado na formulação;
- A presença de isoflavonas no ESPV eleva seu potencial terapêutico para doenças que acometem o SCV;
- O tratamento agudo de SHR com ESPV promove hipotensão sem alterar a frequência cardíaca;
- O efeito hipotensor do ESPV parece ocorrer devido à uma redução da resistência vascular periférica através de ações no endotélio vascular;
- O tratamento crônico com ESPV impede a hipertrofia ventricular esquerda em SHR;
- O ESPV promove efeito anti-hipertensivo apenas em SHR adultos com alterações nas funções cardíacas e vasculares;
- Este efeito ant-hipertensivo, deve-se, possivelmente, a uma melhora na disfunção endotelial via NOSe.

REFERÊNCIAS

ABERNETHY, D. R.; SOLDATOV, N. M. Structure-functional diversity of human L-type Ca²⁺ channel: perspectives for new pharmacological targets. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 724-728, 2002.

ABU-MELLAL, A.; KOOLAJI, N.; DUKE, R.; TRAN, V.H; DUKE, C.C. Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 77, p. 251–259, 2012.

ADELMANN, J. et al. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 174-178, 2007.

ADUA, E. et al. Effect of Neutrophils on Nitric Oxide Production from Stimulated Macrophages. **Iran Journal Immunology**, v. 12, n. 2, p. 94-103, Jun 2015.

AKAZAWA, H. et al. Angiotensin II type 1 and type 2 receptor-induced cell signaling. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 17, p. 2988-95, 2013.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8 Suppl B, p. 9-20, 2007.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 114-117, 2005a.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005b.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, p. 23-28, 2009.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. Academic Press, 1996. ISBN 0080527892.

BARNES, J. **High performance liquid chromatography**. 2. John Wiley & Sons, 1992. ISBN 0471931152.

BARTON, M. et al. Anatomic Heterogeneity of Vascular Aging: Role of Nitric Oxide and Endothelin. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 817-824, 1997.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 90, n. 1, p. 278-81, 1992.

BERNATOVA, I. et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. **Journal of Hypertension Supplement**, v. 27, n. 6, p. S27-31, 2009.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 766, n. 1, p. 31-43, 1995.

BERRIDGE, M. J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1261-1296, 2016.

BIANCHI, G. et al. Genetic and experimental hypertension in the animal model-similarities and dissimilarities to the development of human hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 8 Suppl 5, p. S64-70, 1986.

BRUNINI, T.; FERREIRA, M. **Farmacologia Cardiovascular**: Rio de Janeiro: Rúbio 2007.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546-50, 2013.

BURDOCK, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CALDERONE, V. et al. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 370, n. 4, p. 290-8, 2004.

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

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. The role of phenolic compounds in the fight against cancer-a review. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 8, p. 1236-58, 2013.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, 2007.

CAWLEY, S. M. et al. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. **Cell Signal**, v. 19, n. 5, p. 1023-33, 2007.

CERNADAS, M. R. et al. Expression of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases in the Vascular Wall of Young and Aging Rats. **Circulation Research**, v. 83, n. 3, p. 279-286, 1998.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p. 417-423, 2002.

CEZAR, M. D. et al. Early Spironolactone Treatment Attenuates Heart Failure Development by Improving Myocardial Function and Reducing Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1453-66, 2015.

CHEN, C., WU, C.; SHY, H., LIN, J. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 503-506, 2003.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **American Journal of Physiology**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. H74-81, 1995.

CORRADINI, E. et al. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Products Research**, v. 25, n. 5, p. 469-95, 2011.

CRANE, E. **Bees and beekeeping: science, practice and world resources**. Heinemann Newnes, 1990. ISBN 0434902713.

CRESTANI, S. et al. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vascular Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 57-63, 2009.

CUTILLETTA, A. F. et al. Development of left ventricular hypertrophy in young spontaneously hypertensive rats after peripheral sympathectomy. **Circulation Research**, v. 40, n. 4, p. 428-34, April 1, 1977 1977.

DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

DA SILVA, R. O. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, p. 66-71, 2015.

DAHL, L. K.; HEINE, M.; TASSINARI, L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. **Nature**, v. 194, p. 480-2, May 5 1962.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DE FATIMA, A.B et al. Experience of hypertensive patients with self-management of health care. **Journal of Advanced Nursing**, 2016.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 357, 2015.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 274, n. 3 Pt 2, p. H794-800, Mar 1998.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2016.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc Research**, v. 39, n. 1, p. 89-105, 1998.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731-7, 2011.

