



Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de ciências exatas e biológicas – UFOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Avaliação do efeito anti-hipertensivo de uma formulação nano-estruturada contendo extrato de *Baccharis dracunculifolia* em ratos Wistar com sobrecarga de sódio

Marcos Adriano Carlos Batista

Ouro Preto

2021

Avaliação do efeito anti-hipertensivo de uma formulação nano-estruturada contendo extrato de *Baccharis dracunculifolia* em ratos Wistar com sobrecarga de sódio

Marcos Adriano Carlos Batista

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito à obtenção de título de mestre em ciências farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Química e farmacologia de substâncias bioativas

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Professor Dr. Leonardo Máximo Cardoso

Ouro Preto

Instituto de ciências exatas e biológicas – UFOP

Outubro de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B333a Batista, Marcos Adriano Carlos.

Avaliação do efeito anti-hipertensivo de uma formulação nano-estruturada contendo extrato de *Baccharis Dracunculifolia* em ratos Wistar com sobrecarga de sódio. [manuscrito] / Marcos Adriano Carlos Batista. - 2021.

85 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Medicamentos fitoterápicos. 2. Hipertensão. 3. Sódio. 4. *Baccharis dracunculifolia*. I. Cardoso, Leonardo Máximo. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.322

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcos Adriano Carlos Batista

"Avaliação do Efeito Anti-Hipertensivo de Uma Formulação Nano-Estruturada Contendo Extrato de *Baccharis dracunculifolia* em Ratos Wistar com Sobrecarga de Sódio"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 22 de outubro de 2021.

Membros da banca

Prof. Dr. Leonardo M. Cardoso - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Eduardo Colombari - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Prof. Dr. Geraldo Celio Brandao - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Leonardo M. Cardoso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 18/03/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Máximo Cardoso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/03/2022, às 12:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0295762** e o código CRC **3920D6FB**.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Airton Batista e Maria Batista por estarem sempre ao meu lado e a minha noiva Mariane Santos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS



Reitora

Prof. Cláudia Aparecida Marlière de Lima

Vice-Reitor

Prof. Hermínio Arias Nalini Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Sérgio Francisco de Aquino

Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Renata Guerra de Sá Cota

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Jacqueline de Souza

AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES

A Deus que por mais uma vez me fortaleceu para chegar ao fim desse desafio.

A minha família em especial meus pais e minha irmã pelo incentivo ao longo desse período.

Aos meus amigos presentes no qual pude compartilhar momentos felizes e tristes ao decorrer dessa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso, meus mais sinceros agradecimentos. Pela oportunidade e por confiar em meu trabalho. Por ter acrescentado muito em minha trajetória seja pelo ensinamento, seja por me ensinar a manter o foco nos meus objetivos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular, pela agradável convivência e por tornar os dias mais tranquilos, em especial Daiane Braga e ao meu amigo Flavio Freitas.

Aos colegas do CiPharma.

Centro de Ciência Animal – CCA – UFOP

Laboratório de Hipertensão – ICEB – UFOP

Laboratório de Fitotecnologia – EFAR – UFOP

Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas - DEQUI – UFOP

Laboratório Multiusuário – EFAR – UFOP

Laboratório de Neurobiologia e Biomateriais – ICEB – UFOP

RESUMO

A alta ingestão de sódio (Na^+) pode estar ligada ao desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial, que é conhecida como hipertensão sódio-dependente. Os pacientes hipertensos podem fazer uso de medicamentos disponíveis para controle da pressão arterial. Entretanto, existem pacientes que são resistentes ou até mesmo refratários aos tratamentos disponíveis no mercado. A Própolis verde é um produto natural com reconhecida ação anti-hipertensiva cuja fonte botânica é constituída, principalmente, de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo). Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação anti-hipertensiva associada a uma formulação nano-estruturada contendo extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (DC) em ratos Wistar com hipertensão sódio-dependente. Para tanto, o extrato etanólico de DC foi preparado a partir de folhas de DC por maceração sucessiva. Após o processo de maceração, o etanol foi removido em rotaevaporador e o extrato foi seco em estufa a $\pm 40^\circ \text{C}$, obtendo-se assim o extrato etanólico de DC (EtOH-DC). Este extrato foi utilizado para preparo da formulação nano-estruturada (nDC) e análises para caracterização fitoquímica. Os testes biológicos foram conduzidos em ratos Wistar adultos, utilizando um modelo de hipertensão sódio-dependente em que a água de beber é substituída por salina hipertônica (2% NaCl) durante o período de 8 dias. O tratamento com nDC 12, 25 e 50 mg/kg foi realizado a partir do 4º dia sob salina hipertônica ou água. Ao final, os animais foram instrumentados para medida direta da pressão arterial. Os resultados mostraram que o modelo teve um aumento da pressão arterial média (PAM) de 13 ± 3 mmHg em relação ao seu controle. A administração de nDC 25 mg/kg reduziu a PAM do modelo (19 ± 2 mmHg) sem alterar a PAM de ratos controle. Os resultados mostram que a administração de nDC foi eficaz em reverter o aumento de pressão ocasionado pela alta ingestão de sódio sem demonstrar efeito hipotensor.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; sódio; hipertensão; formulação nano-estruturada e fitoterápicos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ang II – Angiotensina II

AT₁ – Receptor específico para angiotensina II tipo 1

AT₂ – Receptor específico para angiotensina II tipo 2

AVP – Arginina vasopressina

BRR – Barorreflexo

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

CT - Controle

CVOs – Órgãos circunventriculares

DC – *Baccharis dracunculifolia*

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EPM – Erro padrão da média

EtOH-DC – Extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

g – Grama

GAE – Equivalente de ácido gálico

HA – Hipertensão arterial

HF – Alta frequência

HR – Frequência cardíaca

HS – Ratos submetidos a dieta com alto teor de sódio

IC – Intervalo cardíaco

IML – Bulbo intermediolateral

IS – Intervalo sistólico

kg – Quilograma

LABMASSAS - Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LF – Baixa frequência

LFEC – Laboratório de fisiologia endócrina e cardiovascular

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MM – Massa molecular

mmHg – Milímetro de mercúrio

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

nDC – Formulação nano-estruturada de *Baccharis dracunculifolia*

nm – Nanômetros

OCVs – Órgãos circunventriculares

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVLT – Órgão vasculoso da lâmina terminal

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PAP – Pressão arterial pulsátil

PDI – Índice de polidispersão

PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo

QE – Equivalente de quercetina

RMSSD – Raiz quadrada média das diferenças sucessivas

RT – Tempo de retenção

RVLM – Bulbo rostro ventrolateral

RVP – Resistência vascular periférica

SFO – Órgão subfornical

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SNC – Sistema nervoso central

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

V_{1a} – Receptor específico para arginina vasopressina tipo 1a

V_{1ant} - β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepionyl¹,O-me-Tyr²,Arg⁸-vasopressin

Vh – Veículo

VLf – Muito baixa frequência

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis mecanismos de ação do <i>Apium graveolens</i> e <i>Achillea wilhelmsii</i> na redução da pressão arterial	7
Figura 2: Divisão dos grupos e relação dos ensaios biológicos realizados nesse estudo. Formulação nano-estruturada sem conter o EtOH-DC (veículo); formulação nano-estruturada contendo o EtOH-DC (nDC).	17
Figura 3: Protocolo experimental.	18
Figura 4: Sistema projetado para aferir diretamente a pressão arterial dos animais.	18
Figura 5: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 12,5 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05.....	25
Figura 6: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05.....	25
Figura 7: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 50 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05.....	26

Figura 8: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 12,5 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 12,5 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC P<0,05.....27

Figura 9: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 25 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC P<0,05.....27

Figura 10: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 50 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 50 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC P<0,05.28

Figura 11: Pressão arterial média em repouso (PAM; a) e frequência cardíaca (HR; b) dos ratos HS e CT veículo e os ratos HS e CT tratados com nDC 12,5, 25 e 50 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey; * diferença entre HS Vh P<0,05.....29

Figura 12: Pressão arterial média em repouso (PAM; a) e frequência cardíaca (HR; b) dos ratos HS veículo, HS tratado com EtOH-DC na dose 25 mg/kg formulado em água e HS tratados com nDC na dose de 25 mg/kg. Círculos dispersos (HS Vh), triângulos dispersos (HS DC ÁGUA) e quadrados dispersos (HS- nDC 25 mg/kg) representam valores individuais e as barras

representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey; * entre HS Vh e HS DC ÁGUA P<0,05..... 30

Figura 13: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹,O-me-Tyr²,Arg⁸-vasopressin (V_{lant}) 10 μ g/kg nos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. A injeção de V-Pant 10 μ g/kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido a injeção do V_{lant} foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; P <0,05.....31

Figura 14: Efeitos cardiovasculares da administração intravenosa de losartana 10 mg/ nos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. A administração de losartana 10 mg/kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido a administração do losartana foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; P <0,05..... 32

Figura 15: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{lant} 10 μ g/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 12,5 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh P<0,05. 33

Figura 16: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{lant} 10 μ g/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 25 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras

representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh P<0,05.

.....34

Figura 17: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{1ant} 10 µg/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 50 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como ΔMAP (b) e ΔHR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh P<0,05.

.....35

Figura 18: Os espectros para as séries temporais do IC foram obtidos pelo software Cardioseries (v2.4) e a variabilidade do IC no domínio da frequência foi dividida em três bandas principais de frequências, muito baixa frequência – VLF (b); baixa frequência – LF (c) e alta frequência – HF (d). A potência média foi calculada para cada banda e os dados expressos como a porcentagem da potência total no espectro. Já a raiz quadrada da média das diferenças sucessivas (RMSSD) expressa em (ms) foi realizada para calcular a variabilidade do IC no domínio do tempo (a). E a relação entre LF/HF também foi demonstrada no painel E. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50 mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; P <0,05.36

Figura 19: Os espectros para as séries temporais do IS foram obtidos pelo software Cardioseries (v2.4) e a variabilidade do IS no domínio da frequência foi dividida em três bandas principais de frequências, muito baixa frequência – VLF (a); baixa frequência – LF (b) e alta frequência – HF (c). A potência média foi calculada para cada banda e os dados expressos como a porcentagem da potência total no espectro. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50

mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; P <0,05.37

Figura 20: O ganho barorreflexo espontâneo também foi calculado pelo software Cardioseries (v2.4) com base nos dados do IC e IS. O ganho barorreflexo espontâneo total (a) expresso em segundos (s); alto ganho do barorreflexo (b) e baixo ganho barorreflexo (c). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50 mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; P <0,05.38

Figura 21: Medidas de peso, ingestão de líquido, ração e volume urinário dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Peso corporal dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (a); ingestão de líquido dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (b); ingestão de ração dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (c) e volume urinário ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (d). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; * diferente de HS VH e HS nDC P <0,05.39

Figura 22: Balanço de líquido dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; * diferente de HS VH e HS nDC P <0,05.40

Figura 23: Ingestão de sódio dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; * diferente de HS VH e HS nDC P <0,05.41

Figura 24: Volume circulante dos ratos submetidos a técnica de Azul de Evans. Volume plasmático (a); hematócrito (b) e volume de sangue (d). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; P <0,05.42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fitoterápicos com efeitos anti-hipertensivos	10
Tabela 2: Teor de compostos fenólicos e flavonoides.....	21
Tabela 3: Compostos voláteis identificados na fração hexânica do ETOH-DC. Tempo de retenção (RT); Massa molecular (MM); área apresentada pelo composto no espectro (%); percentual do composto no ETOH-DC, calculado pela área (%) e o rendimento total do ETOH-DC; estruturas químicas reproduzidas no software ACD/Labs versão D05E41.....	22
Tabela 4: Compostos voláteis identificados na fração hidrometanólica do ETOH-DC. Tempo de retenção (RT); Massa molecular (MM); área apresentada pelo composto no espectro (%); percentual do composto no ETOH-DC, calculado pela área (%) e o rendimento total do ETOH-DC; estruturas químicas reproduzidas no software ACD/Labs versão D05E41.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Hipertensão arterial	2
2.2 Hipertensão sódio-dependente e modelos experimentais	3
2.3 Sistema nervoso central e hipertensão sódio-dependente	4
2.4 Tratamentos para hipertensão	6
2.5 Fitoterápicos e seus efeitos na hipertensão	6
2.6 Compostos de origem vegetal e formulações nano-estruturadas (nanoemulsão)	7
2.7 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	9
3. JUSTIFICATIVA	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo geral	12
4.2 Objetivos específicos e estratégias experimentais	12
5. METODOLOGIA	13
5.1 Coleta do material vegetal	13
5.2 Preparo do extrato	13
5.3 Caracterização fitoquímica	13
5.3.1 Dosagem de fenólicos e flavonoides	13
5.3.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)	14
5.4 Preparo da formulação nano estruturada do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	15
5.5 Ensaio biológicos	15
5.5.1 Medidas do volume de ingestão de líquidos e pesagem diária dos ratos	16
5.5.2 Medida direta de pressão arterial	17
5.5.3 Análise espectral e avaliação barorreflexa espontânea	19
5.6 Ingestão de líquidos, ingestão de ração e medidas do volume urinário durante o período de 6 horas	20

5.7 Determinação do volume circulante.....	20
5.8 Análises dos dados e estatística	21
6. RESULTADOS	21
6.1 Rendimento do extrato e teor de compostos fenólicos e flavonoides.....	21
6.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)	22
6.3 caracterização físico-química da formulação nano-estruturada de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	24
6.4 Medidas diárias do volume de ingestão de líquidos e pesagem dos ratos.....	24
6.5 Medida direta de pressão arterial	28
6.6 Medida dos efeitos pressores da vasopressina.....	30
6.7 Medida dos efeitos pressores da angiotensina II.....	31
6.8 Medida da atividade pressora neurogênica	32
6.9 Análise espectral e avaliação barorreflexa espontânea	35
7. Medidas de peso, ingestão de líquido, ração e volume urinário dos ratos.....	38
7.1 Medidas do volume plasmático, hematócrito e volume de sangue	41
8. DISCUSSÃO	43
9. CONCLUSÃO.....	50
10. LIMITAÇÕES	51
11. REFERÊNCIAS	52
ANEXO 1: SisGen	65
ANEXO 2: Certificado de aprovação no comitê de ética animal	66
ANEXO 3: Espectro da fração hidrometanólica do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i>.....	67
ANEXO 4: Espectro da fração hexânica do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	68

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) está relacionada com aumento de doenças cardiovasculares. O desenvolvimento da HA pode estar ligado a fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida (ARMSTRONG; JOHNSON, 2018). O aumento da ingestão de sal é um dos principais fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento da HA, sendo comumente conhecida como hipertensão sódio-dependente (OSBORN, 1991; OSBORN; PROVO; MONTANA; TROSTEL, 1993). Contudo, os mecanismos que estão envolvidos com a alta ingestão de sal e o aumento da pressão arterial (PA) ainda não estão elucidados (DE WARDENER; HE; MACGREGOR, 2004). Vários estudos correlacionam o desenvolvimento da hipertensão sódio-dependente com disfunções no controle neuroendócrino, em especial o controle da atividade simpática eferente (ADAMS; MADDEN; SVED; STOCKER, 2007; ADAMS; MCCARTHY; STOCKER, 2008). A atividade simpática eferente modula a PA por meio da resistência vascular periférica (RVP), débito cardíaco e volume circulante (BIE; EVANS, 2017). Além do controle neuroendócrino, outros mecanismos também estão ligados ao desenvolvimento da HA, tais como alterações na função barorreflexa (GOLDSTEIN; BENTHO; PARK; SHARABI, 2011; GRONDA; SERAVALLE; BRAMBILLA; COSTANTINO *et al.*, 2014), ação central e periférica da angiotensina II (Ang II) em receptores para angiotensina do tipo 1 (AT₁) e do tipo 2 (AT₂) (BIANCARDI; SON; AHMADI; FILOSA *et al.*, 2014; NICKENIG; STREHLOW; ROELING; ZOLK *et al.*, 1998). Além da Ang II, a arginina vasopressina (AVP) também pode estar ligada com o aumento de PA principalmente em casos de alta ingestão de sódio (ANTUNES; YAO; PICKERING; MURPHY *et al.*, 2006). Ademais, alterações osmóticas transitórias também são frequentemente associadas a alta ingestão de sódio e desencadeiam respostas contra regulatórias importantes que impactam o sistema cardiovascular (STOCKER; MADDEN; SVED, 2010; TONEY; STOCKER, 2010).

Atualmente, há várias classes de medicamentos disponíveis no mercado para tratamento da HA, como, por exemplo os inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA-1), antagonistas de receptores AT₁, bloqueadores de canais de cálcio, diuréticos e betabloqueadores (BOUHANICK; VAISSE; SCHAVGOULIDZE; GANDIA, 2019). Contudo, existem pacientes que possuem um quadro de resistência ao tratamento da HA com os medicamentos que se encontram disponíveis no mercado. Um estudo observacional publicado no ano de 2019 demonstrou que 1 em 8 pacientes diagnosticados com HA é resistente aos tratamentos (MAW; THOMPSON; HO; KENNEDY *et al.*, 2020). Avaliando o contexto de pacientes que possuem resistência ao tratamento convencional da hipertensão, os medicamentos fitoterápicos têm

atraído grande atenção científica, devido a sua alta popularidade e claro seus efeitos terapêuticos (HADI; POURMASOUMI; GHAEDI; SAHEBKAR, 2019). O uso de produtos fitoterápicos, que são compostos de plantas medicinais, é muito discutido envolvendo razões econômicas e culturais (VAHEKENI; NETO; KAYIMBO; MÄSER *et al.*, 2019). Dentro da classe das plantas medicinais com potencial efeito anti-hipertensivo temos o *Baccharis dracunculifolia* (DC) que pertence à família Asteraceae, que estão distribuídas em mais de 500 espécies entre as áreas tropicais da América do Sul, onde também é conhecido como alecrim-do-campo ou vassourinha (DE MIRANDA; LANNA; NASCIMENTO; DE PAULA *et al.*, 2019). Mesmo que estudos envolvendo o DC seja escasso na literatura, alguns autores já relataram efeitos anti-hipertensivos ligados ao uso de extrato etanólico da própolis verde (MARUYAMA; SUMITOU; SAKAMOTO; ARAKI *et al.*, 2009). O potencial terapêutico atribuído a própolis verde está intimamente ligado à presença de compostos fenólicos e flavonoides (GUIMARÃES; MELLO; PAIVA; BUENO *et al.*, 2012). Compostos estes que também estão presentes nas folhas de DC (CHANG; PILÓ-VELOSO; MORAIS; NASCIMENTO, 2008; MARÓSTICA JUNIOR; DAUGSCH; MORAES; QUEIROGA *et al.*, 2008).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hipertensão arterial

A HA é uma doença caracterizada pelo aumento da PA que atualmente é definida com base nos valores igual ou superior a 140/90 mmHg (UNGER; BORGHI; CHARCHAR; KHAN *et al.*, 2020). A HA é um grave problema de saúde pública, produzindo aumento no índice de doenças cardiovasculares, renais e cerebrais (CROWLEY; GURLEY; HERRERA; RUIZ *et al.*, 2006; GONS; DE LAAT; VAN NORDEN; VAN OUDHEUSDEN *et al.*, 2010; SCHIFFRIN, 2001). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), indicam que cerca de 1,13 bilhão de pessoas no mundo possuem HA provocando cerca de 7,5 milhões de mortes por ano (WHO, 2020). Diversos autores correlacionam fatores ambientais, genéticos e de estilo vida que podem predispor o desenvolvimento da HA (CIPULLO; MARTIN; CIORLIA; GODOY *et al.*, 2010; WEIDMANN, 1980). Estudos experimentais relatam que populações que são submetidas a um estresse diário possuem maior predisposição para aumento da PA (DAHL; KNUDSEN; HEINE; LEITL, 1968; KULKARNI; O'FARRELL; ERASI; KOCHAR, 1998). Assim como, indivíduos negros que possuem maior incidência de quadros de HA comparados com a população de cor branca (ZHU; LU; WANG; SNIEDER *et al.*, 2006). Além dessas circunstâncias descritas acima, muitos estudos vêm relacionando o alto consumo de sódio produzindo aumento sustentado da PA, levando a um quadro de hipertensão sódio-dependente

(AVERINA; OTHMER; FINK; OSBORN, 2015; HA, 2014; OSBORN; PROVO; MONTANA; TROSTEL, 1993).

2.2 Hipertensão sódio-dependente e modelos experimentais

O sal é um importante eletrólito para manutenção da homeostase e além disso é utilizado em todo o mundo com diversas finalidades (HA, 2014). Há milhões de anos estimava-se que o consumo diário de sal fosse de aproximadamente 1g por dia. Entretanto, o consumo de sal teve um aumento abrupto com o consumo de comidas processadas (HE; MACGREGOR, 2010; 2012). Hoje em dia a OMS preconiza que a ingestão saudável de sódio (Na^+) seja no máximo de 5 g por dia, porém, os dados demonstram que a ingestão diária seja três vezes acima deste valor, ou seja, atingindo médias de 12 a 15 g de sódio por dia (WHO, 2020). Weinberger em 1996 demonstrou que cerca de 25% da população normotensa é sensível ao alto consumo de sal e que 50-75% da população hipertensa possui um aumento abrupto da PA quando submetidos a alta ingestão de sódio (WEINBERGER, 1996). O modelo matemático apresentado por Averina e colaboradores (2015) indica que a hipertensão sódio-dependente se caracteriza a partir do momento em que a alta no consumo de sódio promova elevação da PA acima de 10 mmHg (AVERINA; OTHMER; FINK; OSBORN, 2015). A alta da PA associada com aumento no consumo de sódio pode estar ligado a desordens em diversos sistemas, como renal (DOUGLAS; GUYTON; LANGSTON; BISHOP, 1964; GUYTON, 1989), cardiovascular (COOK; APPEL; WHELTON, 2014), endócrino (OSBORN; FINK; KUROKI, 2011) e sistema nervoso central (SNC) (ADAMS; MADDEN; SVED; STOCKER, 2007; GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; STOCKER; MADDEN; SVED, 2010). Em tese todos os sistemas que modulam direta ou indiretamente o débito cardíaco e RVP sofrem alguma desordem fisiológica que pode promover aumento da PA.

