

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANAÍS BEZERRA DE GUSMÃO

**EFEITOS CRONOTROPICO E INOTROPICO NEGATIVOS
INDUZIDOS PELO TIMOL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

JOÃO PESSOA– PB

2015

ANAÍS BEZERRA DE GUSMÃO

**EFEITOS CRONOTROPICO E INOTROPICO NEGATIVOS
INDUZIDOS PELO TIMOL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Departamento de Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Federal da Paraíba, como
requisito final para a conclusão do curso de
graduação em Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

JOÃO PESSOA– PB

2015

G982e Gusmão, Anaís Bezerra de.

Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo
timol em ratos espontaneamente hipertensos / Anaís Bezerra de
Gusmão. - - João Pessoa: [s.n.], 2015.

48f.: il. -

Orientadora: Islania Giselia Albuquerque Gonçalves.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

ANAÍS BEZERRA DE GUSMÃO

**EFEITOS CRONOTROPICO E INOTROPICO NEGATIVOS INDUZIDOS PELO
TIMOL EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Aprovado em 10/07/2015

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Departamento de Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Federal da Paraíba, como
requisito final para a conclusão do curso de
graduação em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

**Me. Natália Tabosa Machado Calzerra
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa**

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu a saúde, paz e felicidade e colocou ao meu lado pessoas que sempre me ajudaram a seguir os caminhos certos e também por permitir que eu nunca desistisse dos meus objetivos, por mais difíceis que estes se mostrassem.

À minha mãe, Fátima, por sempre me educar para que eu me tornasse uma pessoa responsável, e por ter me ensinado que o sucesso só pode ser alcançado com honestidade, humildade e trabalho.

À minha avó Anaíde, pelo incentivo e carinho durante toda a minha vida.

Ao meu namorado Tiago, por me dar apoio para realização deste sonho e por ser compreensivo durante minha vida acadêmica.

À todos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFPB pelo apoio e pelos ensinamentos que me deram durante toda a minha Iniciação Científica e na pesquisa realizada para este trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves, que me orientou com muita dedicação, incentivando-me a dar o melhor de mim para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, que me recebeu em seu laboratório e me ensinou os primeiros passos da pesquisa, sendo um exemplo de competência profissional.

À Dra. Mônica Moura de Almeida, que sempre esteve disposta a me ajudar na pesquisa e a quem devo muito do que aprendi para a realização deste trabalho.

À Me. Priscilla Maria Maciel, por todos os ensinamentos valiosos que me deu para o meu crescimento na pesquisa.

Ao companheirismo dos meus amigos de curso, com os quais compartilhei muitos momentos, bons ou ruins, durante toda essa jornada.

Aos meus professores, por terem sido mediadores do conhecimento que necessito como profissional e pessoa. Foram ótimos profissionais com os quais tive o prazer de assistir as aulas e que me fizeram ser apaixonada pela profissão farmacêutica.

MUITO OBRIGADA.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em
ter novos olhos”.*

Marcel Proust

**Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos
induzidos pelo timol em ratos espontaneamente
hipertensos**

RESUMO

O timol é um monoterpeno presente na constituição dos óleos essenciais de um grande número de plantas e é muito conhecido por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, sendo também reportadas na literatura suas atividades sobre o sistema cardiovascular. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos pelo timol em ratos da linhagem SHR, um modelo animal de hipertensão essencial, bem como em seu controle normotenso, ratos WKY, por meio da técnica de sistema de órgãos isolados *in vitro* utilizando os átrios isolados destes animais. Em ratos SHR, o timol induziu efeitos cronotrópico ($pD_2 = 3,9 \pm 0,029$; $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 10$) e inotrópico ($pD_2 = 4,6 \pm 0,080$; $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$) negativos. Em animais WKY, o composto também induziu a redução da frequência cardíaca ($pD_2 = 4,0 \pm 0,037$; $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 5$) e redução na força contrátil ($pD_2 = 4,6 \pm 0,058$; $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$). Tanto nos animais hipertensos, quanto nos animais normotensos, o efeito inotrópico negativo apresentou maior potencia ($p < 0,001$) quando comparado ao efeito cronotrópico negativo. Quando comparados os efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo timol nos animais SHR e WKY, foi observado que o composto induziu respostas similares para animais hipertensos e normotensos. Em conclusão, estes resultados sugerem que o efeito induzido pelo timol sobre a força de contração cardíaca é mais potente que o efeito deste monoterpeno sobre a frequência de batimentos cardíacos e que não há diferença estatística entre os animais hipertensos e normotensos nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Timol; cronotropismo; inotropismo; hipertensão.