DROOGMANS, G.; CASTEELS, R. Electromechanical and Pharmacomechanical Coupling in Vascular Smooth Muscle. **Physiology and Pathophysiology of the Heart**, Springer, ISBN: 978-1-4757-1171-4

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 253-71, 2003.

DURAND, M. J.; GUTTERMAN, D. D. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. **Microcirculation**, v. 20, n. 3, p. 239-247, 2013.

DUSCHEK, S.; WERNER, N. S.; REYES DEL PASO, G. A. The behavioral impact of baroreflex function: a review. **Psychophysiology**, v. 50, n. 12, p. 1183-93, 2013.

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557-562, 2008.

EDGELL, H. et al. Peripheral chemoreceptor control of cardiovascular function at rest and during exercise in heart failure patients. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 7, p. 839-48, 2015.

EHLERS, P. I. et al. High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1353-63, 2011.

ENGELHARDT, H. **High performance liquid chromatography**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 3642670644.

ENGELMANN, G. L.; VITULLO, J. C.; GERRITY, R. G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research** v. 60, n. 4, p. 487-94, Apr 1987.

FAZAN JR, R.; SILVA, V.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 19-29, 2001.

FERNANDES, F. H. et al. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v. 62, p. 20-26, 2014.

FERREIRA, R. S. D. S.; GRAÇA, L. C. C. D.; CALVINHO, M. D. L. S. E. Adesão ao Regime Terapêutico de Pessoas com Hipertensão Arterial em Cuidados de Saúde Primários. **Revista de Enfermagem Referência**, v. serIV, p. 7-15, 2016.

FERRONE, R. A. et al. Comparison of hemodynamics in conscious spontaneous and renal hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 236, n. 3, p. H403-8, 1979.

FOLKOW, B. et al. Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 32, p. Suppl 1:2-16, 1973.

FROHLICH, E. D. The adrenergic nervous system and hypertension state of the art. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 52, n. 6, p. 361-8, 1977.

FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-42, 2013.

FRY, C. H. The Human Cardiovascular System. Facts and Concepts. **Journal of Anatomy**, v. 132, n. Pt 3, p. 437-437, 1981.

GANAU, A. et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 19, n. 7, p. 1550-8, 1992.

GAUR, R. et al. In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 415-422, 2014.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. Propolis. **Phytothérapie**, v. 7, n. 2, p. 100-105, 2009.

GILANI, G. S. et al. Effects of source of protein and supplementary extracted isoflavones and anthocyanins on longevity of Stroke-prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP) rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 335-41, 2009.

GKALIAGKOUSI, E.; GAVRIILAKI, E.; DOUMA, S. Effects of acute and chronic exercise in patients with essential hypertension: benefits and risks. **American Journal of Hypertension**, v. 28, n. 4, p. 429-39, 2015.

GOLDBLATT, H. et al. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 59, n. 3, p. 347-79, 1934.

GOLDFARB, D. A.; NOVICK, A. C. The renin-angiotensin system: revised concepts and implications for renal function. **Urology**, v. 43, n. 4, p. 572-83, 1994.

GRIEGER, F. Spontaneous hypertension in animals. Review of literature. **Dtsch Gesundheitsw**, v. 26, n. 33, p. 1529-35, 1971.

GUS, I.; HARZHEIM, E.; ZASLAVSKY, C.; MEDINA, C.; GUS, M. Prevalência, Reconhecimento e Controle da Hipertensão Arterial Sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.83, p. 424-428, 2004.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-46, 2006.

HALLBÄCK, M.; WEISS, L. Mechanisms of Spontaneous Hypertension in Rats. **Medical Clinics of North America**, v. 61, n. 3, p. 593-609, 1977.

HAN, J. C. et al. Does reduced myocardial efficiency in systemic hypertensive-hypertrophy correlate with increased left-ventricular wall thickness? **Hypertension Research**, v. 38, n. 8, p. 530-8, 2015.

HANSEN, P. B. Functional importance of T-type voltage-gated calcium channels in the cardiovascular and renal system: news from the world of knockout mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.**, v. 308, n. 4, p. R227-37, 2015.

HENRY, J. P.; MEEHAN, J. P.; STEPHENS, P. M. The use of psychosocial stimuli to induce prolonged systolic hypertension in mice. **Psychosomatic Medicine**, v. 29, n. 5, p. 408-32, 1967.

HILL, J. A.; OLSON, E. N. Cardiac plasticity. **The New England Journal of Medicine** v. 358, n. 13, p. 1370-80, 2008.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 153-63, 2008.

HOFFMAN, T. M. E. B. B. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. In: MCGRAW-HILL (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. Rio de Janeiro, 2015. cap. 27, p.745-789.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological reviews**, v. 76, n. 4, p. 967-1003, 1996.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.Q.; HU, F. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, n. 19, p. 19610-19632, 2014.