Diversos modelos experimentais foram padronizados para realizar estudos e elucidar os mecanismos por trás da gênese e manutenção da hipertensão sódio-dependente. Estes modelos utilizam valores acima do que é preconizado para ingestão de roedores que varia de 0,23 a 0,40% de Na^+ na ração. Um estudo experimental realizado em 2012, demonstrou que camundongos submetidos a dieta contendo 8% de Na^+ na ração apresentaram aumento de PA, quando comparado com os ratos que receberam a dieta normal contendo 0,30% de Na^+ (VAN HUYSSSE; AMIN; YANG; LEENEN, 2012). Além disso, modelos que utilizam 0,9% de Na^+ na ração também já demonstraram efeitos no aumento de PA de ratos Wistar, submetidos a alta ingestão de sódio a partir do desmame durante 12 semanas (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). No estudo realizado

por Gomes e colaboradores, os pesquisadores demonstram que a dieta contendo 0,9% de Na⁺ na ração promoveu aumento na concentração de sódio no líquido cefalorraquidiano (LCR) em conjunto com aumento da atividade simpática e consequentemente aumento da PA (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017). Outro modelo utilizado para estudo da hipertensão sódio-dependente é a alta ingestão de sódio na ração acompanhado da administração de Ang II ou de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) (BUDZIKOWSKI; LEENEN, 2001; IYER; CHAN; BROWN, 2010). Estudos envolvendo a Ang II indicam que seu efeito pressor pode estar ligado com o aumento na expressão de receptores AT₁ tanto vascular quanto central, principalmente nos órgãos circunventriculares (OCVs) e regiões de controle do drive simpático (CROWLEY; GURLEY; HERRERA; RUIZ *et al.*, 2006; LI; MORRIS; DIZ; FERRARIO *et al.*, 1996; VIEIRA; COLOMBARI; DE LUCA; COLOMBARI *et al.*, 2010). Já o uso do DOCA combinado com a alta ingestão de sal está comumente associado com o remodelamento das características cardiovasculares, aumentando o volume, induzindo hipertrofia, fibrose e disfunções endoteliais (BROWN; DUCE; MIRIC; SERNIA, 1999; SELYE; HALL; ROWLEY, 1943). Além de modelos que induzem hipertensão sódio-dependente devido a ingestão de sódio na ração, alguns estudos induzem aumento de PA em roedores com o uso de salinas hipertônicas, contendo altos teores de sódio. Em 1993 Pawloski-Dahm e colaboradores, demonstram que a ingestão de salina contendo 1% de cloreto de sódio (NaCl) produziu aumento de pressão arterial quando comparado com os animais que receberam água (PAWLOSKI-DAHM; GORDON, 1993). Ademais, Ribeiro e colaboradores também demonstraram que a ingestão de salina hipertônica contendo 2% de NaCl produziu aumento de PA, concomitante simpatoexcitação e aumento na atividade dos receptores para AVP do tipo 1a (V_{1a}) (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Estes estudos descritos acima suportam a ideia de que alta ingestão de Na⁺ promova aumento da PA devido a disfunções neuroendócrinas e cardiovasculares.

2.3 Sistema nervoso central e hipertensão sódio-dependente

O envolvimento de fatores neurogênicos relacionados com o desenvolvimento da HA vem atraído bastante atenção no meio científico desde o século passado (DOYLE; SMIRK, 1955; STOCKER; KINSMAN; SVED, 2017). Há vários relatos que corroboram essa ideia, principalmente envolvendo o drive simpático com o aumento da PA (ADAMS; BARDGETT; STOCKER, 2009; YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME *et al.*, 2019) ou a ação da liberação de hormônios por ativação de mecanismos neurais que podem levar ao aumento da PA, devido à alta ingestão de Na⁺ (ANTUNES; YAO; PICKERING; MURPHY *et al.*, 2006;

GASPARINI; MELO; NASCIMENTO; ANDRADE-FRANZÉ *et al.*, 2019). O aumento de Na⁺ nos fluidos extracelulares pode promover alterações na osmolaridade ou apenas aumento na concentração de Na⁺ (BOURQUE, 2008; GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017). Alterações na concentração de Na⁺ podem ser detectados por neurônios e células glia especializadas localizados na lâmina terminal, presentes nos órgãos circunventriculares (CVOs) (BOURQUE AND; OLIET, 1997; NODA, 2005). Os CVOs são comumente conhecidos como órgão subfornical (SFO) e órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (BOURQUE, 2008; NODA; SAKUTA, 2013). Como já descrito na literatura essas estruturas possuem uma barreira hematoencefálica frouxa e estão localizados próximo ao terceiro ventrículo, trabalhando como sensores de intercomunicação entre a circulação o LCR e o SNC (BOURQUE AND; OLIET, 1997; BOURQUE, 2008). Além do efeito sensorial existem evidências demonstrando que neurônios localizados nesses sítios centrais são ativados em situações de hipernatremia, hiponatremia ou mudanças na osmolaridade (ADAMS; BARDGETT; STOCKER, 2009). Os neurônios presentes na lâmina terminal se projetam principalmente para o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). os neurônios do PVN modulam a atividade do sistema nervoso simpático por meio de mono e poli sinapses para regiões do bulbo rostro ventrolateral (RVLM) e bulbo intermediolateral- IML (GUYENET, 2006; TONEY; CHEN; CATO; STOCKER, 2003). A ativação de neurônios do PVN é alterada envolvendo uma série de fatores sensoriais incluindo oscilações na osmolaridade plasmática ou na concentração de Na⁺ (NOMURA; HIYAMA; SAKUTA; MATSUDA *et al.*, 2018), visto que o bloqueio local de glutamato ou de receptores AT₁ reduzem a atividade do sistema nervoso simpático durante o período de hiperosmolaridade aguda (ANTUNES; YAO; PICKERING; MURPHY *et al.*, 2006; CHEN; TONEY, 2001). A ativação de vias simpatoexcitatorias devido a estímulos hiperósmóticos para aumento da PA pode estar ligado a ação hormonal, principalmente da AVP ou de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (ADAMS; MADDEN; SVED; STOCKER, 2007; RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que o bloqueio espinal de receptores V_{1a} inibe a atividade simpática lombar durante um estímulo hiperósmótico (ANTUNES; YAO; PICKERING; MURPHY *et al.*, 2006), assim como a ablação do RVLM inibe as repostas simpáticas a estímulos hiperósmóticos (STOCKER; OSBORN; CARMICHAEL, 2008). Além de estudos experimentais, ensaios clínicos que avaliaram a ingestão de dietas com alto teor de Na⁺ demonstraram aumento de Na⁺ plasmático, concomitante aumento da PA (SCHMIDLIN; FORMAN; SEBASTIAN; MORRIS, 2007). Outros estudos clínicos demonstraram que

cirurgias de simpatectomia produzem redução da PA, porém o procedimento é muito agressivo e os efeitos adversos podem ser fatais aos indivíduos (PARKES, 1958). Esses estudos demonstram que dietas com alto teor de sódio podem promover aumento da PA, produzindo desordens nos centros de controle da atividade simpática, produzindo maior atividade de neurônios simpatoexcitatórios levando a estímulos de controle da PA.

2.4 Tratamentos para hipertensão

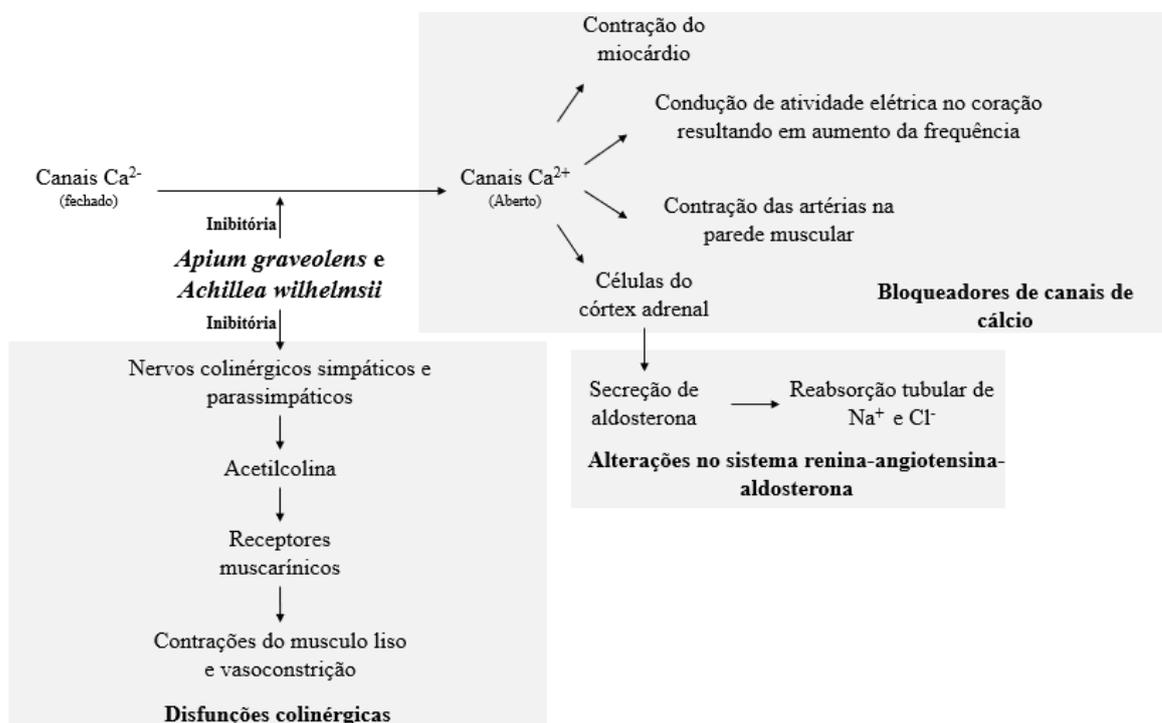
Em relação ao tratamento da HA, há, atualmente várias classes de medicamentos disponíveis no mercado, como por exemplo os inibidores da ECA-1, antagonistas de receptores AT₁, bloqueadores de canais de cálcio, diuréticos ou até mesmo betabloqueadores (BOUHANICK; VAISSE; SCHAVGOULIDZE; GANDIA, 2019). Contudo, existem pacientes que possuem um quadro de resistência ao tratamento da hipertensão com os medicamentos que se encontram disponíveis no mercado. Um estudo observacional publicado no ano de 2019 demonstrou que 1 em 8 pacientes diagnosticados com HA é resistente aos tratamentos (MAW; THOMPSON; HO; KENNEDY *et al.*, 2020). Avaliando o contexto de pacientes que possuem resistência ao tratamento convencional da HA, os medicamentos fitoterápicos medicinais têm atraído grande atenção científica, devido a sua alta popularidade e claro seus efeitos terapêuticos (HADI; POURMASOUMI; GHAEDI; SAHEBKAR, 2019).

2.5 Fitoterápicos e seus efeitos na hipertensão

O uso de produtos fitoterápicos, que são compostos de plantas medicinais, é muito discutido envolvendo razões econômicas e culturais (VAHEKENI; NETO; KAYIMBO; MÄSER *et al.*, 2019). Um estudo realizado em 2019 estima que cerca de 80% da população de países subdesenvolvidos façam uso de produtos naturais (KANJANAHATTAKIJ; KWANKHAO; VATHESATOGKIT; THONGMUNG *et al.*, 2019). Outro estudo realizado em 2008 demonstrou que na Índia existem cerca de 20.000 plantas medicinais catalogadas e cerca de 37% destas plantas catalogadas são utilizadas para o tratamento de diversas doenças (SAMY; PUSHPARAJ; GOPALAKRISHNAKONE, 2008). Dentre o uso de plantas medicinais vários pesquisadores vêm estudando e demonstrando que produtos de origem vegetal possuem efeitos anti hipertensivos, mesmo que os mecanismos fisiológicos que desencadeiam este efeito não estejam completamente elucidados (RAWAT; SINGH; KUMAR, 2016). Um estudo clínico realizado em 2016 demonstrou que pacientes hipertensos receberam extrato hidroalcolico de *Achillea wilhelmsii* durante o período de 6 meses e produziram uma redução na PA (ASGARY; NADERI; SARRAFZADEGAN; MOHAMMADIFARD *et al.*, 2000). Outro estudo utilizando o *Apium graveolens* demonstrou efeitos na redução da PA, devido sua atividade vaso relaxante

e atividade hipotensora (TASHAKORI-SABZEVAR; RAZAVI; IMENSHAHIDI; DANESHMANDI *et al.*, 2016). Em 2017 Elias e colaboradores utilizaram extrato etanólico de folha de goiabeira (*Psidium guajava*) em *Guinea pigs* em diversas doses (12, 26, 42, 60 e 80 mg/kg). O resultado do estudo demonstrou que a redução da PA era dependente da dose, ou seja, de acordo com que a dose aumentava, reduzia ainda mais a pressão arterial dos animais (ELIAS, 2017). Ademais, estudos utilizando a própolis verde já demonstraram efeitos anti-hipertensivos (KUBOTA; UMEGAKI; KOBAYASHI; TANAKA *et al.*, 2004; MISHIMA; YOSHIDA; AKINO; SAKAMOTO, 2005). A própolis verde é um produto derivado da resina presente nas folhas DC que é coletada por abelhas, principalmente a abelha europeia (*Apis mellifera*) (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). As plantas medicinais e fitoterápicos com efeitos anti-hipertensivos estão demonstrados na tabela 1. Possíveis mecanismos por traz dos efeitos anti-hipertensivos da *Apium graveolens* e *Achillea wilhelmsii* (figura 1).

Figura 1: Possíveis mecanismos de ação do *Apium graveolens* e *Achillea wilhelmsii* na redução da pressão arterial



Fonte: Figura Adaptada de (RAWAT; SINGH; KUMAR, 2016)

2.6 Compostos de origem vegetal e formulações nano-estruturadas (nanoemulssão)

Compostos bioativos de origem vegetal possuem fatores que limitam sua biodisponibilidade, principalmente durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e podem ser classificados de acordo com seu esquema de biodisponibilidade nutracêutica

(NuBACS) (MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015). A biodisponibilidade é muitas vezes influenciada de acordo com a liberação do componente bioativo, pela solubilidade nos fluidos gastrointestinais ou sua insolubilidade. Outros parâmetros também alteram a biodisponibilidade do composto bioativo, como a camada mucosa, junções intestinais, membranas biliares, células epiteliais, inibição de transportadores e o fluxo dos transportadores (MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015). Entretanto, os mecanismos de ação de formulações nano-estruturadas tendem a quebrar as barreiras naturais que causam redução na biodisponibilidade de compostos bioativos, principalmente ligados a produtos de origem vegetal (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019; KARAMI; SAGHATCHI ZANJANI; HAMIDI, 2019; PANDEY; CHOUDHURY; YEUN; YIN *et al.*, 2018).

As formulações nano-emulsionadas são compostas por uma fase oleosa, uma fase aquosa, um agente surfactante e o composto ativo, produzindo partículas com tamanho variável de 20 a 600 nm (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Atualmente existem dois métodos distintos para a preparação de formulações nano-emulsionadas, sendo um deles de emulsificação por alta energia e o outro por baixa energia (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). A emulsificação por alta-energia inclui métodos de ultrassom, microfluidização, membrana emulsificante e alta pressão de emulsificação (TABIBI, 1990; VERMA; KUMAR; KUMAR; JAIN, 2018). Já a baixa energia inclui métodos de inversões de fase, emulsificação espontânea e inversão do ponto de emulsificação (SHAKEEL; BABOOTA; AHUJA; ALI *et al.*, 2008). Entretanto, é possível realizar uma formulação nano-emulsionada combinando os dois métodos, formando uma nanoemulsão reversa com um sistema de alta viscosidade (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Alguns parâmetros determinam a estabilidade da nano-formulação, tal como a presença de uma fase única, ausência de creme, aparência límpida, cor, consistência, ausência de deterioração por microrganismos e consistência (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Ademais, algumas vantagens são associadas ao uso das nanoemulsões, tais como: melhora na disponibilidade do composto ativo; baixa toxicidade; aumento da absorção no TGI e a possibilidade de ser formulada em diversas formas farmacêuticas, como espumas, líquidos, sprays e cremes (BOUCHEMAL; BRIANÇON; PERRIER; FESSI, 2004; KIM; CHO; GAO, 2001; WAGNER; GERARD; KAISER, 1966). Em 2019 um estudo demonstrou que uma nano emulsão contendo óleo essencial de DC produziu efeito larvicida em larvas de *Cochliomyia hominivorax*. No estudo os pesquisadores utilizaram diversas concentrações da droga (5, 7,5, 10, 13,5, e 15% p/v) e identificaram que o efeito larvicida era dose dependente, ou seja, de acordo com o aumento na concentração do óleo

essencial de DC aumentava o efeito larvicida que variou de 7, 36, 51, 81, e 92% respectivo a cada concentração da droga (JAQUELINE; SHIRLEY; GIULIANO PEREIRA DE; MARIA BEATRIZ *et al.*, 2019).

2.7 *Baccharis dracunculifolia*

O DC pertence à família Asteraceae, que estão distribuídas em mais de 500 espécies entre as áreas tropicais da América do Sul, onde também é conhecido como alecrim-do-campo ou vassourinha (SALATINO; TEIXEIRA; NEGRI; MESSAGE, 2005). O DC é uma das principais fontes botânicas utilizadas para produção da própolis verde. Os efeitos benéficos da própolis verde, pode estar ligado a presença de compostos fenólicos e seus derivados, uma vez que os mesmos já foram testados isoladamente e com o próprio extrato bruto da própolis verde e demonstraram efeitos anti-hipertensivos (DUARTE; PÉREZ VIZCAÍNO; UTRILLA; JIMÉNEZ *et al.*, 1993; KUBOTA; UMEGAKI; KOBAYASHI; TANAKA *et al.*, 2004; MISHIMA; YOSHIDA; AKINO; SAKAMOTO, 2005). Além dos efeitos benéficos já descritos na literatura, a própolis verde ainda possui um grande valor econômico no mercado, sendo alvo de exportação para países da Ásia e Europa (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2006).

O contexto econômico e científico que envolve a própolis verde nos últimos anos ocorre devido a seus compostos com atividade biológica que, no caso, também estão presentes nas folhas de DC (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PARK; PAREDES-GUZMAN; AGUIAR; ALENCAR *et al.*, 2004). Mesmo com a semelhança entre os compostos presentes nas folhas de DC com a própolis verde, estudos com foco nas folhas de DC para redução da PA ainda são escassos na literatura. Deixando aberto uma pergunta, será que o extrato etanólico preparado a partir das folhas de DC pode exercer efeito redutor na PA, principalmente no quadro de hipertensão sódio-dependente?

Tabela 1: Fitoterápicos com efeitos anti-hipertensivos

Nome	Família	Estudo	Modelo experimental	Referência
<i>Achillea wilhelmsii</i>	Asteraceae	Clínico	Pacientes com quadros de hipertensão já estabelecidos	(ASGARY; NADERI; SARRAFZADEGAN; MOHAMMADIFARD <i>et al.</i> , 2000)
<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae	Experimental	Salina hipertônica (1% NaCl) acrescido de injeções subcutâneas de acetato de desoxicorticosterona (DOCA)	(TASHAKORI-SABZEVAR; RAZAVI; IMENSHAHIDI; DANESHMANDI <i>et al.</i> , 2016)
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Experimental	Efeito hipotensor em <i>Guinea pigs</i>	(ELIAS, 2017)
Própolis verde	Asteraceae	Experimental	SHR e Ang II	(KUBOTA; UMEGAKI; KOBAYASHI; TANAKA <i>et al.</i> , 2004; MISHIMA; YOSHIDA; AKINO; SAKAMOTO, 2005)

Tabela adaptada (RAWAT; SINGH; KUMAR, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial é uma doença prevalente no mundo, sendo muitas vezes ligada a disfunções em diversos sistemas que podem ou não estar atuando de forma paralela para sua gênese ou manutenção. Estudar mecanismos anti-hipertensivos de fármacos baseados em produtos naturais é importante para se determinar possíveis efeitos colaterais e contraindicações no caso da existência de comorbidades. Além disso, explorar o potencial terapêutico anti-hipertensivo de produtos naturais é uma importante etapa na descoberta de novas estratégias farmacológicas terapêuticas para tratamento da hipertensão, em especial porque o número de relatos de casos de pacientes hipertensos que são resistentes à medicação convencional vem crescendo nos últimos anos. Desta forma, justifica-se a realização deste trabalho visando obter novas drogas com potencial efeito anti-hipertensivo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi de avaliar a ação anti-hipertensiva de uma formulação nano-estruturada contendo extrato de DC (nDC) em um modelo de hipertensão sódio-dependente.

4.2 Objetivos específicos e estratégias experimentais

- 1) Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de DC (EtOH-DC)

Estratégias experimentais: Quantificar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides e realizar a identificação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

- 2) Avaliar se a administração da nDC influencia a atividade pressora neurogênica no modelo experimental utilizado neste trabalho.

Estratégia experimental: Verificar se ocorre alteração no índice da atividade pressora neurogênica dos animais submetidos ao tratamento agudo com nDC.

- 3) Avaliar se a administração da nDC de forma aguda influenciaria na ação da AVP e Ang II circulante no modelo experimental utilizado neste trabalho.

Estratégia experimental: Verificar se ocorre mudanças na pressão artéria perante o bloqueio de receptores V_{1a} e AT_1 em animais submetidos ao tratamento agudo com nDC.

- 4) Avaliar se o efeito anti-hipertensivo da nDC envolve modificações do volume circulante.

Estratégia experimental: Verificar se ocorre alterações no volume circulante dos animais tratados com nDC por meio da técnica de azul de Evans.

- 5) Avaliar se o tratamento com nDC leva a alterações no balanço hidroeletrolítico dos animais no modelo experimental utilizado neste trabalho.

Estratégia experimental: Avaliar o a ingestão e excreção de líquido e a quantidade de ração ingerida utilizando gaiolas metabólicas.

5. METODOLOGIA

5.1 Coleta do material vegetal

Folhas de DC foram coletadas em uma região de cultivo da planta. Essa área de cultivo fica dentro da propriedade da mineradora Samarco S. A. As folhas foram coletadas no período da manhã, entre 7:00 e 11:00 horas, durante a estação de verão, armazenadas em sacos plásticos e transportadas até ao laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) no campus morro do cruzeiro para seleção, lavagem e pesagem.

5.2 Preparo do extrato

Uma vez pesadas, as folhas foram imersas em etanol 95 a 97% P.A. em uma proporção 1:1,5 (folhas:etanol) e assim permaneceram no processo de maceração por 10 dias à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao final dessa etapa, a fase líquida foi filtrada e um novo lote de etanol 95 a 97% P.A. foi adicionado às folhas até total imersão, sempre na mesma proporção 1:1,5. Uma terceira maceração foi realizada, seguindo os mesmos procedimentos das anteriores. As frações líquidas foram reunidas, misturadas e o etanol foi evaporado em rota evaporador a 86 mBar de pressão e $\pm 40^\circ\text{C}$ (GRANCE; TEIXEIRA; LEITE; GUIMARAES *et al.*, 2008). O fluido resultante foi seco em estufa a $\pm 40^\circ\text{C}$, gerando o EtOH-DC que foi destinado as análises fitoquímicas e preparo da formulação nano-estruturada.

5.3 Caracterização fitoquímica

5.3.1 Dosagem de fenólicos e flavonoides

As análises fitoquímicas iniciais do EtOH-DC foram realizadas por meio da dosagem de compostos fenólicos totais e flavonoides. Para dosagem dos compostos fenólicos totais foi utilizada a técnica de Folin-Ciocateau. Que consiste na solubilização de 0,0025 g do EtOH-DC em 2,5 mL de etanol P.A, com preparo de soluções de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1,5% p/v com volume final de 10 ml em água Milli Q e 10 ml de ácido gálico na concentração de 1mg/1ml, pesando 0,1g de ácido gálico em 10ml de etanol P.A, e a leitura da análise foi realizada através do equipamento de leitor de microplaca (Molecular Devices) a 640 nm (SILVA; FIGUEIREDO; RICARDO; VIEIRA *et al.*, 2014). Em conjunto foi realizada dosagem de flavonoides por meio da técnica da reação de cloreto de alumínio. O preparo consiste na pesagem de 0,0025 g do EtOH-DC, solubilizado em 2,0 ml de etanol P.A, com as soluções de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% p/v com volume final de 10 ml em água Milli Q. Acetato de potássio (CH_3COOK) 1 mol por litro em volume final de 10 ml de água Milli Q. Com o preparo da solução padrão de quercetina 0,2 mg/ml com volume final de 10 ml de água

Milli Q, onde a leitura foi realizada através do equipamento de leitor de microplaca (Molecular Devices) a 450 nm. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata com uso de placa de cultura de células de 96 poços (BEZERRA; SILVA; BORGES; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

5.3.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)

Para realizar a dosagem de compostos voláteis presentes no EtOH-DC foi utilizado o equipamento de CG-MS. Portanto, foi realizada a partição de 5g do extrato para obter as frações polares e apolares do EtOH-DC. Para tanto, o EtOH-DC foi resuspendido em metanol e água na proporção de 7:3 (metanol:água) e foi adicionado ao equipamento de ultrassom Gnatus durante o período de 30 minutos. Assim que resuspendido foi adicionado ao funil de separação e foi acrescentado o hexano na proporção de 7:3:5 (metanol:água:hexano). Esse processo de fracionando pelo hexano foi realizado três vezes, sempre na mesma proporção inicial. Assim que finalizado o fracionando foi obtido duas frações do extrato, sendo elas a fração polar (metanol:água) e a fração apolar (hexano). Ao final do procedimento as frações foram armazenadas no dessecador para garantir a completa remoção dos solventes e assim acondicionadas a temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C (SINGH; SINGH; KUMAR; ARORA, 2007).

O preparo das amostras que foram injetadas no equipamento de CG-MS, consistiu em coletar de cada uma das frações, 300 μ L que foram armazenadas em tubos vials com limitadores de volume para 300 μ L. Para realizar a injeção da amostra da fração hidrometanólica do EtOH-DC, a mesma teve que ser submetida a técnica de liofilização para secagem da amostra e total remoção dos solventes (TEAGARDEN; BAKER, 2002). Com as amostras secas, todas foram resuspendidas com piridina na proporção de 3:1 (frações do extrato:piridina) e injetadas ao equipamento de CG-MS. O equipamento utilizado foi o Shimadzu GC-2010 acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 Plus. O aparelho estava equipado com uma coluna capilar DB5-MS (30 m x 0,25 mm; espessura do filme de 0,25 μ m). A configuração utilizada: temperatura do injetor, 250 $^{\circ}$ C; temperatura da interface, 280 $^{\circ}$ C; programa de aquecimento da coluna: 60 $^{\circ}$ C (3 min), depois 6 $^{\circ}$ C por minuto até 280 $^{\circ}$ C (5 min); utilizando o hélio como gás transportador; as injeções foram realizadas no volume de 1,0 μ L, por meio de um injetor automático Shimadzu AOC-20i (BESTEN; NUNES; GRANATO; SENS *et al.*, 2014).

A análise do espectro foi realizada por meio do software CG-MS Prostan Analysis disponibilizado pelo Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas (LABMASSAS) da UFOP. A identificação dos compostos foi realizada por meio da biblioteca NIST MS Search 2.0 e o site PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Para computar

qualitativamente os compostos presentes nas frações do EtOH-DC foram utilizados alguns parâmetros: só foram analisados os picos com o mínimo de área/altura acima de 200.000 e apenas os compostos que possuíam similaridade superior a 80% foram identificados.

5.4 Preparo da formulação nano estruturada do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

A formulação nano-estruturada escolhida foi do tipo água e óleo e incorporada pelo método de inversão de fases, composta pelo EtOH-DC; óleo de girassol; Crill 3 (Croda); Croduret 50 - Special® (Croda) e água destilada recém coletada que foi utilizada como quantidade de solvente para completar o volume final da formulação (QSP). Para preparar a formulação nano-estruturada, o EtOH-DC, óleo de girassol, Crill 3 e Croduret 50 foram pesados em um mesmo recipiente e levados ao equipamento de ultrassom Gnatus por uma hora. Logo após o ultrassom o recipiente foi aquecido em banho maria até $\pm 75^{\circ}$ C, em um recipiente separado a água destilada também foi aquecida até a mesma temperatura. Assim que atingido a temperatura, o volume necessário de água foi adicionado aos demais constituintes e por meio de força mecânica exercida pelo agitador mecânico foi formada a nDC. A formulação permaneceu por agitação até atingir a temperatura ambiente. Para realizar a administração do veículo, foi preparada uma formulação nano-estruturada de acordo com os mesmos procedimentos descritos acima, porém, sem a adição do EtOH-DC. Após o preparo, ambas as formulações nano-estruturadas foram armazenadas a $\pm 4^{\circ}$ C (GONÇALVES; SANTOS; TAYLOR; PERASOLI *et al.*, 2019).

A caracterização físico-química e organoléptica foi realizada para identificar propriedades pertencentes a formulação, tais como cor, sabor, odor, aspecto visual, pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI). Estes parâmetros (tamanho de partícula e PDI) foram avaliados por meio de espectroscopia de correlação de fótons no equipamento Malvern Zetasizer modelo ZS.

5.5 Ensaios biológicos

Para realizar os ensaios biológicos foi utilizado o modelo de hipertensão que produz hipernatremia e desidratação intracelular aguda, esses efeitos são obtidos por substituição da água de beber do animal por salina hipertônica (2% NaCl) durante o período de oito dias (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Os animais utilizados nos ensaios biológicos foram divididos em dois grupos (CT, que receberam água e HS que receberam solução salina hipertônica 2% NaCl), a divisão dos grupos está sumariada

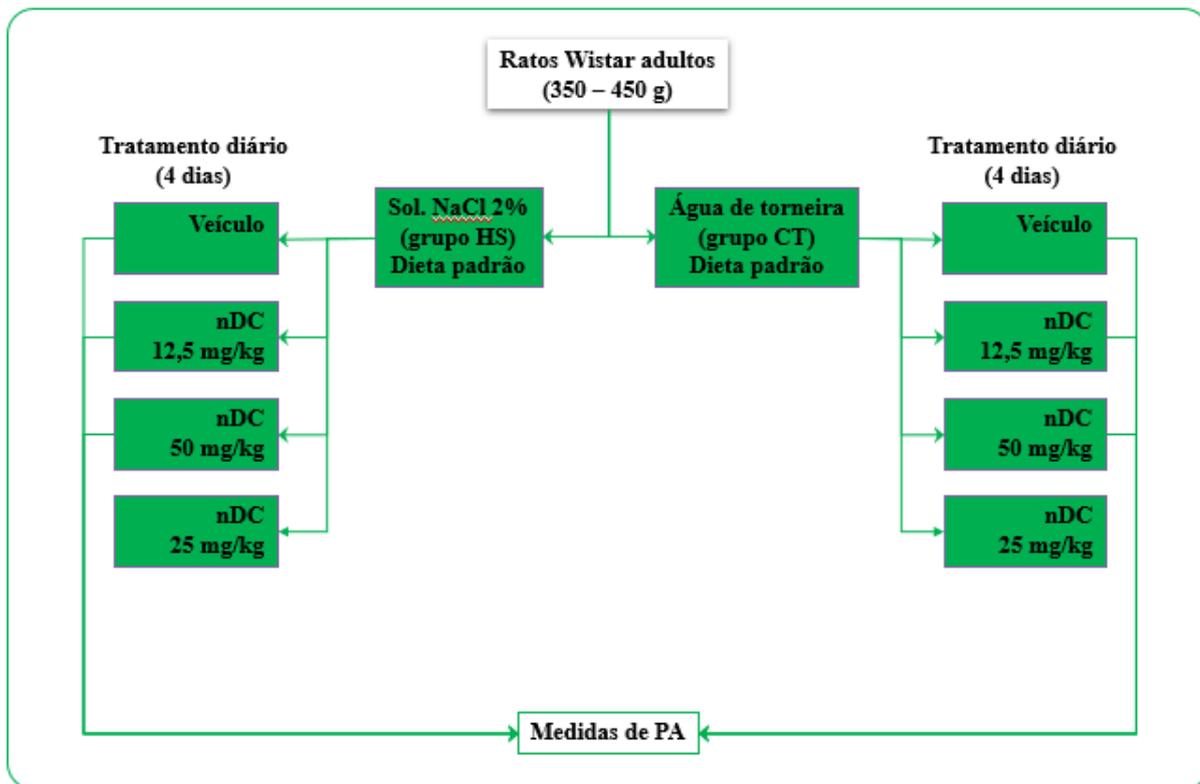
na figura 2. Foram utilizados ratos Wistar adultos, com cerca de 350-400 g, que foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da UFOP, sob o protocolo 2902070520. O protocolo experimental perdurou por oito dias (figura 3). A administração da nDC nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg ou veículo tiveram início no 4º dia após o início do regime hídrico de salina hipertônica para os grupos HS ou água de torneira para os respectivos grupos controles de acordo com a relação abaixo:

- Controle veículo (CT Vh): foi ofertado dieta regular da marca comercial Nuvilab®, água filtrada, e gavagens orogástricas diárias a partir do quarto dia do experimento de veículo.
- Controle tratado (CT nDC): foi ofertado dieta regular da marca comercial Nuvilab®, água filtrada, e gavagens orogástricas diárias a partir do quarto dia do experimento de nDC.
- HS veículo (HS Vh): recebeu dieta regular Nuvilab®, salina hipertônica (2% de NaCl) e gavagens orogástricas diárias a partir do quarto dia do experimento de veículo.
- HS tratado (HS nDC): recebeu dieta regular Nuvilab®, salina hipertônica (2% de NaCl) e gavagens orogástricas diárias a partir do quarto dia do experimento de nDC.
- HS tratado (HS DC ÁGUA): recebeu dieta regular Nuvilab®, salina hipertônica (2% de NaCl) e gavagens orogástricas diárias a partir do quarto dia do experimento de EtOH-DC formulado em água.

5.5.1 Medidas do volume de ingestão de líquidos e pesagem diária dos ratos

A medida diária do volume de ingestão de salina hipertônica 2% NaCl ou água desses ratos foram realizadas por meio de provetas graduadas entre 16 e 18 horas. Para tanto, foi adicionado um volume inicial de 500 ml de solução salina hipertônica 2% NaCl ou água que foram medidos por meio de uma proveta graduada a cada 24 horas. Sendo que a salina hipertônica 2% NaCl ou água foram trocadas a cada dois dias durante todo o protocolo experimental. Assim como as medidas de ingestão do volume de líquido, também foi realizada a pesagem desses animais diariamente no mesmo período das medidas de volume.

Figura 2: Divisão dos grupos e relação dos ensaios biológicos realizados nesse estudo. Formulação nano-estruturada sem conter o EtOH-DC (veículo); formulação nano-estruturada contendo o EtOH-DC (nDC).

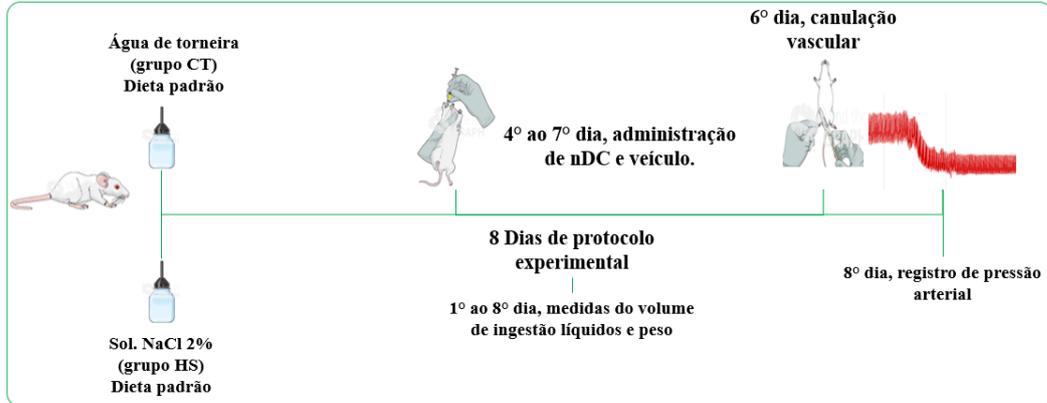


5.5.2 Medida direta de pressão arterial

Para realizar a medida direta de PA, todos os animais foram submetidos a cirurgia de canulação vascular no sexto dia do protocolo experimental (figura 3) no período da manhã. O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia com uma mistura de cetamina 80 mg/kg e xilazina 7 mg/kg. Os ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de cânulas de polietileno (PE50 soldado a PE10) na artéria e veia femorais para obtenção do registro da PA e administração de drogas respectivamente. Para tanto, o animal foi posto em posição decúbito dorsal para incisão de 5 mm na face ventral da pata esquerda. Artéria e veia femorais foram dessecadas, apartadas e um segmento de cada foi isolado com linhas cirúrgicas. Foi realizada uma pequena incisão em cada vaso e as cânulas (parte PE-10) foram cuidadosamente inseridas. As cânulas foram fixadas in locu e as porções PE-50 foram conduzidas subcutaneamente até a porção dorsal próxima ao pescoço, onde foram exteriorizadas e fixadas por sutura. Os animais receberam uma dose de tramadol (12,5 mg/kg) que foi administrada previamente à cirurgia (20 minutos antes) a fim de minimizar os efeitos incômodos da mesma. Após aguardar o período de 48 horas após o fim da cirurgia foi realizado

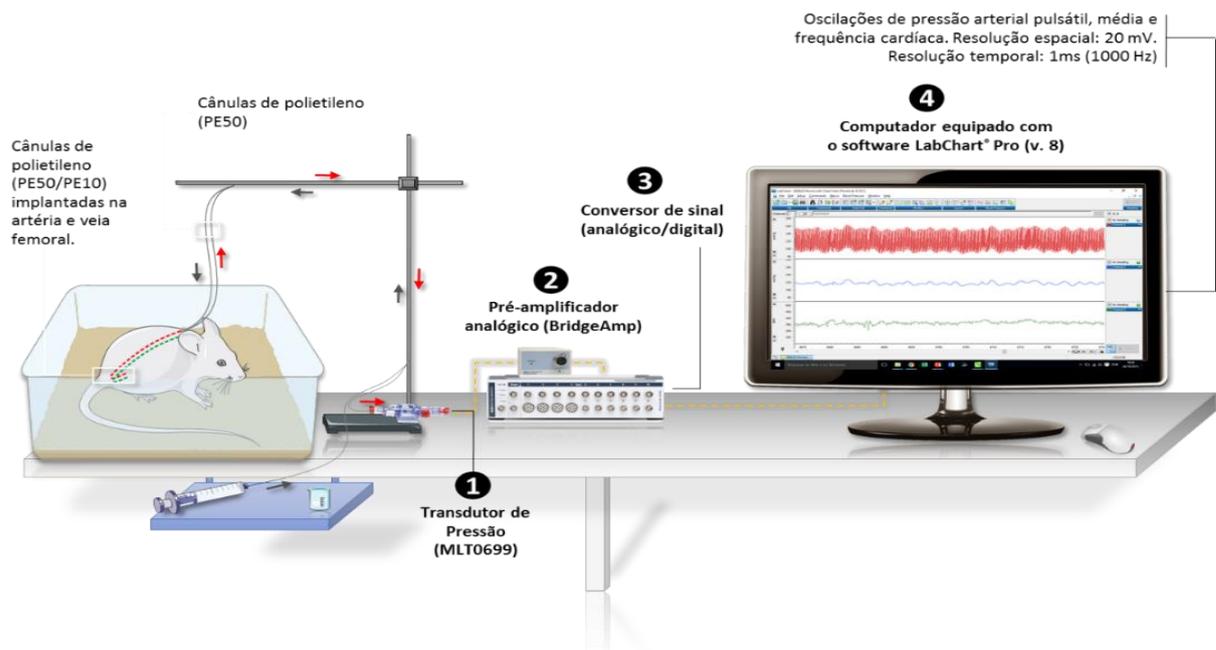
o registro de PA no período da manhã do oitavo dia de experimento (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017)

Figura 3: Protocolo experimental.



O registro da PA foi feito em ratos não anestesiados, com livre movimentação na caixa. Durante o registro foi removida a água e as dietas dos animais e os mesmos foram alocados em caixas limpas. Os animais receberam heparina sódica ($\sim 500 \text{ UI.kg}^{-1}$) na cânula arterial a fim de evitar a formação de coágulos durante o registro de PA. A partir desse momento, os ratos foram conectados a um transdutor de pressão MLT0699 conectado a um pré-amplificador BridgeAmp e a um conversor analógico digital PowerLab 4 da série 35 (figura 4).

Figura 4: Sistema projetado para aferir diretamente a pressão arterial dos animais.



Para obtenção e análise dos dados foi utilizado software LabChart 8.1 para Windows que demonstrou os sinais de registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR). Os dados PAP foram registrados na frequência amostral de 1.000 Hz com janela de digitalização ajustada para 20 mV de amplitude (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017). Os valores de PAM e HR foram computados por meio da análise de cinco minutos do período basal estável de PA dos ratos. Para determinar o período basal estável desses ratos, foram necessários aguardar cerca de 40 a 60 minutos do registro de PA antes da administração das demais drogas.

Durante o registro de PA, foi administrado via intravenosa um total de três drogas com intervalo de 20 minutos entre elas. A primeira delas foi o antagonista seletivo de receptores para AVP V₁ (β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹,O-me-Tyr²,Arg⁸-vasopressin) 10 μ g/kg e a segunda, o antagonista de receptores de Ang II AT₁, losartana, na dose de 10 mg/kg. A última droga utilizada foi o cloreto de hexametônio 20 mg/Kg (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Para determinar o efeito de cada droga utilizada, foi analisado um período de 10 minutos do registro de PAP a partir do momento em que foi iniciado a injeção da droga. Para calcular o índice máximo do efeito da administração dessas drogas foi realizado o delta de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ HR). O cálculo do delta foi avaliado subtraindo o nível de pressão arterial mais baixo após a administração das drogas do nível de PA no período basal (SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). O nível de pressão arterial mais baixo foi determinado durante os primeiros dois minutos após a injeção das drogas. (SANTAJULIANA; HORNFEELDT; OSBORN, 1996)

5.5.3 Análise espectral e avaliação barorreflexa espontânea

A variabilidade no domínio da frequência e do tempo do intervalo sistólico (IS) e do intervalo cardíaco (IC) foi determinada por meio da análise espectral. Sequências de valores consecutivos da pressão arterial sistólica e IC (5 min de registro consecutivo) foram retirados do segmento de PAP e analisados pelo software CardioSeries v2.7. O software foi cedido por Daniel Penteadó Martins Dias. Os espectros de IS e IC foram calculados usando um algoritmo de transformada rápida de Fourier (FFT). Três componentes oscilatórios dos espectros do IS e IC no domínio da frequência foram comparados entre os grupos: banda de muito baixa frequência (VLF) que variou de 0 a 0,20 Hz, banda de baixa frequência (LF) variando de 0,20 a 0,75 Hz e banda de alta frequência (HF) que variou de 0,75 a 3,00 Hz, bem como a relação LF / HF (SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). Já a raiz quadrada

média das diferenças sucessivas (RMSSD), foi realizada para identificar a variabilidade do IC no domínio do tempo. A sensibilidade barorreflexa espontânea também foi obtida pelo software CardioSeries v2.7, que se baseia-se no método de identificação de no mínimo três batimentos consecutivos que nos quais a diminuição ou o aumento da pressão sistólica é acompanhada por um alongamento ou encurtamento progressivo do IS (ELLIOTT, 1988).

5.6 Ingestão de líquidos, ingestão de ração e medidas do volume urinário durante o período de 6 horas

Os ratos foram pesados utilizando uma balança (Acrimet) e alojados individualmente em gaiolas metabólicas (Tecnoplast® SPA) por um único período de 6 horas e fornecidos com água da torneira (CT) ou solução salina hipertônica 2% NaCl (HS) e ração *ad libitum*. O volume de urina e a ingestão de água foram medidos gravimetricamente após as 6 horas. A ingestão alimentar foi calculada e expressa em gramas/peso corporal/6 horas. A ingestão de Na⁺ foi calculada somando a ingestão de Na⁺ na ração pela quantidade de Na⁺ ingerida na salina hipertônica (0,117 mmol/g na ração e 0,393 mmol/g na salina hipertônica). O balanço hídrico foi calculado subtraindo o volume de urina pelo volume de ingestão de líquido.

5.7 Determinação do volume circulante

Para avaliar o efeito da alta ingestão de sódio e do tratamento com nDC no volume sanguíneo, foi utilizado a técnica do corante de azul de Evans (EB). A técnica foi realizada em grupos separados que não foram submetidos a procedimento cirúrgico (GIBSON; EVANS, 1937). Os animais foram anestesiados utilizando cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP) administrados via injeção intraperitoneal. Após a anestesia foi realizada a injeção na veia femoral de 250 µL de volume de solução de Azul de Evans (EB) (0,584 mg/mL) com 20 µL de heparina (5000 UI /mL). Após 30 minutos os ratos foram sacrificados conforme descrito anteriormente e 3 mL de amostra de sangue foram coletados através de uma punção no átrio direito. Uma alíquota dessa amostra foi utilizada para determinação do micro hematócrito (Htc) e o restante foi centrifugado a 4.032g por 10 minutos e o plasma coletado. A concentração de corante no plasma foi determinada utilizando um equipamento de leitor de microplaca a 620 nm de comprimento de onda contra um branco de plasma de um rato naïve. Uma curva de calibração de concentração-absorbância de 5 pontos (620 nm) para EB foi feita usando plasma de um rato naïve. O volume plasmático foi calculado pela equação 01 e o volume sanguíneo foi determinado pela equação 02.

Equação 01:

$$\text{Volume plasmático (mL)} = 0,146 / ([EB Plasma]) - 0,27$$

Equação 02:

$$\text{Volume de sangue (mL)} = 100 / ((100-Hct)) \times \text{Volume de plasma}$$

Os resultados do volume plasmático e do volume sanguíneo foram individualmente corrigidos para o peso corporal e expressos como mL/100g p.c. O plasma e o volume sanguíneo foram medidos em ratos CT e HS (Vh e nDC 25 mg / kg).

5.8 Análises dos dados e estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 9.0 para Windows. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparações entre grupos foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA Two Way) ou uma via (ANOVA One Way) seguido pelos pós-testes de Tukey ou Bonferroni para comparação entre pares de médias. A diferença significativa foi definida quando a probabilidade de se cometer erro Tipo II for menor que 5%, ou seja, $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Rendimento do extrato e teor de compostos fenólicos e flavonoides

O rendimento total do EtOH-DC foi de 31,4% (tabela2). Para calcular o teor de compostos fenólicos e flavonoides foi realizada uma curva de calibração padrão para ácido gálico e quercetina. O teor de compostos fenólicos determinado no EtOH-DC foi de 188 ± 4 mg.g⁻¹ expresso em equivalente de ácido gálico (GAE), correspondendo a 19% da massa total do EtOH-DC. A dosagem de flavonoides identificou o teor de 13 ± 1 mg.g⁻¹ expresso em equivalente de quercetina (QE) que corresponde a um total de 1% da massa total do EtOH-DC. Os valores estão representados na tabela 2.

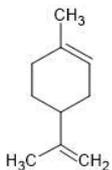
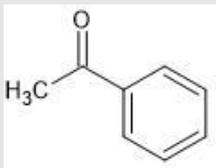
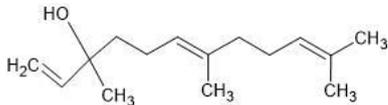
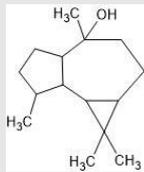
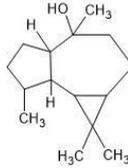
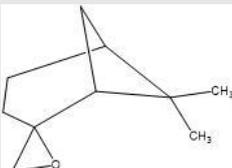
Tabela 2: Teor de compostos fenólicos e flavonoides

	mg.g ⁻¹ de GAE	mg.g ⁻¹ de QE	Percentual presente no EtOH-DC (%)
Compostos fenólicos	188 \pm 4	-	19
Flavonoides	-	13 \pm 1	1

6.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS)

Os compostos voláteis identificados na fração hexânica e hidrometanólica do EtOH-DC estão apresentados na tabela 3 e 4 respectivamente. Os espectros gerados pelo software CG-MS Postrum Analysis para a fração hexânica e hidrometanólica EtOH-DC estão apresentados nos anexos 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3: Compostos voláteis identificados na fração hexânica do EtOH-DC. Tempo de retenção (RT); Massa molecular (MM); área apresentada pelo composto no espectro (%); percentual do composto no EtOH-DC, calculado pela área (%) e o rendimento total do EtOH-DC; estruturas químicas reproduzidas no software ACD/Labs versão D05E41.