HUGEL, H. M. et al. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220-31, 2016.

HUYNH, N. N.; CHIN-DUSTING, J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1-2, p. 1-8, 2006.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, 1987.

INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1293-6, 2014.

ISLAM, S.M. et al. Prevalence of risk factors for hypertension: A cross-sectional study in an urban area of Bangladesh. **Global Cardiology Science & Practice**, v. 20, n.4, p. 43-52, 2015.

ITOH, T. Pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle cells--an overview. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 1-9, 1991.

JACKMAN, K. A.; WOODMAN, O. L.; SOBEY, C. G. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 26, p. 2824-30, 2007.

JIANG, F. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 7, p. 413-26, 2014.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation Research**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, 1976.

KAREMAKER, J. M.; WESSELING, K. H. Variability in cardiovascular control: the baroreflex reconsidered. **Cardiovascular Engineering** v. 8, n. 1, p. 23-9, 2008.

KATSUKI, S. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 1977.

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, v. 122, n. 25, p. 2727-35, 2010.

KOEPPEN, B. M. S., BRUCE A. **Berne & Levy - Fisiologia**. 6. 2009.

KRIEGER, E. M. Neurogenic Hypertension in the Rat. **Circulation Research**, v. 15, p. 511-21, 1964.

KUBOTA, Y. et al. Anti-hypertensive effects of Brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31 Suppl 2, p. S29-30, 2004.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-2, 2004.

LA MORENA, J.S.; DONAIRE, G. J. A.; URIOSTE, L. M. R. New therapeutic strategies to improve control of arterial hypertension and simplify the regimen of drug treatment. **Medicina Clínica**, v. 134, n. 14, p. 635-42, 2010.

LACINOVA, L. Voltage-dependent calcium channels. **General Physiology and Biophysics**, v. 24 Suppl 1, p. 1-78, 2005.

LAIS, L. T. et al. Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. **Blood Vessels**, v. 14, n. 5, p. 277-84, 1977.

LAN, X. et al. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1794-801, 2016.

LEDINGHAM, J. M.; PELLING, D. Cardiac output and peripheral resistance in experimental renal hypertension. **Circulation Research**, v. 21, n. 1, p. Suppl 2:187+, 1967.

LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 528757, 2015.

LIU, H. et al. (2R,3S)-Pinobanksin-3-cinnamate improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 3, p. 358-65, 2015.

LIU, Y. F.; BAI, Y. Q.; QI, M. Daidzein attenuates abdominal aortic aneurysm through NF-kappaB, p38MAPK and TGF-beta1 pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 955-62, 2016.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 2, p. 148-58, 2015.

LÓPEZ, B. G.-C.; SAWAYA, A. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. In: (Ed.). **Natural products: Structure, bioactivity and applications**: Nova Science Publishers, 2012. cap. 4, p.83-96.

LÓPEZ, B. G.-C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174-180, 2014.

LU, K.; DING, R.; WANG, L.; WU, S.; CHEN, J.; HU, D. Association between prevalence of hypertension and components of metabolic syndrome: the data from Kailuan community. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.37, n.4, 303-307, 2015.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Review**, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

LUNGKAPHIN, A. et al. Pinocembrin reduces cardiac arrhythmia and infarct size in rats subjected to acute myocardial ischemia/reperfusion. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 10, p. 1031-7, 2015.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.

MADLALA, H. P. et al. Vascular Endothelium-Dependent and Independent Actions of Oleanolic Acid and Its Synthetic Oleanane Derivatives as Possible Mechanisms for Hypotensive Effects. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0147395, 2016.

MANCIA, G. et al. Guidelines for the management of arterial hypertension. **Revista Española de Cardiología** v. 60, n. 9, p. 968.e1-94, 2007.

MARCUCCI, M., C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. et al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 1-2, p. 76-81, 2000.

MARTIN, D. et al. Understanding the cardiovascular actions of soy isoflavones: potential novel targets for antihypertensive drug development. **Cardiovascular Hematol Disord Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 297-312, 2008.

MARTIN, E. et al. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. **Semin Perinatology**, v. 24, n. 1, p. 2-6, 2000.

MARUYAMA, H. et al. Antihypertensive Effects of Flavonoids Isolated from Brazilian Green Propolis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.

MATSUMOTO, E. et al. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16. **Genes to Cells**, v. 18, n. 7, p. 544-553, 2013.

MATZ, R. L. et al. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 2, p. 303-311, 2000.