Compostos	RT (minutos)	MW	Área (%)	Percentual no extrato (%)	Estrutura química
Limonene	11.38	140	0,07	0,22	
Acetofeno	14.77	120	0,04	0,12	
Nerolidol	35.56	222	0,35	1,11	
Viridiflorol	36.37	222	0,48	1,52	
Globulol	37.06	222	0,07	0,22	
β -Pinene oxidado	42.64	152	0,94	2,99	

Ácido
palmítico

49.00

228

5,52

17,57

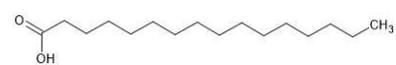
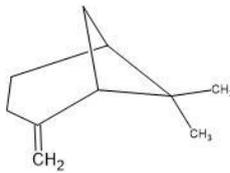
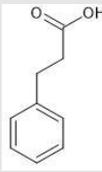
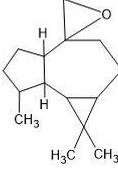


Tabela 4: Compostos voláteis identificados na fração hidrometanólica do EtOH-DC. Tempo de retenção (RT); Massa molecular (MM); área apresentada pelo composto no espectro (%); percentual do composto no EtOH-DC, calculado pela área (%) e o rendimento total do EtOH-DC; estruturas químicas reproduzidas no software ACD/Labs versão D05E41.

Compostos	RT (minutos)	MM	Área (%)	Percentual no extrato (%)	Estrutura química
β -Pinene	11.59	136	0,92	2,92	
Ácido hidrocínâmico	27.75	150	0,37	1,17	
Aromadendrene oxidado	46.93	220	0,98	3,12	

6.3 caracterização físico-química da formulação nano-estruturada de *Baccharis dracunculifolia*

Como resultado das características físico-químicas da nDC, a formulação apresenta aspecto turvo; cor esverdeada escura pH 5,34. A nDC apresentou características organolépticas, com odor semelhante a própolis e sabor também semelhante a própolis. Os valores médios de tamanho de partícula foram de 198 nm, demonstrando um índice de polidispersão igual a 0,37.

6.4 Medidas diárias do volume de ingestão de líquidos e pesagem dos ratos

De acordo com o protocolo experimental, foi realizado as medidas diárias de volume de ingestão de líquidos, salina hipertônica 2% NaCl e água, para os grupos HS e CT respectivamente (figura 5). Os dados demonstraram que a partir do segundo dia do protocolo experimental os ratos HS ingerem um volume de líquido maior em relação aos respectivos controles. Ademais, os dados indicam que o tratamento com nDC 12,5 mg/kg (figura 5), 25 mg/kg (figura 6) e 50 mg/kg (figura 7) não alteraram o volume de ingestão de líquidos desses animais

Figura 5: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 12,5 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05.

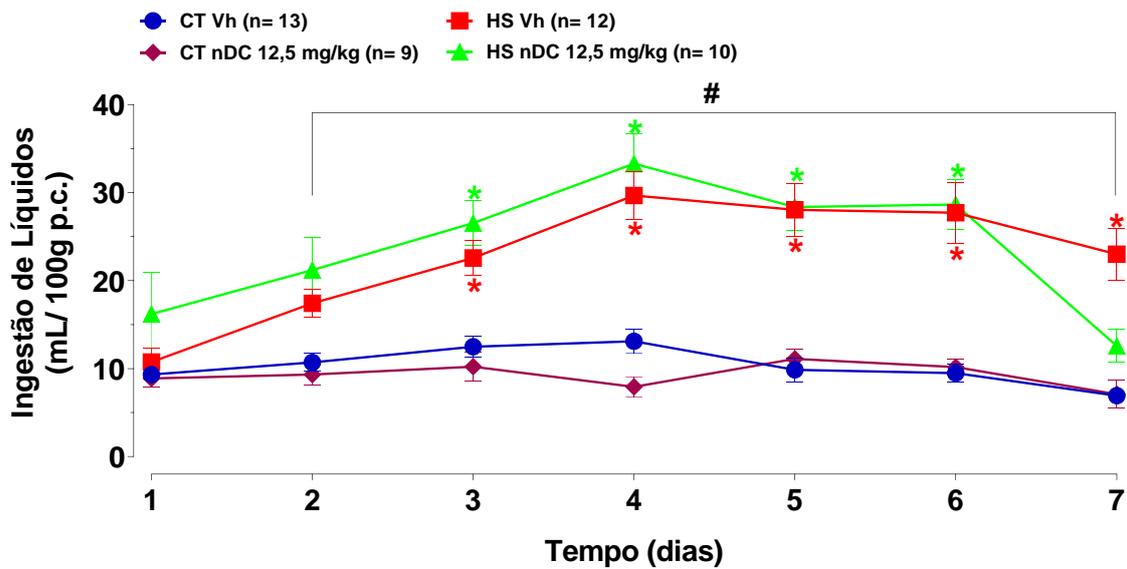


Figura 6: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05.

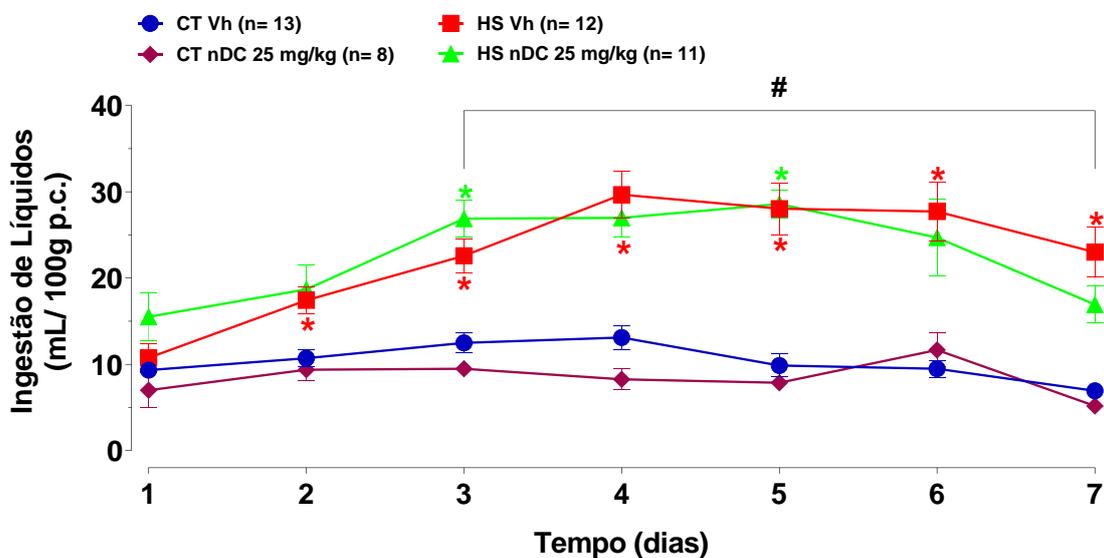
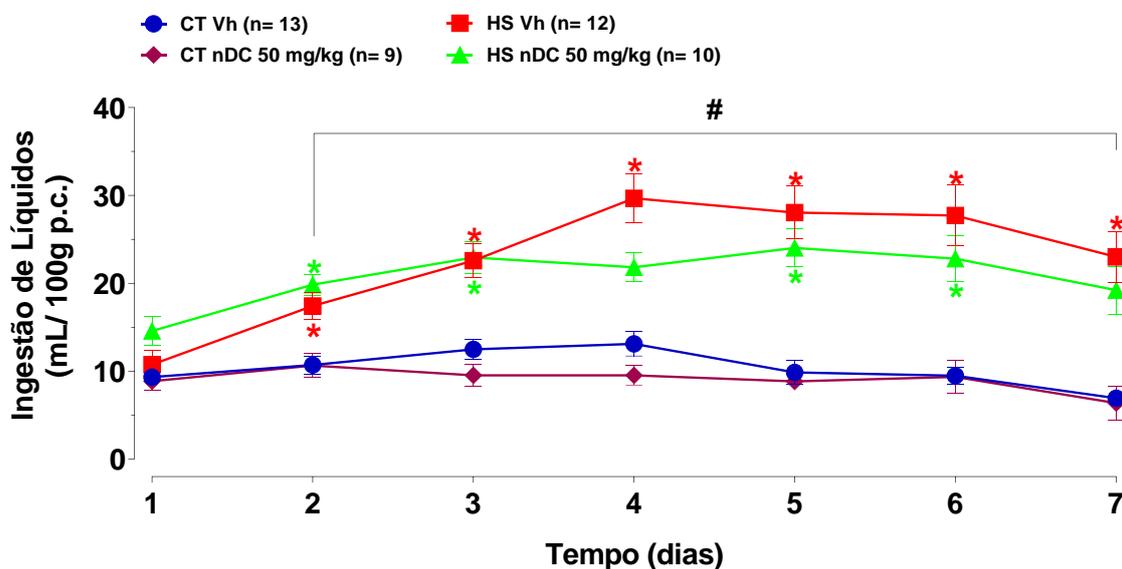


Figura 7: Medidas diárias de ingestão de líquidos (salina hipertônica 2% NaCl – HS; água - CT) durante 7 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 50 mg/kg. Os valores individuais foram expressos em (média ± EPM). O símbolo (#) e a linha demonstram a diferença entre a ingestão de líquidos dos ratos HS em relação aos seus respectivos controles. ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; # (HS Vh e HS nDC diferente de CT Vh e CT nDC) P <0,05; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P <0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P <0,05.



Os dados de peso dos animais não demonstraram diferença entre os grupos (figura 8-a, 9-a e 10-a). Entretanto, o modelo experimental produziu redução de peso ao longo do tempo (figura 8-a). Ademais, o tratamento com a nDC de 12,5 mg/kg (figura 8-a), 25 mg/kg (figura 9-a) e 50 mg/kg (figura 10-a) não alteraram a perda de peso ocasionada pelo modelo experimental. A fim de verificar o peso que foi perdido pelos animais foi calculado o delta (Δ) para perda de peso corporal, subtraindo o peso no último dia do protocolo experimental pelo peso no primeiro dia do protocolo experimental. O Δ demonstrou que os ratos HS Vh perdem cerca de -38 ± 4 g, em contrapartida os ratos CT Vh perdem apenas -5 ± 4 g de peso corporal durante todo o período do protocolo experimental (figura 8-b). Os tratamentos com a nDC não afetaram a perda de peso ocasionada pelo modelo experimental apresentando médias de: -1 ± 6 g CT nDC 12,5 mg/kg; -26 ± 4 g HS nDC 12,5 mg/kg; 10 ± 4 g CT nDC 25 mg/kg; -31 ± 4 g HS nDC 25 mg/kg; -4 ± 6 g CT nDC 50 mg/kg e -42 ± 9 g HS nDC 50 mg/kg. Esses resultados estão demonstrados nas figuras 8-b, 9-b e 10-b respectivamente.

Figura 8: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 12,5 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 12,5 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh $P < 0,05$; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC $P < 0,05$. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC $P < 0,05$.

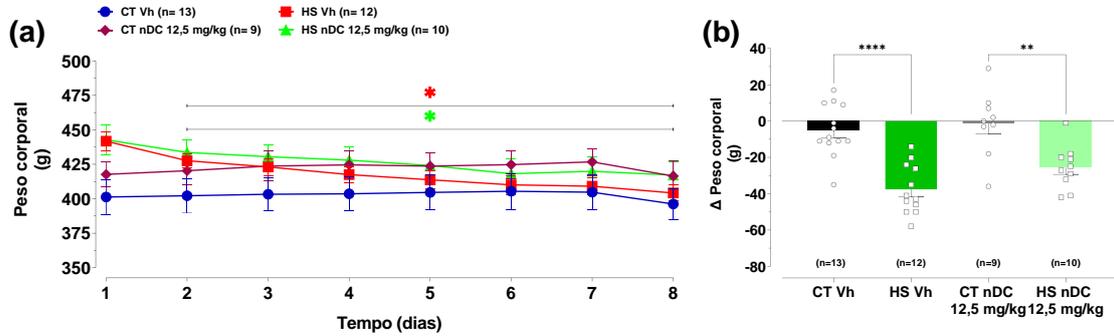


Figura 9: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 25 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh $P < 0,05$; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC $P < 0,05$. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC $P < 0,05$.

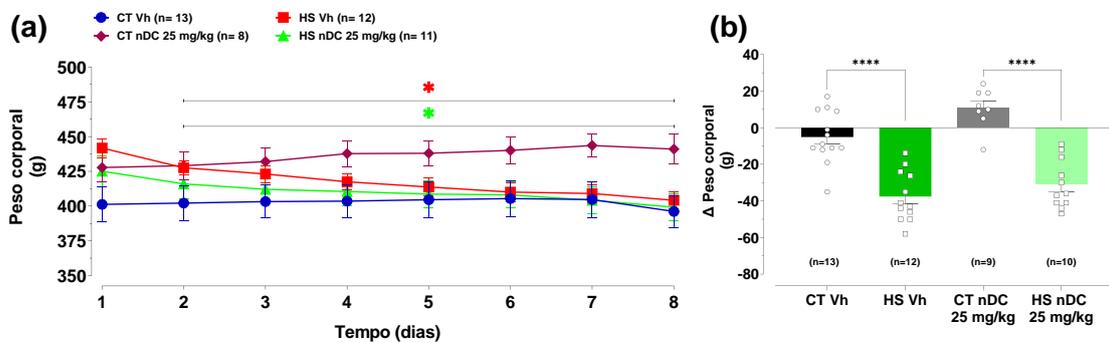
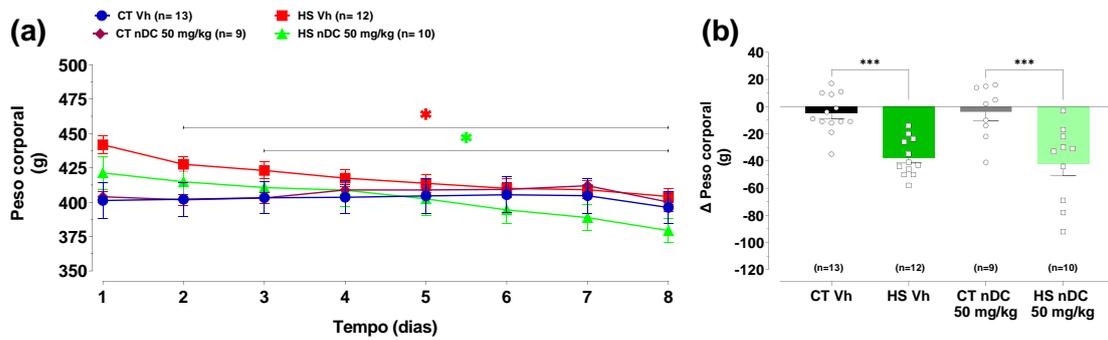


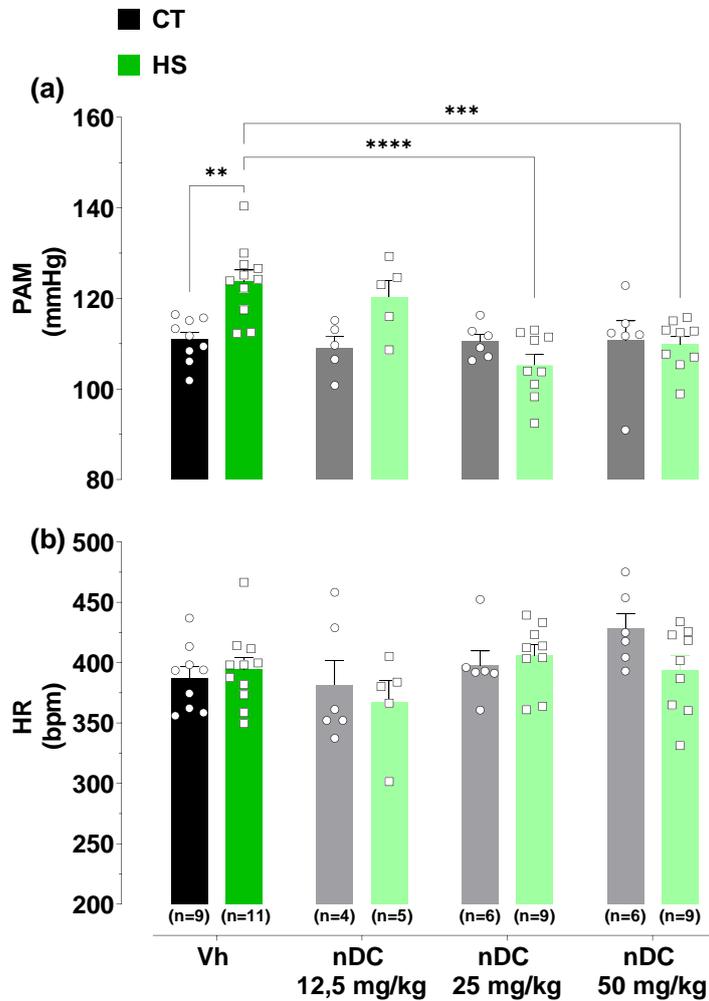
Figura 10: (a) Medidas de peso diárias durante o período de 8 dias do protocolo experimental dos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 50 mg/kg. (b) Δ de perda de peso corporal dos ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 50 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * vermelho diferente do dia 1 para o grupo HS Vh P<0,05; * verde diferente do dia 1 para o grupo HS nDC P<0,05. ANOVA de uma via; * diferença entre HS Vh e HS nDC P<0,05.



6.5 Medida direta de pressão arterial

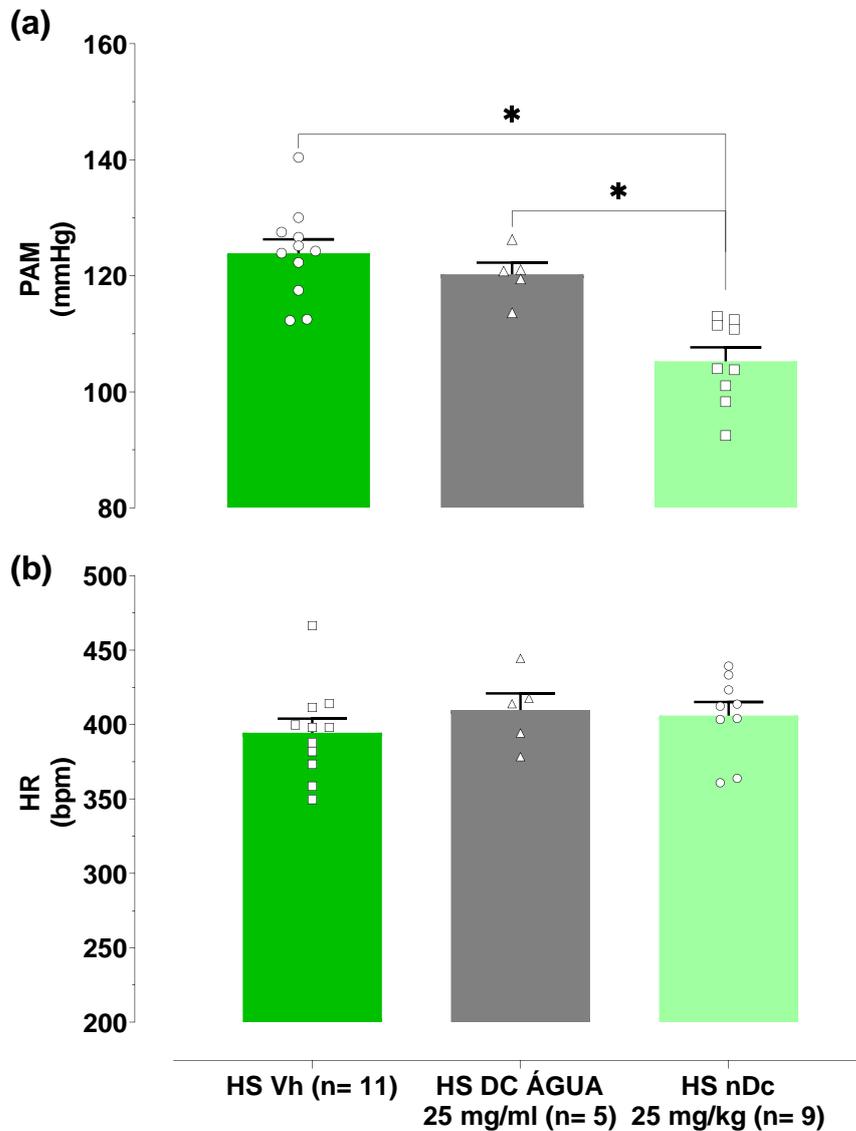
Os dados obtidos por meio da medida direta de PA demonstraram que o modelo de hipertensão proposto foi eficaz para produzir aumento da pressão arterial, uma vez que os ratos HS Vh apresentaram PAM igual a 124 ± 2 mmHg, e os ratos CT Vh apresentaram PAM igual a 111 ± 2 mmHg. A diferença entre as médias de PA dos grupos HS Vh e CT Vh foi de 13 ± 3 mmHg (figura 11-a). Já o tratamento com a nDC na dose de 12,5 mg/kg não demonstrou efeito redutor na PA dos ratos HS, apresentando médias de 120 ± 4 mmHg para o grupo HS e 109 ± 3 para o grupo CT (figura 11-a). Entretanto, o tratamento com a nDC na dose de 25 mg/kg produziu efeito redutor na PA dos ratos HS que obtiveram médias de 105 ± 2 mmHg sem alterar a pressão os ratos CT 111 ± 2 mmHg (figura 11-a). Assim como no tratamento com a nDC 25 mg/kg, o tratamento com a nDC 25mg/kg também foi eficaz na redução da PA dos ratos HS com médias de 110 ± 2 mmHg sem alterar a valores de pressão dos ratos CT que apresentaram médias de 111 ± 4 mmHg (figura 11-a). Outro resultado obtido através da medida direta de pressão, foi a frequência cardíaca (HR) que não foi alterada em nenhum dos grupos (figura 11-b)

Figura 11: Pressão arterial média em repouso (PAM; a) e frequência cardíaca (HR; b) dos ratos HS e CT veículo e os ratos HS e CT tratados com nDC 12,5, 25 e 50 mg/kg. Quadrados dispersos (HS) e círculos (CT) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média ± EPM). ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey; * diferença entre HS Vh P<0,05.



Afim de avaliar se a formulação nano-estruturada estaria produzindo aumento na biodisponibilidade do EtOH-DC, foi realizado o tratamento de ratos HS que passaram pelo mesmo protocolo experimental dos demais animais. Entretanto o tratamento foi realizado com o EtOH-DC na dose de 25 mg/Kg formulado apenas em água. Os resultados indicam que o tratamento com EtOH-DC na dose de 25 mg/Kg formulado em água não foi capaz de produzir redução na PAM dos ratos HS (figura 12-a) e também não alterou a frequência cardíaca dos animais (figura 12-b).

Figura 12: Pressão arterial média em repouso (PAM; a) e frequência cardíaca (HR; b) dos ratos HS veículo, HS tratado com EtOH-DC na dose 25 mg/kg formulado em água e HS tratados com nDC na dose de 25 mg/kg. Círculos dispersos (HS Vh), triângulos dispersos (HS DC ÁGUA) e quadrados dispersos (HS- nDC 25 mg/kg) representam valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Tukey; * entre HS Vh e HS DC ÁGUA $P < 0,05$.

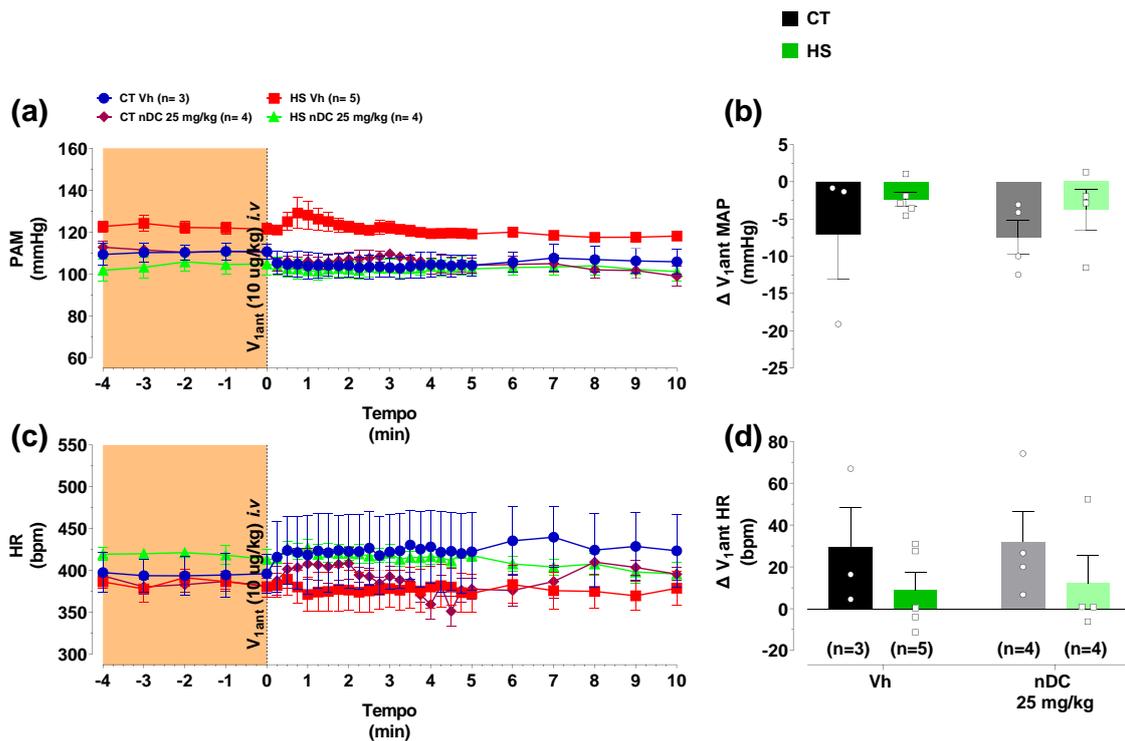


6.6 Medida dos efeitos pressores da vasopressina

A medida da atividade vascular da vasopressina foi realizada durante a medida direta de pressão arterial nos grupos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC na dose de 25 mg/kg, por meio da injeção intravenosa do antagonista de receptores V_1 (V_{1ant}) β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹,O-me-Tyr²,Arg⁸-vasopressin. Os dados indicam que não houve diferença na PAM dos ratos, apresentados na figura 13-a. Para calcular o índice da atividade da vasopressina foi realizado o Δ PAM após a injeção do V_{1ant} que não demonstrou

diferença entre nenhum dos grupos (figura 13-b). Os valores de HR não foram alterados em nenhum dos grupos (figura 13-d e c).

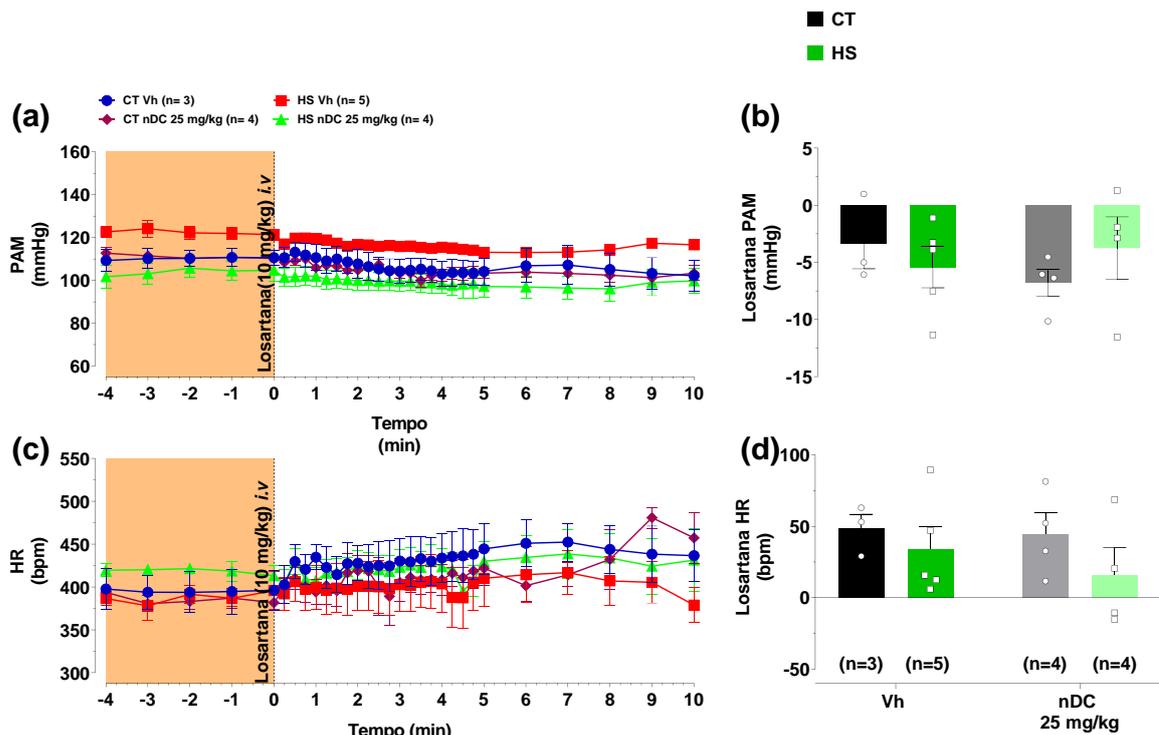
Figura 13: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionyl¹,O-me-Tyr²,Arg⁸-vasopressin (V_{1ant}) 10 μ g/kg nos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. A injeção de V-Pant 10 μ g/kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido a injeção do V_{1ant} foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; $P < 0,05$.



6.7 Medida dos efeitos pressores da angiotensina II

A medida da atividade vascular da Ang II foi realizada durante a medida direta de pressão arterial, por meio da administração intravenosa do antagonista de receptores AT_1 losartana. Os dados não demonstraram efeitos da angiotensina II na PA desses ratos, uma vez que a injeção de losartana não gerou efeito na PAM (figura 14-a e b) ou HR (figura 14-c e d).

Figura 14: Efeitos cardiovasculares da administração intravenosa de losartana 10 mg/ nos ratos HS e CT veículo e HS e CT tratados com nDC 25 mg/kg. A administração de losartana 10 mg/kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido a administração do losartana foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; $P < 0,05$.



6.8 Medida da atividade pressora neurogênica

Para realizar a medida da atividade pressora neurogênica, foi realizado a injeção intravenosa de cloreto hexametônio logo após a injeção das outras drogas (V_{1ant} e losartana). Sendo assim, a medida da atividade pressora neurogênica computa não apenas os efeitos do cloreto de hexametônio, mas também do V_{1ant} e losartana. Os dados até o momento não demonstram efeito pressor neurogênico no modelo experimental utilizado uma vez que não houve diferença na PA dos ratos HS e CT veículo após a injeção de hexametônio (figura 15-a). Assim como não houve alteração de PA dos grupos tratados com nDC 12,5 mg/kg (figura 15-a), 25 mg/kg (figura 16-a) e 50 mg/kg (figura 17-a). O cálculo do índice de atividade pressora neurogênica, realizado pelo delta de PA, não demonstrou diferença entre os grupos HS e CT veículo (figura 15-b). Assim como os ratos HS e CT nDC 12,5, 25 e 50 mg/kg não apresentaram diferença entre o índice de atividade pressora neurogênica (figura 15-b; 16-b e 17-b). A injeção

do cloreto de hexametônio não apresentou diferenças na frequência cardíaca de nenhum dos grupos (figura 15-c e d; figura 16-c e d; figura 17-c e d).

Figura 15: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{1ant} 10 μ g/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 12,5 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh $P < 0,05$.

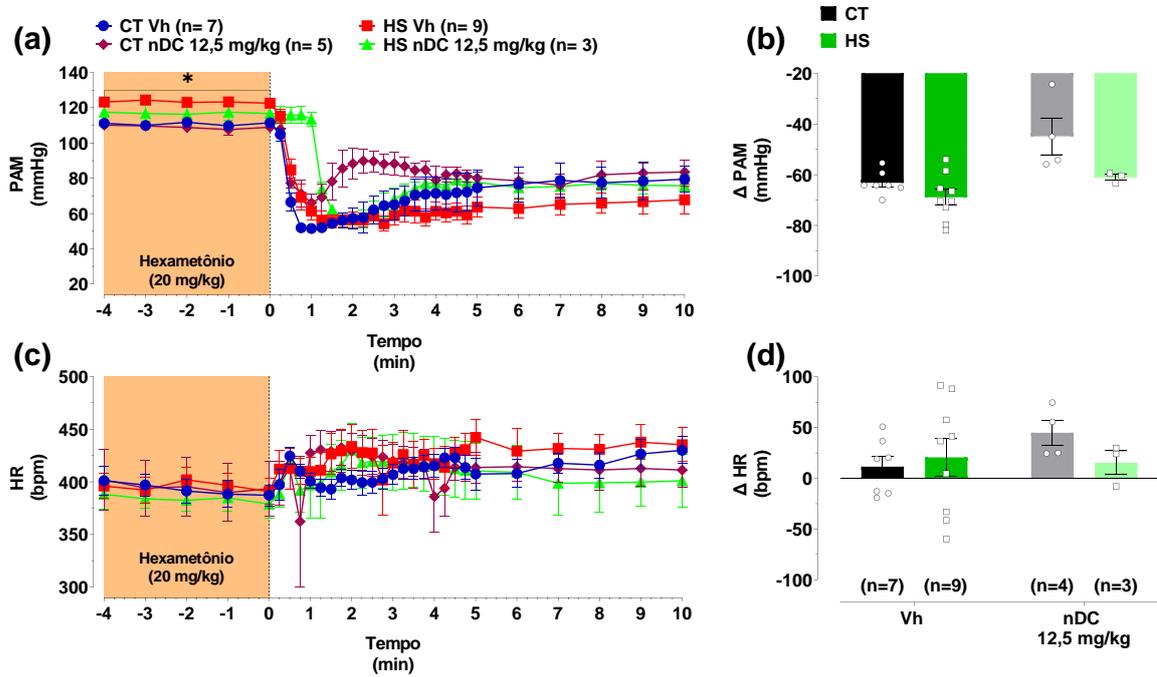


Figura 16: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{1ant} 10 μ g/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 25 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como Δ PAM (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh $P < 0,05$.

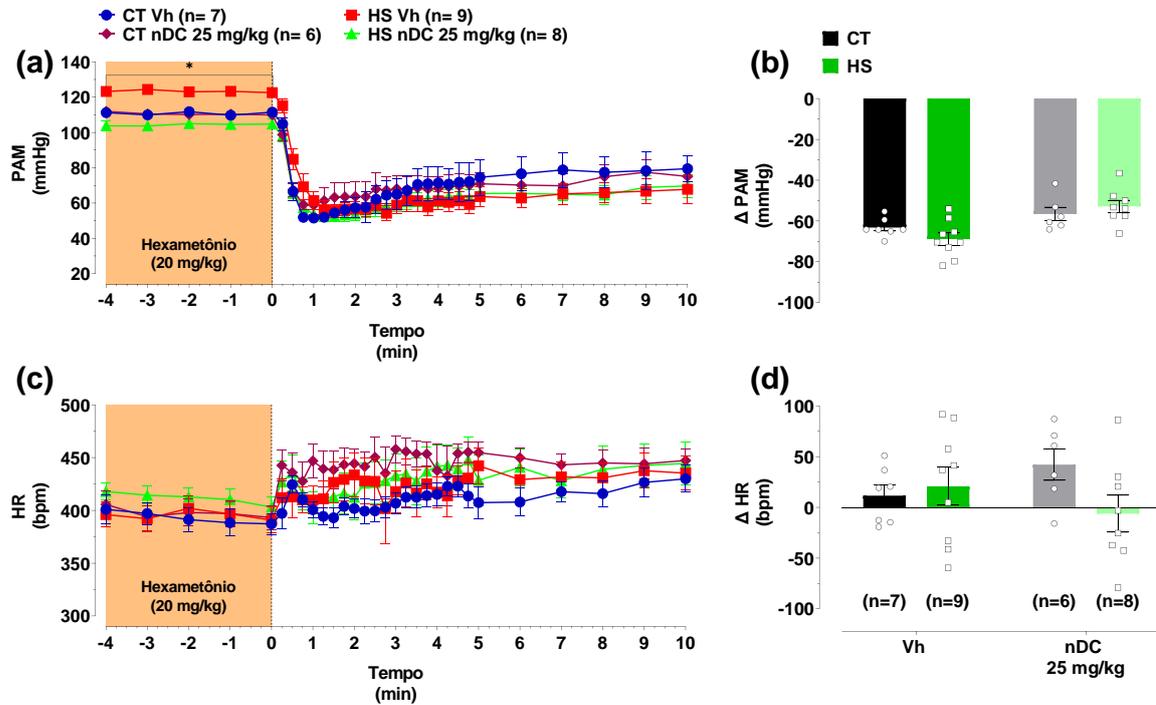
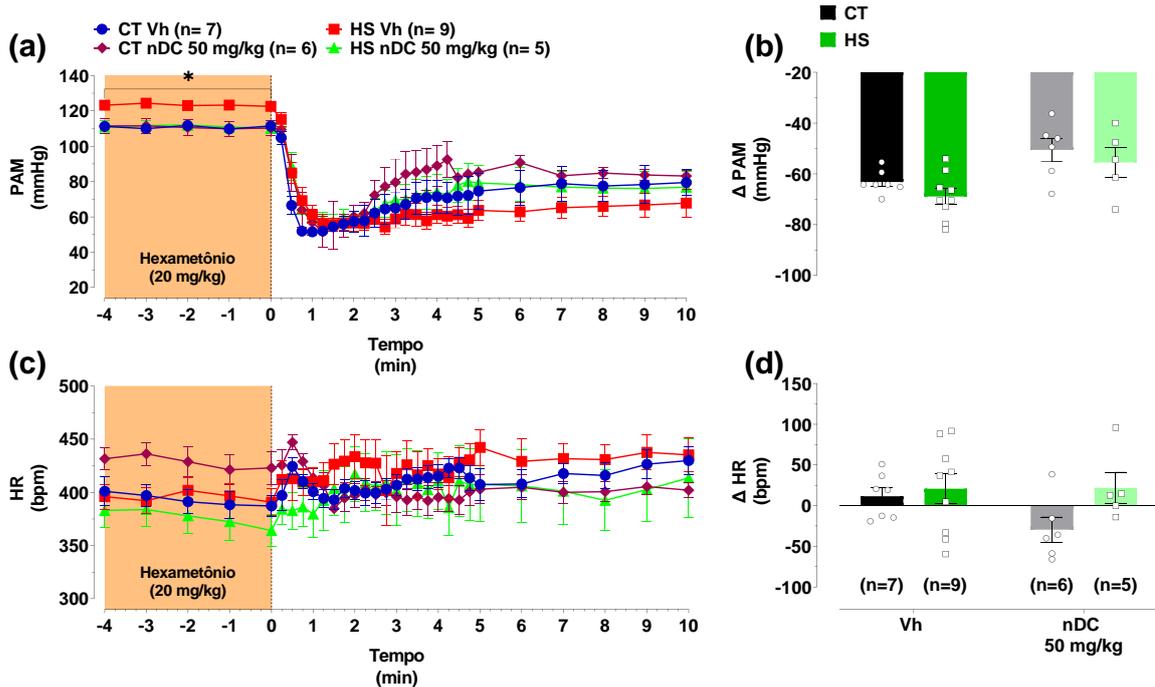


Figura 17: Efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa de V_{1ant} 10 μ g/kg, losartan 10 mg/kg e cloreto de hexametônio 20 mg / kg em ratos HS e CT veículo e HS e CT nDC 50 mg/kg. A injeção de hexametônio 20 mg / kg é indicada por linhas tracejadas verticais em (a e c). Mudanças máximas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (HR) devido ao hexametônio foram calculadas e expressas como Δ MAP (b) e Δ HR (d). Para (b e d), os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias para um fator de repetição (tempo) seguida por pós teste de Tukey; * diferença ao longo do tempo HS Vh $P < 0,05$.



6.9 Análise espectral e avaliação barorreflexa espontânea

Os dados de análise espectral do IC no domínio da frequência não demonstraram diferença em nenhuma das bandas que compõem o espectro (figura 18-b, c e d). Ademais, não foi identificado diferença análise espectral do IC no domínio do tempo RMSSD (figura 18-a).

Além da análise realizada no IC, foi realizada a análise espectral no IS que não identificou diferença entre os grupos para as bandas que compõem o espectro do IS (VLF, LF e HF). Os dados estão demonstrados na figura 19.

Figura 18: Os espectros para as séries temporais do IC foram obtidos pelo software Cardioseries (v2.4) e a variabilidade do IC no domínio da frequência foi dividida em três bandas principais de frequências, muito baixa frequência – VLF (b); baixa frequência – LF (c) e alta frequência – HF (d). A potência média foi calculada para cada banda e os dados expressos como a porcentagem da potência total no espectro. Já a raiz quadrada da média das diferenças sucessivas (RMSSD) expressa em (ms) foi realizada para calcular a variabilidade do IC no domínio do tempo (a). E a relação entre LF/HF também foi demonstrada no painel E. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50 mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; $P < 0,05$.

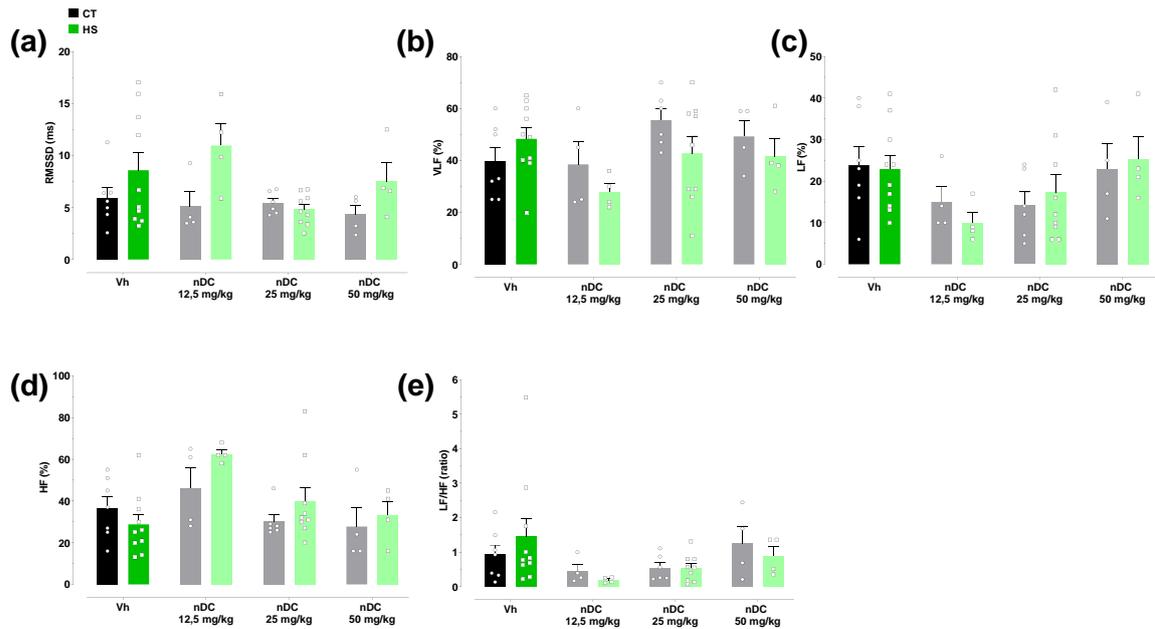
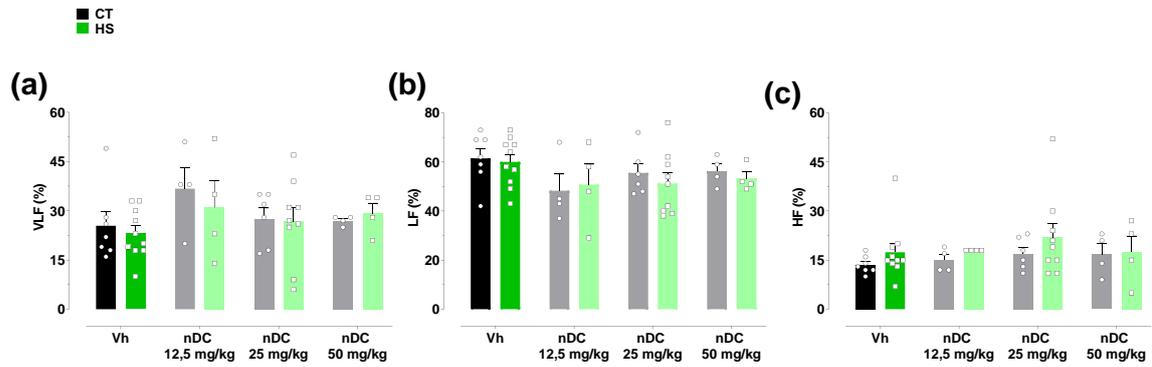
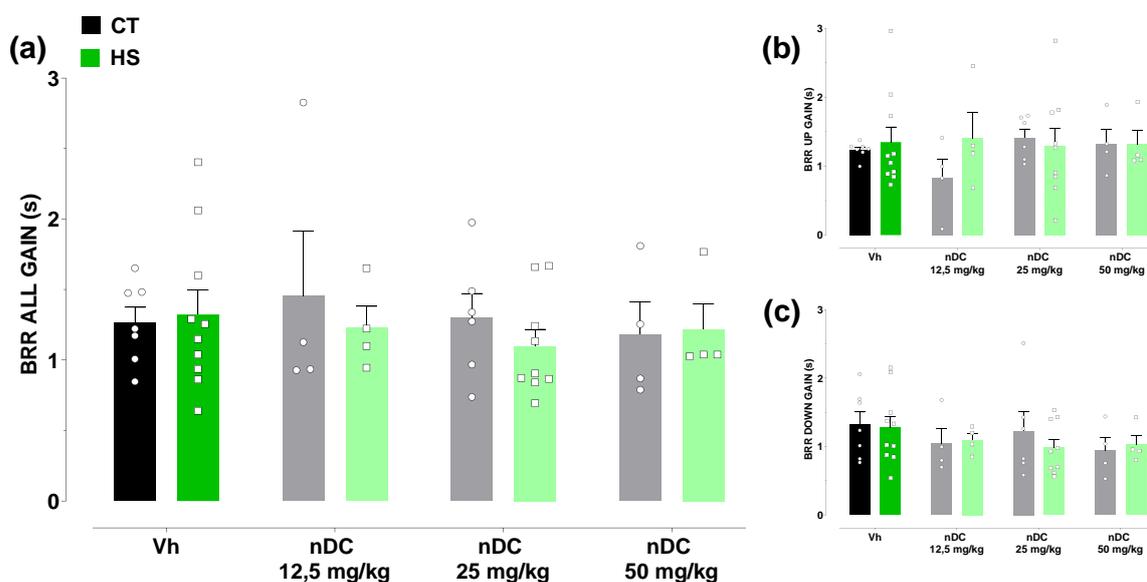


Figura 19: Os espectros para as séries temporais do IS foram obtidos pelo software Cardioseries (v2.4) e a variabilidade do IS no domínio da frequência foi dividida em três bandas principais de frequências, muito baixa frequência – VLF (a); baixa frequência – LF (b) e alta frequência – HF (c). A potência média foi calculada para cada banda e os dados expressos como a porcentagem da potência total no espectro. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50 mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; P <0,05.