MCBRYDE, F. D. et al. Angiotensin II-based hypertension and the sympathetic nervous system: the role of dose and increased dietary salt in rabbits. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 831-40, 2007.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MICHEL, J. B. Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system. **Pathologie Biologie**, v. 46, n. 3, p. 181-9, Mar 1998.

MIDORIKAWA, K. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 6, p. 366-373, 2001.

MING, X. et al. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Life Science**, v. 136, p. 36-41, 2015.

MMA. Biodiversidade Brasileira. 2016. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> .

MOHRMAN, D. E. **Fisiologia Cardiovascular**, 6a. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOURA, S. A. L. D. et al. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 7, 2011.

MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. **Nature**, v. 344, n. 6266, p. 541-4, 1990.

MULVANY, M. J.; HANSEN, O. K.; AALKJAER, C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. **Circulation Research**, v. 43, n. 6, p. 854-64, 1978.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO(+)](3+) in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111-7, 2012.

MUNOZ-DURANGO, N. et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, 2016.

MURAD, F. Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. **Advances in Pharmacology**, v. 26, p. 1-5, 1994.

MURAD, F.; BARBER, R. A hypothesis about cellular signaling with nitric oxide in the earliest life forms in evolution. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1325-7, 2009.

NAKAJIMA, Y. et al. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation Stress, with a gene-expression analysis. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1431-1438, 2009.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 379-86, 2008.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. **Journal of apicultural research**, v. 42, n. 4, p. 53-56, 2003.

NELSON, M. et al. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 259, n. 1, p. C3-C18, 1990.

NICKEL, J. et al. Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of Chenopodium quinoa Willd grains. **Food Chem**, v. 209, p. 139-43, 2016.

NILSSON, H.; JENSEN, P.; MULVANY, M. Minor role for direct adrenoceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. **Journal of vascular research**, v. 31, n. 6, p. 314-321, 1994.

NOLLY, M. B. et al. Cardiac hypertrophy reduction in SHR by specific silencing of myocardial Na(+)/H(+) exchanger. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 9, p. 1154-60, 2015.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-8, 2012.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em Artermia salina. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, p. 282-93, 1963.

OKAMOTO, K. et al. Pharmacodynamic studies on the cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 30, n. 8, p. 987-1007, 1966.

OKAMOTO, K. et al. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 30, n. 6, p. 703-16, 1966.

ONDRIAS, K. et al. Pinobanksin inhibits peroxidation of low density lipoprotein and it has electron donor properties reducing alpha-tocopherol radicals. **Pharmazie**, v. 52, n. 7, p. 566-7, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, O. Global Health Observatory Data Repository. 2008. Disponível em: < (<http://apps.who.int/gho/data/view.main>) >.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. A Global Brief on Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis. 2013. Disponível em: < <http://www.thehealthwell.info/node/466541> >.

OSTROM, R. S. et al. Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 983-92, 2002.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-6, 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, 1987.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K. et al. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000.

PARK, Y. K. et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PARK, Y. K. et al. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, n. 5, p. 1126-32, 1997.

PEREIRA, A. S. et al. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5226-30, 2000.

PFEFFER, M. A.; FROHLICH, E. D. Hemodynamic and myocardial function in young and old normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 32, p. Suppl 1:28-38, 1973.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2011.

PIMENTA, H. C. et al. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Oral Research**, v. 29, p. 1-6, 2015.

PICCINELLI, A.N.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 59, p. 6484-6491, 2011

POPOVA, M. P. et al. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1262-1271, 2009.

PRISANT, L. M. et al. Novel drug-delivery systems for hypertension. **American Journal of Medicine**, v. 93, n. 2a, p. 45s-55s, 1992.

PROVOOST, A. P.; DE JONG, W. Differential development of renal, DOCA-salt, and spontaneous hypertension in the rat after neonatal sympathectomy. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 1, n. 2, p. 177-89, 1978.

PUZSEROVA, A. et al. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. v. 2014, p. 658479, 2014.

PUZSEROVA, A.; KOPINCOVA, J.; BERNATOVA, I. Endothelial (dys)function in the experimental model of primary hypertension. **Cesk Fysiol**, v. 59, n. 1, p. 4-14, 2010.

RANGEL-HUERTA, O. D. et al. A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5177-5216, 2015.

RASUL, A. et al. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 379850, 2013.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 267878, 2013.

RODRIGUES, G. J. et al. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 193-8, 2012.

SALANTINO, A.; TEXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTANA, L. C. et al. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Products Research**, v. 28, n. 5, p. 340-3, 2014.

SARTORI, G. et al. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2012.

SEGAL-LIEBERMAN, G.; ROSENTHAL, T. Animal models in obesity and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 3, p. 190-5, Jun 2013.