Além de realizar o balanço autonômico a análise espectral permite identificar a função barorreflexa espontânea desses ratos que não apresentou diferença entre os grupos. Demonstrado na figura 20.

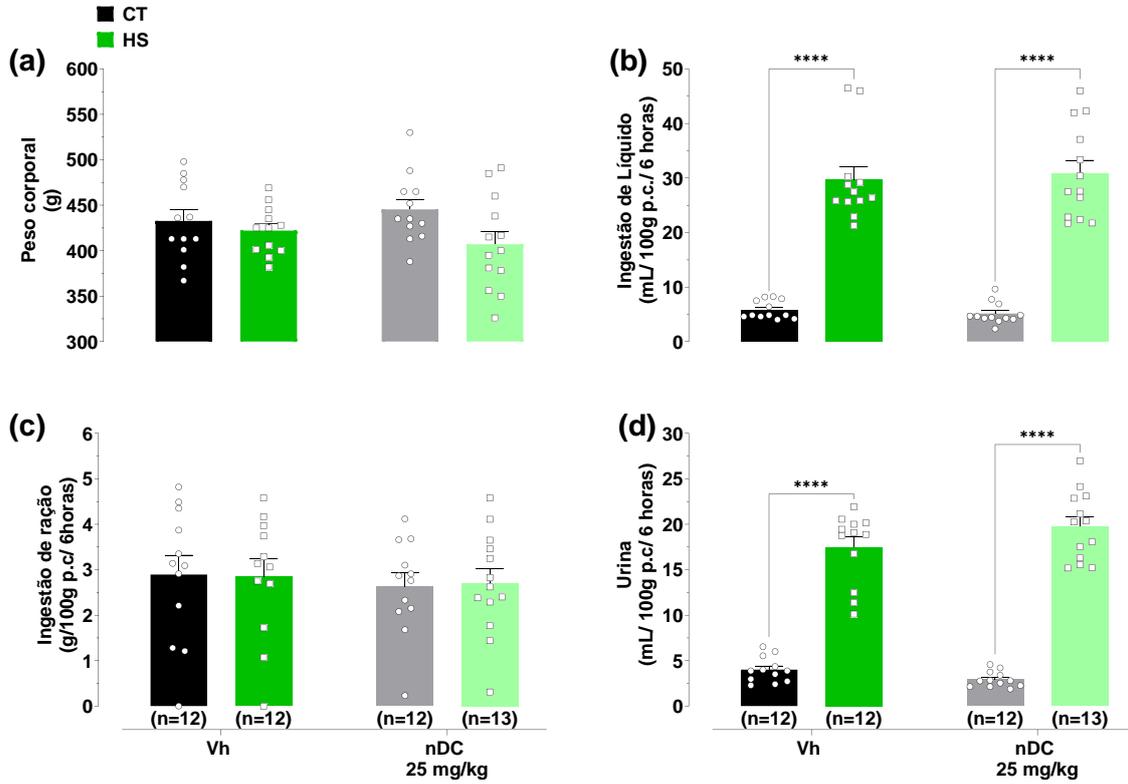
Figura 20: O ganho barorreflexo espontâneo também foi calculado pelo software Cardioseries (v2.4) com base nos dados do IC e IS. O ganho barorreflexo espontâneo total (a) expresso em segundos (s); alto ganho do barorreflexo (b) e baixo ganho barorreflexo (c). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). O n amostral para os grupos CT Vh (n= 7); HS Vh (n= 10); CT nDC 12,5 mg/kg (n= 4); HS nDC 12,5 mg/kg (n= 4); CT nDC 25 mg/kg (n= 6); HS nDC 25 mg/kg (n= 9); CT nDC 50 mg/kg (n= 4) e HS nDC 50 mg/kg (n= 4). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; P <0,05.



7. Medidas de peso, ingestão de líquido, ração e volume urinário dos ratos

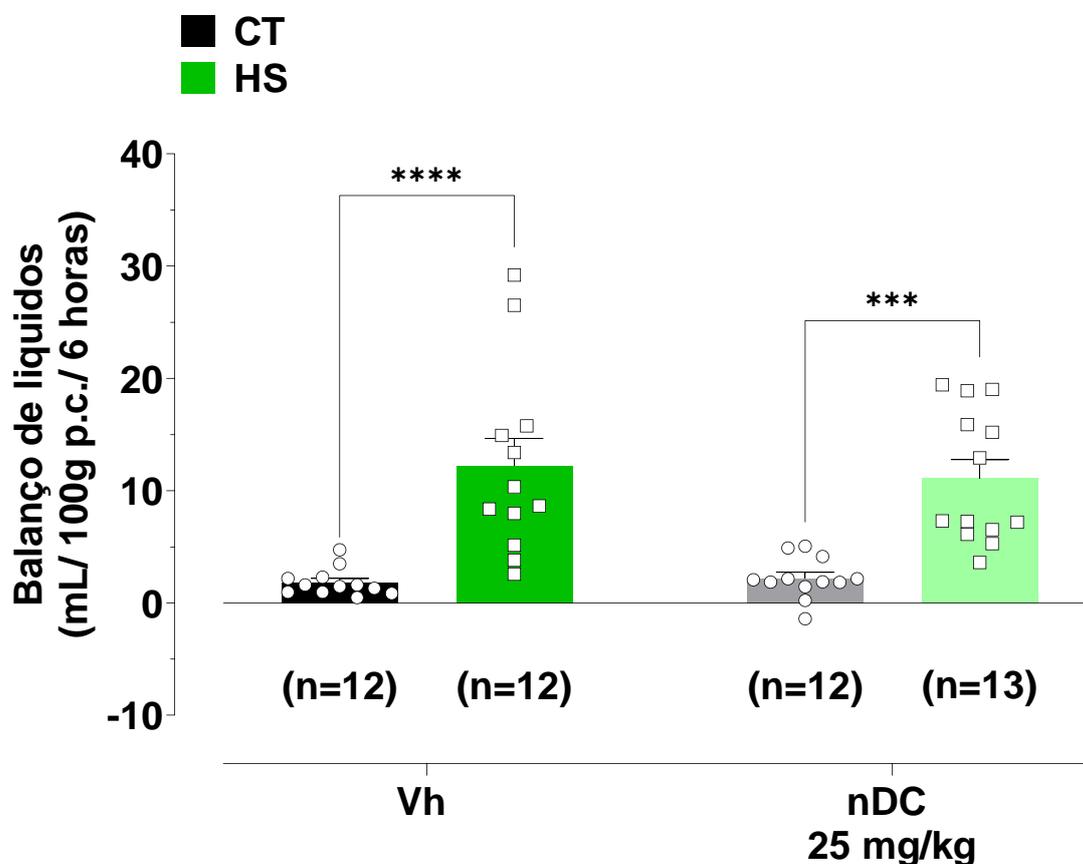
Os dados de obtidos utilizando o equipamento de gaiola metabólica demonstraram que não existe diferença no peso assim como na ingestão de ração dos ratos HS e CT veículos quando comparados com os ratos HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg. Os dados estão apresentados na figura 21 a e c respectivamente. Entretanto, os resultados demonstram que os ratos HS veículo ingerem mais líquido quando comparado com seu respectivo grupo controle. Com médias de 30 ± 2 mL/100 g p.c. e $6 \pm 0,5$ mL/100 g p.c respectivamente. Ademais, os resultados indicam que o tratamento com nDC não afetou a ingestão de líquidos desses ratos, uma vez que os ratos HS nDC 25 mg/kg ingeriram cerca de 31 ± 2 mL/100 g p.c e os ratos CT nDC 25 mg/kg ingeriram 5 ± 1 mL/100 g p.c (figura 21-b e d).

Figura 21: Medidas de peso, ingestão de líquido, ração e volume urinário dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Peso corporal dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (a); ingestão de líquido dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (b); ingestão de ração dos ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (c) e volume urinário ratos HS e CT veículo, HS e CT tratados com a nDC 25 mg/kg (d). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Tukey; * diferente de HS Vh e HS nDC P <0,05.



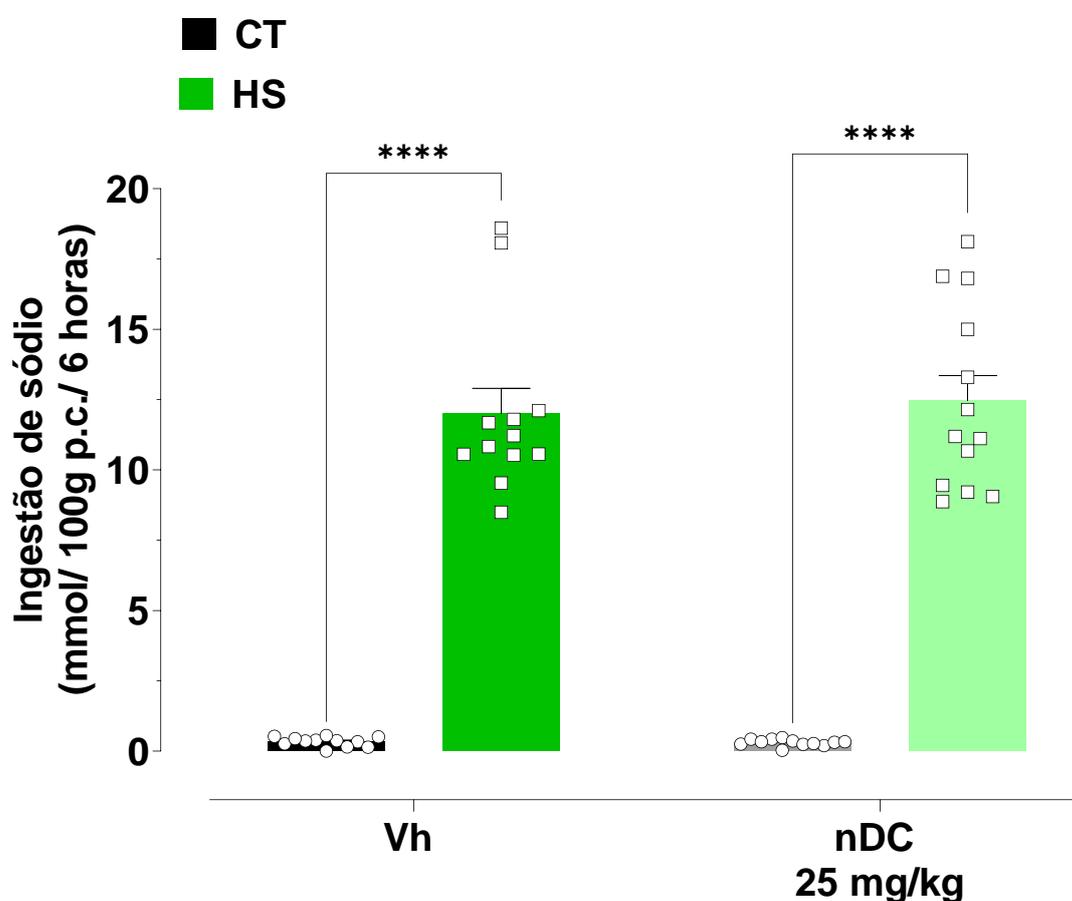
Além de realizar o volume de ingestão de líquidos, foi calculado o balanço de líquido desses animais. Com isso foi observado que os HS veículo aumentam o balanço de líquido quando comparado ao seu respectivo controle, apresentando médias de 12 ± 2 mL/100 g p.c e $2 \pm 0,5$ mL/ 100 g p.c respectivamente. O tratamento com nDC não afetou o balanço de água de ratos uma vez que os ratos HS nDC 25 mg/kg tiveram um balanço de 11 ± 2 mL/100 g p.c e os ratos CT $2 \pm 0,5$ mL/ 100 g p.c (figura 22).

Figura 22: Balanço de líquido dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; * diferente de HS VH e HS nDC $P < 0,05$.



O volume de ingestão de sódio também foi calculado utilizando o volume de ingestão de sódio na ração, com a quantidade de sódio ingerida na salina hipertônica. Com isso, foi observado aumento na ingestão de sódio dos ratos HS veículo (12 ± 1 mmol/ 100 g p.c) e CT veículo (0,3 mmol/ 100 g p.c). O tratamento com nDC na dose de 25 mg/kg não afetou a ingestão de sódio dos ratos, uma vez que os animais HS ingeriram médias de 12 ± 1 mmol/ 100g p.c e os animais CT 0,3 mmol/ 100 g p.c (figura 23).

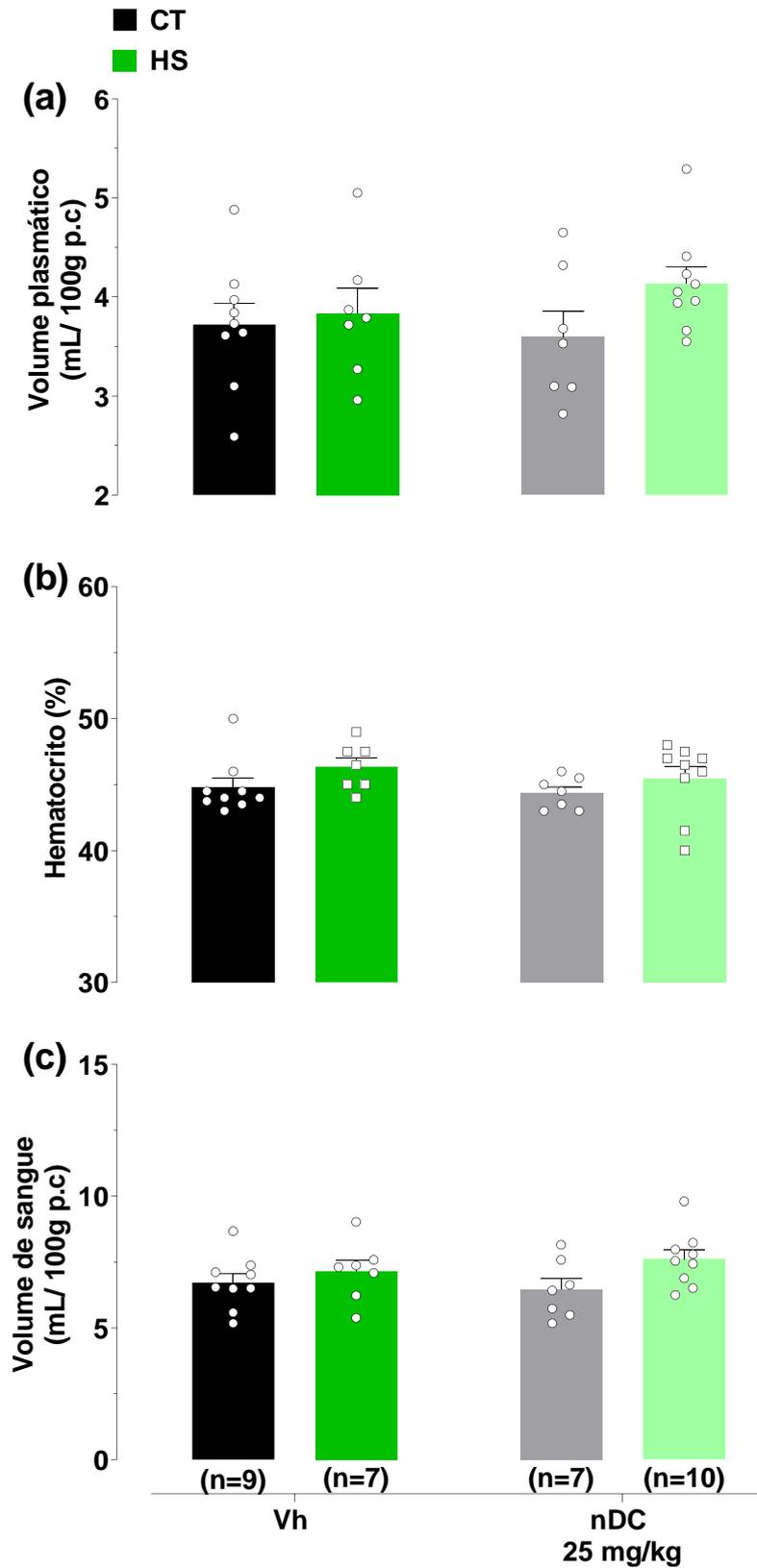
Figura 23: Ingestão de sódio dos ratos submetidos ao equipamento de gaiola metabólica. Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; * diferente de HS VH e HS nDC $P < 0,05$.



7.1 Medidas do volume plasmático, hematócrito e volume de sangue

Por meio da técnica do Azul de Evans foi mensurado o volume de plasma (figura 24-a), o hematócrito (figura 24-b) e o volume sanguíneo (figura 24-c). Foi observado que o modelo experimental utilizado assim como o tratamento com nDC na dose de 25 mg/kg não produz alterações no volume plasmático, hematócrito ou volume de sangue dos ratos.

Figura 24: Volume circulante dos ratos submetidos a técnica de Azul de Evans. Volume plasmático (a); hematócrito (b) e volume de sangue (d). Os quadrados dispersos (HS) e os círculos (CT) representam os valores individuais e as barras representam a média dos grupos (média \pm EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; $P < 0,05$.



8. DISCUSSÃO

Diversos estudos que trabalham com extratos de plantas indicam os efeitos da sazonalidade, da geografia do local e da flora que podem alterar diversas características físico-químicas da planta. A cor, aroma, sabor e composição química são as principais características alteradas por estes três principais fatores (TEIXEIRA; MESSAGE; NEGRI; SALATINO *et al.*, 2010). Os resultados encontrados para a concentração de compostos fenólicos e flavonoides não foi semelhante a alguns achados na literatura. Guimarães e colaboradores encontraram uma quantidade de compostos fenólicos totais $21,18 \pm 0,156$ expressos em μM GAE e flavonoides $13,64 \pm 0,01$ μM expressos em QE (GUIMARÃES; MELLO; PAIVA; BUENO *et al.*, 2012). Outro estudo realizado em 2009 identificou que os compostos fenólicos correspondem a aproximadamente 30% da massa total do extrato utilizado porém não demonstraram o percentual referente aos flavonoides (DE SOUSA; LEITE; JORGE; RESENDE *et al.*, 2011). A diferença na concentração dos compostos fenólicos e flavonoides encontrados por Guimarães e colaboradores pode ter ocorrido devido a diferença na metodologia de extração, em que no estudo em questão os autores realizaram a extração com propileno glicol:H₂O na proporção de (7:3) (GUIMARÃES; MELLO; PAIVA; BUENO *et al.*, 2012). Sendo que estudos demonstram que extratos do tipo etanol:H₂O tendem a apresentar mais compostos devido a polaridade, além da maceração sucessiva que têm por finalidade remover um alto percentual de compostos da matéria prima vegetal (JACOTET-NAVARRO; LAGUERRE; FABIANO-TIXIER; TENON *et al.*, 2018; LI; SMITH; HOSSAIN, 2006). Já no estudo realizado por De Sousa e colaboradores a diferença na concentração de compostos pode ser explicada devido as metodologias distintas que foram utilizadas para calcular a concentração de compostos (DE SOUSA; LEITE; JORGE; RESENDE *et al.*, 2011). Além das diferenças na metodologia, o local e o período de coleta das folhas de DC podem contribuir para diferença nos resultados, devido aos efeitos de sazonalidade e geográficos (DE SOUSA; LEITE; JORGE; RESENDE *et al.*, 2011; ESPÍRITO-SANTO; MADEIRA; NEVES; FARIA *et al.*, 2003).

Para identificação dos compostos voláteis presentes em extratos vegetais é comum utilizar o equipamento de CG-MS. Devido a essa particularidade vários autores utilizaram a técnica para identificar compostos presentes no óleo essencial de DC (FABIANE; FERRONATTO; SANTOS; ONOFRE, 2008; FRIZZO; ATTI-SERAFINI; LAGUNA; CASSEL *et al.*, 2008). Sendo assim, alguns pesquisadores utilizaram a técnica e identificaram

similaridade entre os compostos presentes no extrato etanólico da própolis verde e no extrato etanólico das folhas de DC (CHANG; PILÓ-VELOSO; MORAIS; NASCIMENTO, 2008). A análise de CG-MS realizada neste trabalho identificou compostos já descritos na literatura e que são similares aos compostos presentes na própolis verde, como aromadendrene, spathulenol, globulol e nerolidol (CHANG; PILÓ-VELOSO; MORAIS; NASCIMENTO, 2008; RODRIGUES; DE SOUZA; ARRUDA; PEREIRA *et al.*, 2020). Contudo, foi identificado um número menor de compostos quando comparados com os achados de Junior e colaboradores 2008. A diferença na quantidade de compostos identificados pode estar relacionada a sazonalidade, fatores geográficos ou nos critérios de análise utilizados no trabalho.

Para melhorar a biodisponibilidade e permeabilidade de drogas pouco solúveis em água foi escolhido um sistema de entrega de fármacos diferente, que no caso é a formulação nanoestruturada que desempenha um papel importante na entrega de componentes farmacêuticos. A formulação nano estruturada é caracterizada como uma solução clara, termodinamicamente estável de dois líquidos não solúveis, por exemplo água e óleo estabilizados por moléculas de surfactante (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019). A caracterização dos tamanhos de partícula da nano emulsão não foi semelhante com achados encontrados na literatura para o mesmo tipo de nano emulsão utilizada neste trabalho. Os achados de Goncalves e colaboradores 2019, encontraram um tamanho de partícula de $75,27 \pm 0,04$ nm (GONÇALVES; SANTOS; TAYLOR; PERASOLI *et al.*, 2019). Contudo, a literatura demonstra que os tamanhos das partículas de nano emulsões podem variar de 20 a 600 nm (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019). Portanto o tamanho de partícula encontrado na nano emulsão utilizada neste trabalho está dentro do limite encontrado na literatura. Para identificar a uniformidade dos tamanhos das partículas é realizado o PDI, que nas melhores condições varia entre 0,08 e 0,3. O PDI dentro dessa faixa de dispersão indica melhor uniformidade entre os tamanhos da partícula, enquanto o índice acima de 0,3 indica distribuição ampla do tamanho das partículas (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019). Os dados de PDI obtidos neste trabalho está acima da faixa indicada por Changediya e dos resultados encontrados por Goncalves e seus colaboradores (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019; GONÇALVES; SANTOS; TAYLOR; PERASOLI *et al.*, 2019). Contudo, devido ao tamanho da partícula que está dentro da faixa e que o índice de polidispersão que está acima da faixa apenas de 0,07, a nDC está dentro das características necessárias para veiculação oral via gavagem orogástrica nos ensaios biológicos utilizados neste trabalho.