SFORCIN, J. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHEPPARD, W., S. et al. Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. **Apidologie**, v. 22, n. 6, p. 643-652, 1991.

SHRIVASTAVA, S.R.; SHRIVASTAVA, P.S.; RAMASAMY, J. The determinants and scope of public health interventions to tackle the global problem of hypertension. *Internacional Journal of Preventive Medicine*, v.5, n.7, 807-812, 2014.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 206439, 2015.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SIMÕES, C. M. O. S., E. P.; GOSMANN, G. **Da planta ao medicamento**. 6. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2007.

SMITH, C. A. et al. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂ : role of carotid body CO₂. **Journal Physiology**, v. 593, n. 18, p. 4225-43, 2015.

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. **Hypertension**, v. 1, n. 5, p. 508-17, 1979.

SBC. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 107, n. 3, Supl. 3, 2016.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal Physiology**, v. 522 Pt 2, p. 177-85, 2000.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, n. 1, p. 129-45, 1968.

SPARKS, M. A. et al. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1201-1228, 2014.

STERLEY, T. L.; HOWELLS, F. M.; RUSSELL, V. A. Genetically determined differences in noradrenergic function: The spontaneously hypertensive rat model. **Brain Research**, v. 1641, n. Pt B, p. 291-305, 2016.

SUN, T.; LIU, R.; CAO, Y. X. Vasorelaxant and antihypertensive effects of formononetin through endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 8, p. 1009-18, 2011.

SUN, T. et al. Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT_{2A/1B} receptors and alpha₁-adrenoceptors in spontaneously rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 241-9, 2013.

SZLISZKA, E. et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 13, 2013.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 4, p. 941-53, 2011.

TAN, J. W.; KIM, M. K. Neuroprotective Effects of Biochanin A against beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via a Mitochondrial-Dependent Apoptosis Pathway. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

TAZAWA, S. et al. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2, p. 201-5, 2016.

TE RIET, L. et al. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 960-75, 2015.

TEIXEIRA, É. W. et al. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, 2010.

TEIXEIRA, É. W. et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TELES, F. et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TORETI, V. C. et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 13, 2013.

TRACANNA, M. I. et al. Anti-leishmanial, anti-inflammatory and antimicrobial activities of phenolic derivatives from *Tibouchina paratropica*. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 393-7, 2015.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309-19, 1981.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-54, 2006.

VANHOUTTE, P. M.; Vascular biology: Old-timer makes a comeback. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 213-16, 1998.

UEHARA, E. U.; SHIDA BDE, S.; DE BRITO, C. A. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. **Inflammation Research**, v. 64, n. 11, p. 845-52, 2015.

URUSHISAKI, T. et al. Caffeoylquinic Acids Are Major Constituents with Potent Anti-Influenza Effects in Brazilian Green Propolis Water Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 7, 2011.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacological Review**, v. 39, n. 3, p. 163-96, 1987.

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WANG, H. P. et al. Mechanisms underlying biochanin A-induced relaxation of the aorta differ between normotensive and hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 9, p. 802-7, 2006.

WANG, H. P. et al. Endothelium-independent vasorelaxant effect of the phyto-oestrogen biochanin a on rat thoracic aorta. **Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.**, v. 3, p. 2244-7, 2005.

WANG, H. P. et al. Endothelium-independent vasorelaxation of plant-derived estrogen biochanin A and its mechanism in rat aortic rings. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 22, n. 3, p. 274-7, 2006.

WARSHAW, D. M.; MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Mechanical and morphological properties of arterial resistance vessels in young and old spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 45, n. 2, p. 250-9, 1979.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Progress Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 365-91, 2001.

XIE, Y.; ZHANG, W. Antihypertensive activity of Rosa rugosa Thunb. flowers: angiotensin I converting enzyme inhibitor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 562-6, 2012.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. **Experimental and Genetic Models of Hypertension: Handbook of Hypertension**, p. 224, 2013.

YOON, H. J. et al. Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 2, p. 119-23, 2010.

ZAMPONI, G. W. et al. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Review**, v. 67, n. 4, p. 821-70, 2015.

ZEMANCIKOVA, A.; TOROK, J. Effect of chronic nifedipine treatment on blood pressure and adrenergic responses of isolated mesenteric artery in young rats with developing spontaneous hypertension. **Physiology Research**, v. 58, n. 6, p. 921-5, 2009.

ZHAO, W. et al. Antihypertensive effects of extract from *Picrasma quassiodes* (D. Don) Benn. in spontaneously hypertensive rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 187-92, 2013.

ZHU, X. M. et al. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 160-5, 2007.