Com a realização dos ensaios biológicos foi possível identificar que os ratos HS ingeriram um volume superior de líquido, quando comparado com ratos CT. Isso pode ser explicado devido ao modelo experimental utilizado, que causa desidratação intracelular e hipernatremia aguda. A desidratação intracelular e a hipernatremia aguda podem desencadear a ativação de mecanismos de controle da sede (DE LUCA; PEREIRA-DERDERIAN; VENDRAMINI; DAVID *et al.*, 2010; DE LUCA; VENDRAMINI; PEREIRA; COLOMBARI *et al.*, 2007; SCHAFF-BLASS; ROBERTSON; ROSENFELD, 1983). Os mecanismos de controle da sede podem estar ligados a alterações na osmolalidade e concomitante ativação de vias centrais que controlam a liberação de hormônios como AVP e Ang II (MIMA, 2004). O aumento na osmolalidade devido a casos de desidratação podem ativar vias neurais presentes nos OCVs, que levam ao aumento na atividade de neurônios magnocelulares presentes no PVN (BOURQUE AND; OLIET, 1997; BOURQUE, 2008; BOURQUE; OLIET; RICHARD, 1994). Estes neurônios estão intimamente ligados a liberação de AVP pela neuro hipófise (VANDESANDE; DIERICKX, 1975). O aumento de AVP circulante promove aumento na ingestão de líquidos, assim como descrito por Mima e seus colaboradores em 2004 (MIMA, 2004). Além da AVP a Ang II também está ligada com o mecanismo de sede como demonstrado por Matsuda e seus colaboradores. No estudo, os autores demonstraram que a sede pode ser impulsionada por dois grupos distintos de neurônios excitatórios positivos para receptores AT₁ nos OCVs. E que a ablação desses receptores ocasionou a redução da sede nesses animais (MATSUDA; HIYAMA; NIIMURA; MATSUSAKA *et al.*, 2017). Tais mecanismos de controle da sede, sugerem que as alterações causadas pelo modelo experimental possam influenciar nos mecanismos dos ratos HS induzindo sede e concomitante aumento da ingestão de volume da salina hipertônica (2% NaCl), uma vez que os ratos HS não ingerem água. Ademais, os resultados indicam que o tratamento com nDC nas doses de 12,5 ou 50 mg/kg não influenciaram a ingestão de líquidos desses animais. Além disso, foi observado que os ratos HS possuem aumento no volume urinário e aumento no balanço de líquido que possivelmente se deve a alta ingestão de salina hipertônica. Estudos da literatura indicam que animais que ingerem altas quantidades de líquidos possuem aumento no volume urinário, com concomitante aumento no balanço de líquidos desses animais, a fim de manter a osmolaridade e seu balanço hidroeletrólítico (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020).

Devido aos efeitos causados pelo modelo experimental utilizado foi realizada a medida diária de peso corporal de todos os ratos e não foi identificada diferença entre os grupos.

Entretanto, foi observado que os ratos HS perdem peso durante o período do protocolo experimental. Demonstrando que a ingestão de salina (2% NaCl) altera o peso corporal desses animais. Da mesma forma nenhum dos tratamentos interferiu no peso corporal dos ratos, ou seja, o tratamento com nDC não foi capaz de evitar a redução de peso ocasionada pela ingestão de salina hipertônica. A perda de peso pode estar relacionada com os efeitos ocasionados pelo modelo experimental escolhido, que pode induzir desidratação intracelular aguda. Michael Sawka em 2005 no painel de discussões abordou que procedimentos podem ser adotados para avaliar a desidratação. Dentre os procedimentos Michael destaca que avaliações diárias de peso corporal, osmolaridade plasmática e da urina, podem ser biomarcadores para casos de desidratação. De acordo com Michael, aumento na osmolaridade da urina, do plasma ou de perda de peso são indicativos de que o indivíduo esteja passando por um período de desidratação (RITZ; BERRUT, 2005). Além da medida diária de peso, foi realizado a aferição da quantidade de ingestão de ração durante 6 horas e não foi observado alterações entre os demais grupos.

Avaliando o efeito alta ingestão de salina (2% NaCl) foi identificado o aumento da PA dos ratos HS Vh. Estudos matemáticos descrevem que a hipertensão sódio-dependente se caracteriza a partir do momento em que a alta ingestão de sódio promove aumento \geq a 10 mmHg (AVERINA; OTHMER; FINK; OSBORN, 2015). Ademais, esses achados corroboram com dados descritos na literatura que utilizam o mesmo modelo experimental, porém, durante o período de quatro dias (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Alguns possíveis mecanismos podem estar envolvidos com o aumento da PA desses ratos, tais como aumento do tônus simpático e AVP. Vários trabalhos suportam a ideia de que a alta ingestão de sódio promova aumento do tônus simpático levando ao aumento de PA (ADAMS; MCCARTHY; STOCKER, 2008; HA, 2014). Estudos demonstraram que ratos que realizaram alta ingestão de sódio por 12 semanas produziram aumento da atividade simpática induzindo aumento na PA desses ratos (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). No estudo realizado por Ribeiro e seus colaboradores, os pesquisadores demonstraram que ratos submetidos a ingestão de salina hipertônica 2% NaCl durante quatro dias produziram aumento da atividade simpática lombar em conjunto com o aumento da PA (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Além desses dados, os pesquisadores também demonstraram que ratos submetidos a este protocolo experimental possuem aumento da atividade simpática lombar quando submetidos a infusão central de AVP (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS;

FERREIRA-NETO *et al.*, 2015) demonstrando que além dos efeitos vasculares causados pela AVP o peptídeo também possui efeito no controle do tônus simpático (MALPAS; COOTE, 1994; RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015).

Os efeitos com o tratamento de nDC na dose de 25 e 50 mg/kg normalizaram a pressão dos ratos HS quando comparados com seus respectivos controles e reduziu a pressão quando comparado com os ratos HS Vh. Mesmo que estudos com o EtOH-DC para redução da PA seja escasso na literatura, outros estudos com a própolis verde e ou componentes isolados que estão presentes tanto na própolis verde quanto nas folhas de DC já demonstraram efeitos anti-hipertensivos. Em 2004, um grupo de pesquisadores realizaram um experimento com extrato da própolis verde para redução da PA de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O resultado demonstrou que os ratos tratados com o extrato da própolis reduziram a PA (KUBOTA; UMEGAKI; KOBAYASHI; TANAKA *et al.*, 2004). Os autores relacionaram o efeito anti-hipertensivo causado pela própolis verde com sua ação vasodilatadora (KUBOTA; UMEGAKI; KOBAYASHI; TANAKA *et al.*, 2004). Outro estudo demonstrando os efeitos anti-hipertensivos da própolis verde foi demonstrado por Mishima e seus colaboradores em 2005, os autores realizaram os tratamentos com o extrato etanólico da própolis verde em diversas proporções de etanol. Os resultados demonstraram que os ratos SHR tratados reduziram a pressão arterial independente da proporção de etanol presente no extrato (MISHIMA; YOSHIDA; AKINO; SAKAMOTO, 2005). Além dos estudos com o extrato bruto, alguns estudos demonstraram os efeitos anti-hipertensivos e anti-inflamatórios de compostos isolados como artepélina C (PAULINO; ABREU; UTO; KOYAMA *et al.*, 2008), kampferol (DUARTE; PÉREZ VIZCAÍNO; UTRILLA; JIMÉNEZ *et al.*, 1993; KITAMURA; SAITO; FUJIMOTO; NAKASHIMA *et al.*, 2018), Isosakuranetin (MARUYAMA; SUMITOU; SAKAMOTO; ARAKI *et al.*, 2009), ácido cafeoilquínico (CICALA; MORELLO; IORIO; CAPASSO *et al.*, 2003; MISHIMA; YOSHIDA; AKINO; SAKAMOTO, 2005) e ácido p-cumarico (SHIMIZU; SUZUKI, 2019) que estão presentes na própolis verde e nas folhas da DC. Além disso, estudos experimentais que utilizam compostos de origem vegetal tendem a utilizar altas doses para obtenção dos efeitos desejados (DE MIRANDA; LANNA; NASCIMENTO; DE PAULA *et al.*, 2019). Uma das maneiras de reduzir as doses utilizadas em produtos de origem vegetal e o uso de formulações, principalmente formulações nano-emulsionadas que tendem a aumentar a solubilidade do TGI e reduzir a dose de extrato utilizada (SALVIA-TRUJILLO; MARTÍN-BELLOSO; MCCLEMENTS, 2016). A redução da PA dos ratos HS tratados com nDC na dose de 25 mg/kg, foi realizado o tratamento de um grupo distinto de ratos HS com o EtOH-DC

formulado apenas em água na dose de 25 mg/kg. Os resultados indicam que a nDC foi eficaz para aumentar o efeito anti-hipertensivo pertinente ao extrato da DC, uma vez que os ratos tratados com o EtOH-DC formulado em água na dose de 25 mg/kg não reduziram a pressão arterial dos ratos.

Avaliando os efeitos pressores da Ang II e AVP foi realizado a injeção intravenosa do antagonista de receptores AT_1 e V_{1a} , losartana e V_{1ant} , porém não foi identificadas alterações na PA dos ratos submetidos a injeção da droga. A resposta a injeção do losartana e V_{1ant} nos ratos HS sugere baixos níveis de Ang II e AVP circulante uma vez que não houve alteração na PA. Esse resultado pode estar relacionado com mecanismos de feedback negativo, controlando a liberação de Ang II e AVP circulante (ROWLAND; MORIAN, 1999; SCHWEDA, 2015). Ademais, foi avaliada a atividade pressora neurogênica também foi realizada e expressa, como resposta ao V_{1ant} , losartana e cloreto de hexametônio. A literatura descreve que o modelo experimental utilizado produz aumento da atividade pressora neurogênica. Produzindo aumento da atividade simpática lombar nos ratos HS submetidos ao regime hídrico de salina hipertônica 2% NaCl (RIBEIRO; PANIZZA HDO; SANTOS; FERREIRA-NETO *et al.*, 2015). Contudo, os resultados obtidos não demonstraram aumento da atividade pressora neurogênica entre os ratos submetidos a injeção da droga.

A análise espectral foi realizada para identificar se existem alterações no balanço autonômico desses ratos. Avaliando a variabilidade do IC no domínio do tempo e no domínio da frequência. A variabilidade no domínio do tempo foi demonstrada no RMSSD, que de acordo com a literatura está envolvida com arritmia sinusal respiratória (GOLDSTEIN; BENTHO; PARK; SHARABI, 2011). Contudo não foi identificada diferença entre os demais grupos, indicando que a ingestão de salina 2% NaCl não está influenciando na arritmia sinusal respiratória assim como os tratamentos também não interferiram. A variabilidade no domínio da frequência foi identificada e apresentada nas três bandas de frequência VLF, LF e HF. Cada uma das bandas indica contribuições distintas de fatores que influenciam na variabilidade do IC no domínio da frequência. Sendo que VLF está comumente ligado a fatores humorais, LF com alterações na atividade simpática e HF com função respiratória vagal (GOLDSTEIN; BENTHO; PARK; SHARABI, 2011). Nas bandas VLF e LF não foram identificadas diferenças entre os grupos. Esse achado sugere que a ingestão de salina hipertônica 2% NaCl e os tratamentos com nDC e cetoprofeno não estão alterando a atividade humoral ou a atividade simpática desses ratos. Outro resultado obtido por meio da análise espectral do IC ou a relação entre LF/HF que indica se existem oscilações entre a atividade simpática e parassimpática desses

ratos, porém, não houve diferença na relação entre LF/HF destes ratos. Além da análise espectral realizada no IC foi também realizada no IS no domínio da frequência que também é apresentada nas três bandas de frequência VLF, LF e HF. Os dados da variabilidade do IS no domínio da frequência não apresentaram diferença em nenhuma das bandas. Indicando que a variabilidade do IS não sofreu influência da alta ingestão de sódio ou dos tratamentos realizados.

Além da variabilidade no IC e IS, foi avaliada a função barorreflexa desses ratos uma vez que os dados da literatura demonstram que o alto consumo de sódio pode promover alterações barorreflexas espontâneas que podem estar ligadas ao aumento da PA (SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). Porém não foi identificadas alterações barorreflexas nestes animais. Esse resultado sugere que a ingestão de salina hipertônica 2% NaCl e os tratamentos com nDC não interferiram na função barorreflexa destes ratos.

Devido à alta ingestão de salina hipertônica 2% NaCl foi avaliado o volume circulante desses animais. Entretanto, não foi observado diferenças no volume de plasma, sangue e no hematócrito dos ratos submetidos a este protocolo. Esses resultados sugerem que a alta ingestão de salina nos ratos HS não interferem no volume circulante desses ratos, assim como o tratamento com a nDC de 25 mg/kg. Esses dados corroboram com o estudo de Souza e colaboradores (2020) que avaliaram o efeito da alta ingestão de sódio na ração no volume circulante dos animais (SOUZA; BECKER; BATISTA; ASSIS BRAGA *et al.*, 2020). A não alteração no volume pode estar relacionado com o balanço de líquido desses ratos, uma vez que a alta ingestão de salina produziu também aumento no balanço de líquido dos ratos.

9. CONCLUSÃO

O processo de extração utilizado permitiu um bom percentual de extrato EtOH-DC. Assim como as dosagens de compostos fenólicos totais, flavonoides e a identificação de compostos voláteis por CG-MS estão dentro da faixa reportada na literatura. A veiculação oral da nDC de 25 mg/kg foi eficaz para reduzir a PA dos ratos HS sem produzir efeito hipotensor. Aumentar a dose de 25 mg/kg para 50 mg/kg não resultou em aumento no efeito anti-hipertensivo em ratos HS. Entretanto, o tratamento com a nDC na dose de 12,5 mg/kg não foi eficaz para reduzir a PA dos ratos HS, permitindo inferir que a dose mínima efetiva para produzir efeito anti-hipertensivo nesses animais está entre 12,5 e 25 mg/kg. A veiculação do EtOH-DC na dose de 25 mg/kg em água não foi capaz de produzir efeito anti-hipertensivo em ratos HS, indicando que a veiculação de EtOH-DC na forma de nanoemulsão pode representar uma potencialização do efeitos anti-hipertensivos da EtOH-DC que poderia ser traduzida em maior biodisponibilidade dos componentes ativos do extrato. O tratamento não afetou o volume urinário dos ratos HS ou controle, demonstrando que o efeito anti-hipertensivo relacionado a nDC pode não estar relacionado com ação diurética.

Além disso, os dados indicam que a PA dos ratos submetidos a ingestão de salina pode não estar relacionado com a atividade pressora neurogênica. Da mesma forma, o aumento de PA não está relacionado com a atividade pressora da AVP, Ang II ou alterações no volume circulante. Os tratamentos também não afetaram nenhum dos parâmetros citados acima.

10. LIMITAÇÕES

Devido a pandemia da COVID-19, ocorreram limitações para realização de alguns ensaios previstos para este trabalho, como o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para identificação dos compostos presentes na DC e na fração metanólica da nDC. Além disso, as dosagens de Na⁺ e K⁺ no LCR, plasma e urina também foram afetadas devido a pandemia e limitações com os equipamentos que estavam disponíveis.

11. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; BARDGETT, M. E.; STOCKER, S. D. Ventral Lamina Terminalis Mediates Enhanced Cardiovascular Responses of Rostral Ventrolateral Medulla Neurons During Increased Dietary Salt. **Hypertension**, 54, n. 2, p. 308-314, 2009.

ADAMS, J. M.; MADDEN, C. J.; SVED, A. F.; STOCKER, S. D. Increased dietary salt enhances sympathoexcitatory and sympathoinhibitory responses from the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, 50, n. 2, p. 354-359, Aug 2007.

ADAMS, J. M.; MCCARTHY, J. J.; STOCKER, S. D. Excess dietary salt alters angiotensinergic regulation of neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, 52, n. 5, p. 932-937, Nov 2008.

ANTUNES, V. R.; YAO, S. T.; PICKERING, A. E.; MURPHY, D. *et al.* A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. **J Physiol**, 576, n. Pt 2, p. 569-583, Oct 15 2006.

ARMSTRONG, L.; JOHNSON, E. Water Intake, Water Balance, and the Elusive Daily Water Requirement. **Nutrients**, 10, n. 12, p. 1928, 2018.

ASGARY, S.; NADERI, G. H.; SARRAFZADEGAN, N.; MOHAMMADIFARD, N. *et al.* Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. **Drugs Exp Clin Res**, 26, n. 3, p. 89-93, 2000.

AVERINA, V. A.; OTHMER, H. G.; FINK, G. D.; OSBORN, J. W. A mathematical model of salt-sensitive hypertension: the neurogenic hypothesis. **The Journal of physiology**, 593, n. 14, p. 3065-3075, 2015.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Plant Sources of Propolis: An Update from a Chemist's Point of View. **Natural Product Communications**, 1, n. 11, p. 1934578X0600101, 2006.

BESTEN, M. A.; NUNES, D. S.; GRANATO, D.; SENS, S. L. *et al.* VOLATILE COMPONENTS FROM GALLS INDUCED BY *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) ON LEAVES OF *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Química Nova**, 2014.

BEZERRA, J.; SILVA, C.; BORGES, A.; NASCIMENTO, T. *et al.* Análise da composição fitoquímica e doseamento de flavonoides totais dos extratos hidroalcoólicos de *Cyperus iria* L. e *Cyperus articulatus* L. **Diversitas Journal**, 3, p. 228, 09/02 2018.

- BIANCARDI, V. C.; SON, S. J.; AHMADI, S.; FILOSA, J. A. *et al.* Circulating Angiotensin II Gains Access to the Hypothalamus and Brain Stem During Hypertension via Breakdown of the Blood–Brain Barrier. **Hypertension**, 63, n. 3, p. 572-579, 2014.
- BIE, P.; EVANS, R. G. Normotension, hypertension and body fluid regulation: brain and kidney. **Acta Physiol (Oxf)**, 219, n. 1, p. 288-304, Jan 2017.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceutics**, 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004/08// 2004.
- BOUHANICK, B.; VAISSE, B.; SCHAVGOULIDZE, A.; GANDIA, P. [Assessment for antihypertensive drug intake in France in 2019 and adherence]. **Presse Med**, 48, n. 12, p. 1520-1526, Dec 2019.
- BOURQUE AND, C. W.; OLIET, S. H. R. OSMORECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. **Annual Review of Physiology**, 59, n. 1, p. 601-619, 1997.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 7, p. 519-531, Jul 2008.
- BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H. R.; RICHARD, D. Osmoreceptors, Osmoreception, and Osmoregulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 15, n. 3, p. 231-274, 1994.
- BROWN, L.; DUCE, B.; MIRIC, G.; SERNIA, C. Reversal of cardiac fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats by inhibition of the renin-angiotensin system. **J Am Soc Nephrol**, 10 Suppl 11, p. S143-148, Jan 1999.
- BUDZIKOWSKI, A. S.; LEENEN, F. H. H. ANG II in median preoptic nucleus and pressor responses to CSF sodium and high sodium intake in SHR. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 281, n. 3, p. H1210-H1216, 2001/09/01 2001.
- CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. 18, n. 4, p. 549-556, 2008.
- CHANGEDIYA, V. V.; JANI, R.; KAKDE, P. A Review on Nanoemulsions: A Recent Drug Delivery Tool. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 9, n. 5, p. 185-191, 2019.

CHEN, Q. H.; TONEY, G. M. AT1-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 281, n. 6, p. R1844-R1853, 2001/12/01 2001.

CICALA, C.; MORELLO, S.; IORIO, C.; CAPASSO, R. *et al.* Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. **Life sciences**, 73, n. 1, p. 73-80, 2003.

CIPULLO, J. P.; MARTIN, J. F. V.; CIORLIA, L. A. D. S.; GODOY, M. R. P. D. *et al.* Prevalência e fatores de risco para hipertensão em uma população urbana brasileira. 94, n. 4, p. 519-526, 2010.

COOK, N. R.; APPEL, L. J.; WHELTON, P. K. Lower levels of sodium intake and reduced cardiovascular risk. **Circulation**, 129, n. 9, p. 981-989, Mar 4 2014.

CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; HERRERA, M. J.; RUIZ, P. *et al.* Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 47, p. 17985-17990, 2006.

DAHL, L. K.; KNUDSEN, K. D.; HEINE, M.; LEITL, G. Hypertension and Stress. **Nature**, 219, n. 5155, p. 735-736, 1968/08/01 1968.

DE LUCA, L. A., Jr.; VENDRAMINI, R. C.; PEREIRA, D. T. B.; COLOMBARI, D. A. S. *et al.* Water deprivation and the double- depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40, n. 5, p. 707-712, 2007.

DE LUCA, L. A.; PEREIRA-DERDERIAN, D. T. B.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B. *et al.* Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiology & Behavior**, 100, n. 5, p. 535-544, 2010.

DE MIRANDA, M. B.; LANNA, M. F.; NASCIMENTO, A. L. B.; DE PAULA, C. A. *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. **Biomed Pharmacother**, 109, p. 610-620, Jan 2019.

DE SOUSA, J. P.; LEITE, M. F.; JORGE, R. F.; RESENDE, D. O. *et al.* Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011, p. 464289, 2011.

DE WARDENER, H. E.; HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Plasma sodium and hypertension. **Kidney Int**, 66, n. 6, p. 2454-2466, Dec 2004.

DOUGLAS, B. H.; GUYTON, A. C.; LANGSTON, J. B.; BISHOP, V. S. Hypertension caused by salt loading. II: Fluid volume and tissue pressure changes. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, 207, n. 3, p. 669-671, 1964/09/01 1964.

DOYLE, A. E.; SMIRK, F. H. The neurogenic component in hypertension. **Circulation**, 12, n. 4, p. 543-552, Oct 1955.

DUARTE, J.; PÉREZ VIZCAÍNO, F.; UTRILLA, P.; JIMÉNEZ, J. *et al.* Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. **General pharmacology**, 24, n. 4, p. 857-862, 1993.

ELIAS, A. The Effect of Ethanol Psidium guava Leaf Extract on Blood Pressure in Normotensive Guinea Pigs. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, 5, n. 3, p. 47, 2017.

ELLIOTT, P. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. **BMJ**, 297, n. 6644, p. 319-328, 1988.

ESPÍRITO-SANTO, M.; MADEIRA, B.; NEVES, F.; FARIA, M. *et al.* Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. 91, n. 1, p. 13-19, 2003.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C. D.; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, n. 2, p. 197-203, 2008.

FRIZZO, C. D.; ATTI-SERAFINI, L.; LAGUNA, S. E.; CASSEL, E. *et al.* Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, 23, n. 2, p. 99-106, 2008.

GASPARINI, S.; MELO, M. R.; NASCIMENTO, P. A.; ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F. *et al.* Interaction of central angiotensin II and aldosterone on sodium intake and blood pressure. **Brain Res**, 1720, p. 146299, Oct 1 2019.

GIBSON, J. G.; EVANS, W. A. Clinical Studies of the Blood Volume. I. Clinical Application of a Method Employing the Azo Dye "Evans Blue" and the Spectrophotometer. **J Clin Invest**, 16, n. 3, p. 301-316, May 1937.

GOLDSTEIN, D. S.; BENTHO, O.; PARK, M. Y.; SHARABI, Y. Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. **Exp Physiol**, 96, n. 12, p. 1255-1261, Dec 2011.

GOMES, P. M.; SA, R. W. M.; AGUIAR, G. L.; PAES, M. H. S. *et al.* Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 5655, Jul 18 2017.

GONÇALVES, M.; SANTOS, V.; TAYLOR, J.; PERASOLI, F. *et al.* PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A QUERCETIN-TETRAETHYL ETHER-BASED PHOTOPROTECTIVE NANOEMULSION. **Química Nova**, 2019.

GONS, R. A. R.; DE LAAT, K. F.; VAN NORDEN, A. G. W.; VAN OUDHEUSDEN, L. J. B. *et al.* Hypertension and Cerebral Diffusion Tensor Imaging in Small Vessel Disease. **Stroke**, 41, n. 12, p. 2801-2806, 2010.

GRANCE, S. R.; TEIXEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; GUIMARAES, E. B. *et al.* Baccharis trimera: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **J Ethnopharmacol**, 117, n. 1, p. 28-33, Apr 17 2008.

GRONDA, E.; SERAVALLE, G.; BRAMBILLA, G.; COSTANTINO, G. *et al.* Chronic baroreflex activation effects on sympathetic nerve traffic, baroreflex function, and cardiac haemodynamics in heart failure: a proof-of-concept study. **Eur J Heart Fail**, 16, n. 9, p. 977-983, Sep 2014.

GUIMARÃES, N. S. S.; MELLO, J. C.; PAIVA, J. S.; BUENO, P. C. P. *et al.* Baccharis dracunculifolia, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, 50, n. 3, p. 1091-1097, 2012/03/01/ 2012.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat.Rev.Neurosci.**, 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

GUYTON, A. C. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. **Am J Hypertens**, 2, n. 7, p. 575-585, Jul 1989.

HA, S. K. Dietary salt intake and hypertension. **Electrolyte Blood Press**, 12, n. 1, p. 7-18, Jun 2014.

HADI, A.; POURMASOUMI, M.; GHAEDI, E.; SAHEBKAR, A. The effect of Curcumin/Turmeric on blood pressure modulation: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacol Res**, 150, p. 104505, Dec 2019.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. **Prog Cardiovasc Dis**, 52, n. 5, p. 363-382, Mar-Apr 2010.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Salt intake, plasma sodium, and worldwide salt reduction. **Ann Med**, 44 Suppl 1, p. S127-137, Jun 2012.

IYER, A.; CHAN, V.; BROWN, L. The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. **Curr Cardiol Rev**, 6, n. 4, p. 291-297, Nov 2010.

JACOTET-NAVARRO, M.; LAGUERRE, M.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; TENON, M. *et al.* What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. **ELECTROPHORESIS**, 39, n. 15, p. 1946-1956, 2018.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

JAQUELINE, S.; SHIRLEY, K.; GIULIANO PEREIRA DE, B.; MARIA BEATRIZ, V. *et al.* Development of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) Essential Oil Nanoemulsion and Its Biological Activity on Pre-pupae of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 7, n. 6, 2019.

KANJANAHATTAKIJ, N.; KWANKHAO, P.; VATHE SATOGKIT, P.; THONGMUNG, N. *et al.* Herbal or traditional medicine consumption in a Thai worker population: pattern of use and therapeutic control in chronic diseases. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 19, 12/01 2019.

- KARAMI, Z.; SAGHATCHI ZANJANI, M. R.; HAMIDI, M. Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. **Drug Discovery Today**, 24, n. 5, p. 1104-1115, 2019.
- KIM, C. K.; CHO, Y. J.; GAO, Z. G. Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery. **J Control Release**, 70, n. 1-2, p. 149-155, Jan 29 2001.
- KITAMURA, H.; SAITO, N.; FUJIMOTO, J.; NAKASHIMA, K.-I. *et al.* Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro. **BMC complementary and alternative medicine**, 18, n. 1, p. 138-138, 2018.
- KUBOTA, Y.; UMEGAKI, K.; KOBAYASHI, K.; TANAKA, N. *et al.* Anti-hypertensive effects of Brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 31 Suppl 2, p. S29-30, Dec 2004.
- KULKARNI, S.; O'FARRELL, I.; ERASI, M.; KOCHAR, M. S. Stress and hypertension. **Wmj**, 97, n. 11, p. 34-38, Dec 1998.
- LI, B. B.; SMITH, B.; HOSSAIN, M. M. Extraction of phenolics from citrus peels. **Separation and Purification Technology**, 48, n. 2, p. 182-188, 2006.
- LI, P.; MORRIS, M.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. *et al.* Role of paraventricular angiotensin AT1 receptors in salt-sensitive hypertension in mRen-2 transgenic rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 270, n. 5, p. R1178-R1181, 1996/05/01 1996.
- MALPAS, S. C.; COOTE, J. H. Role of vasopressin in sympathetic response to paraventricular nucleus stimulation in anesthetized rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 266, n. 1, p. R228-R236, 1994/01/01 1994.
- MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; QUEIROGA, C. L. *et al.* Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, n. 1, p. 178-181, 2008.

MARUYAMA, H.; SUMITOU, Y.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y. *et al.* Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull**, 32, n. 7, p. 1244-1250, Jul 2009.

MATSUDA, T.; HIYAMA, T. Y.; NIIMURA, F.; MATSUSAKA, T. *et al.* Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nature Neuroscience**, 20, n. 2, p. 230-241, 2017.

MAW, A. M.; THOMPSON, L. E.; HO, P. M.; KENNEDY, K. F. *et al.* Implications of Guideline Updates for the Management of Apparent Treatment Resistant Hypertension in the United States (A NCDR Research to Practice [R2P] Project). **Am J Cardiol**, 125, n. 1, p. 63-67, Jan 1 2020.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, F.; XIAO, H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. **Annu Rev Food Sci Technol**, 6, p. 299-327, 2015.

MIMA, E. Effects of angiotensin and vasopressin V1 receptors on water and sodium intake induced by injection of vasopressin into lateral septal area. **Regulatory Peptides**, 118, n. 3, p. 159-164, 2004.

MISHIMA, S.; YOSHIDA, C.; AKINO, S.; SAKAMOTO, T. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull**, 28, n. 10, p. 1909-1914, Oct 2005.

NICKENIG, G.; STREHLOW, K.; ROELING, J.; ZOLK, O. *et al.* Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. **Hypertension**, 31, n. 6, p. 1272-1277, Jun 1998.

NODA, M. Sodium-level-sensitive Sodium Channel and Salt-Intake Behavior. 30, n. Supplement 1, p. i44-i45, 2005.

NODA, M.; SAKUTA, H. Central regulation of body-fluid homeostasis. **Trends Neurosci**, 36, n. 11, p. 661-673, Nov 2013.

NOMURA, K.; HIYAMA, T. Y.; SAKUTA, H.; MATSUDA, T. *et al.* [Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a. **Neuron**, 2018/11/29/ 2018.

- OSBORN, J. L. Relation between sodium intake, renal function, and the regulation of arterial pressure. **Hypertension**, 17, n. 1 Suppl, p. I91-96, Jan 1991.
- OSBORN, J. W.; FINK, G. D.; KUROKI, M. T. Neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension: implications for therapies targeting neural control of the splanchnic circulation. **Curr Hypertens Rep**, 13, n. 3, p. 221-228, Jun 2011.
- OSBORN, J. W.; PROVO, B. J.; MONTANA, J. S.; TROSTEL, K. A. Salt-sensitive hypertension caused by long-term alpha-adrenergic blockade in the rat. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, 21, n. 6 Pt 2, p. 995-999, 1993.
- PANDEY, M.; CHOUDHURY, H.; YEUN, O. C.; YIN, H. M. *et al.* Perspectives of Nanoemulsion Strategies in The Improvement of Oral, Parenteral and Transdermal Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 19, n. 4, p. 276-292, // 2018.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002/04/01 2002.
- PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **J Agric Food Chem**, 52, n. 5, p. 1100-1103, Mar 10 2004.
- PARKES, W. E. Thoracolumbar sympathectomy in hypertension. **British heart journal**, 20, n. 2, p. 249-252, 1958.
- PAULINO, N.; ABREU, S. R.; UTO, Y.; KOYAMA, D. *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **Eur J Pharmacol**, 587, n. 1-3, p. 296-301, Jun 10 2008.
- PAWLOSKI-DAHM, C. M.; GORDON, F. J. Increased dietary salt sensitizes vasomotor neurons of the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, 22, n. 6, p. 929-933, 1993.
- RAWAT, P.; SINGH, P. K.; KUMAR, V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. 6, n. 3, p. 107-118, 2016.
- RIBEIRO, N.; PANIZZA HDO, N.; SANTOS, K. M.; FERREIRA-NETO, H. C. *et al.* Salt-induced sympathoexcitation involves vasopressin V1a receptor activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 309, n. 11, p. R1369-1379, Dec 1 2015.

- RITZ, P.; BERRUT, G. The Importance of Good Hydration for Day-to-Day Health. **Nutrition Reviews**, 63, p. S6-S13, 2005.
- RODRIGUES, D. M.; DE SOUZA, M. C.; ARRUDA, C.; PEREIRA, R. A. S. *et al.* The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, 46, n. 2, p. 150-162, 2020.
- ROWLAND, N. E.; MORIAN, K. R. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. 276, n. 5, p. R1453-R1460, 1999.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCCLEMENTS, D. Excipient Nanoemulsions for Improving Oral Bioavailability of Bioactives. **Nanomaterials**, 6, n. 1, p. 17, 2016.
- SAMY, R. P.; PUSHPARAJ, P. N.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A compilation of bioactive compounds from Ayurveda. **Bioinformation**, 3, n. 3, p. 100-110, 2008.
- SANTAJULIANA, D.; HORNFELDT, B. J.; OSBORN, J. W. Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 35, n. 1, p. 45-54, Feb 1996.
- SCHAFF-BLASS, E.; ROBERTSON, G. L.; ROSENFELD, R. L. Chronic hypernatremia from a congenital defect in osmoregulation of thirst and vasopressin. **The Journal of Pediatrics**, 102, n. 5, p. 703-708, 1983.
- SCHIFFRIN, E. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. **American Journal of Hypertension**, 14, n. 11, p. S83-S89, 2001.
- SCHMIDLIN, O.; FORMAN, A.; SEBASTIAN, A.; MORRIS, R. C. Sodium-Selective Salt Sensitivity. **Hypertension**, 50, n. 6, p. 1085-1092, 2007.
- SCHWEDA, F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, 467, n. 3, p. 565-576, March 01 2015. journal article.

SELYE, H.; HALL, C. E.; ROWLEY, E. M. Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. **Canadian Medical Association journal**, 49, n. 2, p. 88-92, 1943.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J. *et al.*, 2008, **Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing Tween 80**.

SHIMIZU, Y.; SUZUKI, T. Brazilian propolis extract reduces intestinal barrier defects and inflammation in a colitic mouse model. **Nutr Res**, 69, p. 30-41, Sep 2019.

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**, 2015, p. 206439, 2015.

SILVA, L. M. R. d.; FIGUEIREDO, E. A. T. d.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 143, p. 398-404, 2014/01/15/ 2014.

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food and Chemical Toxicology**, 45, n. 7, p. 1216-1223, 2007/07/01/ 2007.

SOUZA, J. A.; BECKER, L. K.; BATISTA, M. A. C.; ASSIS BRAGA, D. C. *et al.* Swimming training improves cardiovascular autonomic dysfunctions and prevents renal damage in rats fed a high-sodium diet from weaning. **Experimental Physiology**, 2020.

STOCKER, S. D.; KINSMAN, B. J.; SVED, A. F. Recent Advances in Neurogenic Hypertension. **Hypertension**, 70, n. 3, p. 474-478, 2017.

STOCKER, S. D.; MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Excess dietary salt intake alters the excitability of central sympathetic networks. **Physiol Behav**, 100, n. 5, p. 519-524, Jul 14 2010.

STOCKER, S. D.; OSBORN, J. L.; CARMICHAEL, S. P. Forebrain osmotic regulation of the sympathetic nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 35, n. 5-6, p. 695-700, May 2008.

TABIBI, S. E. Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems. Volume 2. Edited by Herbert A. Lieberman, Martin M. Reiger, and Gilbert S. Banker. Marcel Dekker: New York. 1989. 26 × 18 cm. xx + 690 pp. \$125.00. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 79, n. 9, p. 856-856, 1990/09/01 1990. <https://doi.org/10.1002/jps.2600790927>.

TASHAKORI-SABZEVAR, F.; RAZAVI, B. M.; IMENSHAHIDI, M.; DANESHMANDI, M. *et al.* Evaluation of mechanism for antihypertensive and vasorelaxant effects of hexanic and hydroalcoholic extracts of celery seed in normotensive and hypertensive rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 26, n. 5, p. 619-626, 2016.

TEAGARDEN, D. L.; BAKER, D. S. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 15, n. 2, p. 115-133, 2002/03/01/ 2002.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A. *et al.* Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, 7, n. 3, p. 307-315, 2010.

TONEY, G. M.; CHEN, Q. H.; CATO, M. J.; STOCKER, S. D. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. **Acta Physiologica Scandinavica**, 177, n. 1, p. 43-55, 2003.

TONEY, G. M.; STOCKER, S. D. Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease. **J Physiol**, 588, n. Pt 18, p. 3375-3384, Sep 15 2010.

UNGER, T.; BORGHI, C.; CHARCHAR, F.; KHAN, N. A. *et al.* 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. **Hypertension**, 75, n. 6, p. 1334-1357, 2020.

VAHEKENI, N.; NETO, P. M.; KAYIMBO, M. K.; MÄSER, P. *et al.* Use of herbal remedies in the management of sleeping sickness in four northern provinces of Angola. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112382, 2019/11/16/ 2019.

VAN HUYSSSE, J. W.; AMIN, M. S.; YANG, B.; LEENEN, F. H. H. Salt-Induced Hypertension in a Mouse Model of Liddle Syndrome Is Mediated by Epithelial Sodium Channels in the Brain. **Hypertension**, 60, n. 3, p. 691-696, 2012.

VANDESANDE, F.; DIERICKX, K. Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. **Cell and Tissue Research**, 164, n. 2, 1975.

VERMA, S.; KUMAR, N.; KUMAR, E. U.; JAIN, G. NANOEMULSION: AN EXCEPTIONAL MODE FOR DELIVERY OF POORLY SOLUBLE DRUG. **WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES**, 7, 01/01 2018.

- VIEIRA, A. A.; COLOMBARI, E.; DE LUCA, L. A.; COLOMBARI, D. S. A. *et al.* Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. **Brain Research**, 1322, p. 72-80, 2010.
- WAGNER, J. G.; GERARD, E. S.; KAISER, D. G. The effect of the dosage form on serum levels of indoxole. **Clin Pharmacol Ther**, 7, n. 5, p. 610-619, Sep-Oct 1966.
- WEIDMANN, P. Recent pathogenic aspects in essential hypertension and hypertension associated with diabetes mellitus. 58, n. 19, p. 1071-1089, 1980.
- WEINBERGER, M. H. Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 5, n. 3, p. 205-208, May 1996.
- WHO. **WHO/ISH Hypertension guidelines**. 2020. Disponível em: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/hypertension/en/. Acesso em: 06/01.
- YOSHIMOTO, M.; ONISHI, Y.; MINEYAMA, N.; IKEGAME, S. *et al.* Renal and Lumbar Sympathetic Nerve Activity During Development of Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats. **Hypertension**, 74, n. 4, p. 888-895, 2019.
- ZHU, H.; LU, Y.; WANG, X.; SNIEDER, H. *et al.* The G Protein-Coupled Receptor Kinase 4 Gene Modulates Stress-Induced Sodium Excretion in Black Normotensive Adolescents. 60, n. 4, p. 440-442, 2006.

ANEXO 1: SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AF39876

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AF39876**
Usuário: **UFOP**
CPF/CNPJ: **23.070.659/0001-10**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Baccharis dracunculifolia

Título da Atividade: **Avaliação do possível efeito anti-hipertensiva do extrato hidro alcóolico de Baccharis dracunculifolia em ratos com sobrecarga de sódio**

Equipe

Leonardo Máximo Cardoso	UFOP
Marcos Adriano Calos Batista	UFOP
Sandra Aparecida Lima de Moura	UFOP

Data do Cadastro: **26/05/2020 17:16:27**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:19** de **26/05/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 2: Certificado de aprovação no comitê de ética animal



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito anti-hipertensivo e anti-inflamatório de uma formulação a base de extrato de *Baccharis dracunculifolia* em ratos Wistar com sobrecarga de sódio", protocolada sob o CEUA nº 2902070520 (ID 000398), sob a responsabilidade de **Leonardo Máximo Cardoso e equipe; Marcos Adriano Carlos Batista; Marina Gonçalves Caetano de Andrade; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas ; Daiane Cristina de Assis Braga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 22/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the antihypertensive and anti-inflammatory effect of a formulation based on *Baccharis dracunculifolia* extract in Wistar rats under sodium overload", utilizing 748 Heterogenics rats (748 males), protocol number CEUA 2902070520 (ID 000398), under the responsibility of **Leonardo Máximo Cardoso and team; Marcos Adriano Carlos Batista; Marina Gonçalves Caetano de Andrade; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas ; Daiane Cristina de Assis Braga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 06/22/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2020](#) a [11/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [85 a 95 dias](#)

N: [748](#)

Linagem: [Wistar](#)

Peso: [350 a 400 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular ICEB II, sala 46. Laboratório de Hipertensão do ICEB

Ouro Preto, 23 de junho de 2020

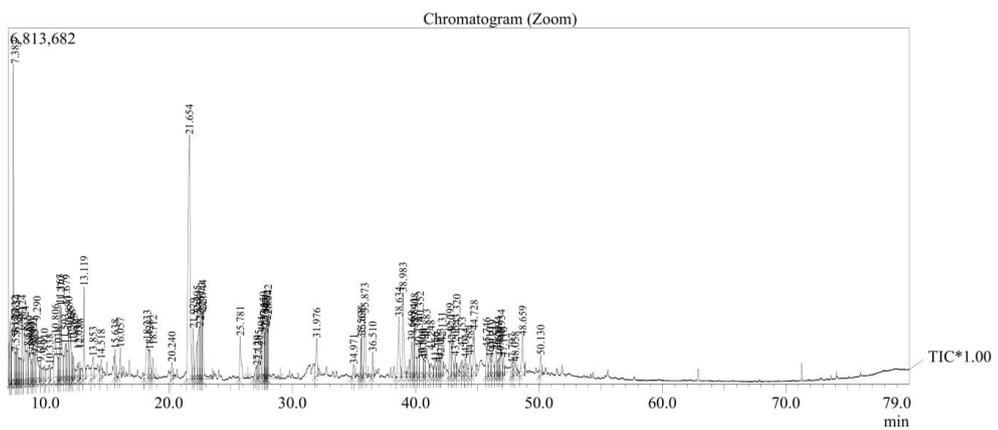
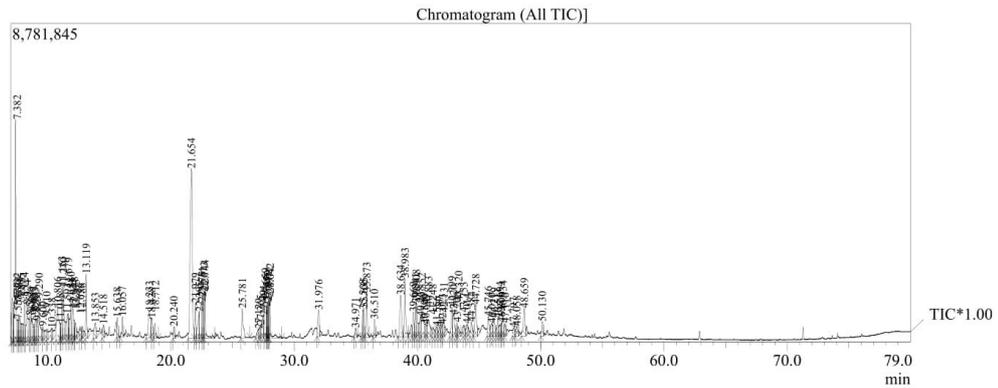
Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO 3: Espectro da fração hidrometanólica do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

1/12/2021 15:43:18

C:\Documents and Settings\MACB\Desktop\CG MS\EEB03METAGUADCSEL.qgd



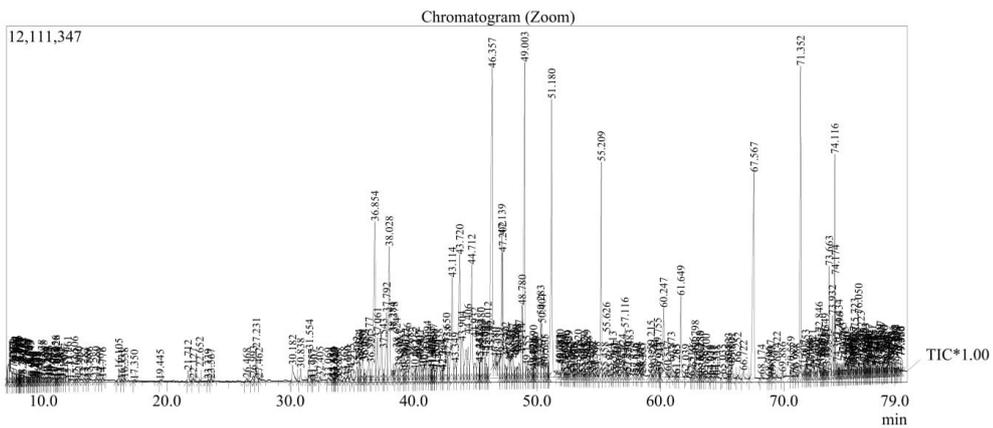
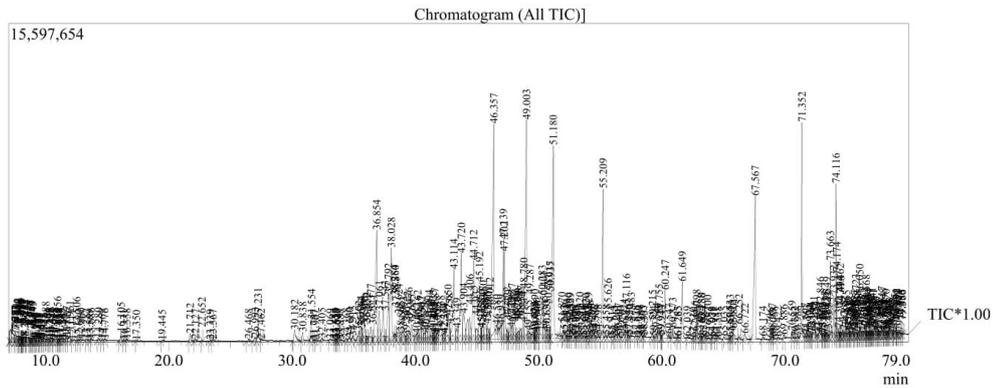
Spectrum

Line#:1 R.Time:7.000(Scan#:1)
MassPeaks:0
RawMode:Single 7.000(1) BasePeak:0.00(0)
BG Mode:None Group 1 - Event 1

ANEXO 4: Espectro da fração hexânica do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

1/12/2021 15:43:46

C:\Documents and Settings\MACB\Desktop\CG MS\EEB08HEXDCSEL.qgd



Line#:1 R.Time:7.000(Scan#:1)
 MassPeaks:0
 RawMode:Single 7.000(1) BasePeak:0.00(0)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1