**Inotropic and negative chronotropic effects
induced by thymol in spontaneously hypertensive
rats**

ABSTRACT

Thymol is a monoterpene present in the constitution of the essential oils of many plants and is well known for its broad spectrum antimicrobial activity and is also reported in the literature their activities on the cardiovascular system. Therefore, this study aimed to evaluate the chronotropic and inotropic effects induced by thymol in the SHR rats, an essential model animal of hypertension as well as in their normotensive control WKY, by system organ technique in isolated vitro using the atria isolated from these animals. In SHR, thymol induced negative chronotropic effects ($pD_2 = 3.9 \pm 0.029$; $E_{max} = 100 \pm 0\%$, $n = 10$) and inotropic ($pD_2 = 4.6 \pm 0.080$; $E_{max} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$). In WKY rats, the compound also induced reduction in heart rate ($pD_2 = 4.0 \pm 0.037$; $E_{max} = 100 \pm 0\%$, $n = 5$) and reduction in contractile force ($pD_2 = 4.6 \pm 0.058$; $E_{max} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$). Both in hypertensive animals, as in normotensive animals, the negative inotropic effect showed greater power ($p < 0.001$) when compared to the negative chronotropic effect. When comparing the chronotropic and inotropic effects induced by thymol in SHR and WKY rats, it was observed that the compound induced similar responses in hypertensive and normotensive animals. In conclusion, these results suggest that the effect induced by thymol on the strength of cardiac contraction is more powerful than the effect of this monoterpene on the frequency of heartbeat and that there is no statistical difference between normotensive and hypertensive animals in the evaluated parameters.

Keywords: Thymol; chronotropism; inotropism; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas que representam o sistema de condução elétrica responsável pelo processo de acoplamento excitação – contração cardíaca.....	13
Figura 2	Indução da contração cardíaca a partir do Ca^{2+} nos miócitos ventriculares.....	14
Figura 3	Ativação de receptor β -adrenérgico e fosforilação de alvos relevantes para o acoplamento excitação-contração.....	15
Figura 4	Estrutura química do timol (5-metil-2-(1-metiletil)-fenol).....	21
Figura 5	A. Traçado original da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato SHR. B. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato SHR. C. Curvas concentração-resposta para o timol em átrios direito ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) e esquerdo ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) isolados de rato SHR.....	30
Figura 6	A. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato WKY. B. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato WKY. C. Curvas concentração-resposta para o timol em átrios direito ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) e esquerdo ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) isolados de rato WKY.....	32
Figura 7	A. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato SHR. B. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato WKY. C. Curvas concentração-resposta para o timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrios direitos isolados de animais SHR e WKY.....	34
Figura 8	A. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato SHR. B. Traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato WKY. C. Curvas concentração-resposta para o timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrios esquerdos isolados de animais SHR e WKY.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca^{2+}	íon cálcio
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	concentração de cálcio intracelular
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
AV	atrioventricular
BPM	batimentos por minuto
Ca_v	canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem
DC	débito cardíaco
DCV	doenças cardiovasculares
e.p.m.	erro padrão da média
$E_{\text{máx}}$	efeito máximo
GTP	trifosfato cíclico de guanosina
HAS	hipertensão arterial sistêmica
I_{Ca}	corrente de Ca^{2+}
$I_{\text{Ca,L}}$	corrente de Ca^{2+} tipo-L
I_K	corrente de potássio
n	tamanho da amostra
OELM	óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham.
PA	pressão arterial
pD_2	logaritmo negativo da CE_{50}
PKA	proteína cinase dependente de AMPC
RVPT	resistência vascular periférica total
RYP	receptor de rianodina
RYP1	receptor de rianodina tipo – 1
SA	sinoatrial
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
WKY	ratos Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
	2.1 Acoplamento excitação – contração cardíaca.....	12
	2.2 Regulação do acoplamento excitação – contração pelo sistema nervoso autonômico.....	14
	2.3 Hipertensão arterial.....	16
	2.4 Modelo animal de hipertensão arterial.....	18
	2.5 Tratamento da hipertensão arterial.....	18
	2.6 Utilização de produtos naturais.....	20
	2.7 O Timol.....	21
3	OBJETIVOS.....	24
	3.1 Geral.....	24
	3.2 Específicos.....	24
4	METODOLOGIA.....	25
	4.1 Animais.....	25
	4.2 Drogas e sais utilizados.....	25
	4.3 Solução nutritiva.....	25
	4.4 Preparação das soluções de timol.....	26
	4.5 Preparo dos átrios isolados de rato.....	26
	4.6 Avaliação do efeito de timol sobre o cronotropismo e inotropismo em átrios isolados de rato.....	27
	4.7 Análise estatística.....	27
5	RESULTADOS.....	29
	5.1 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol em animais SHR.....	29
	5.2 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol em animais WKY.....	31
	5.3 Comparação do efeito cronotrópico negativo induzido pelo timol em animais SHR e WKY.....	33
	5.4 Comparação do efeito inotrópico negativo induzido pelo timol em animais SHR e WKY.....	35
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é composto, basicamente, pelo coração, vasos sanguíneos e sangue (PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000). A principal função deste sistema é fornecer e manter suficiente o fluxo sanguíneo aos diversos tecidos do organismo, segundo suas necessidades metabólicas. O sangue serve de veículo para entrega e retirada de nutrientes e resíduos, favorecendo as funções celulares, como: regulação temporal corporal, manutenção do balanço de fluidos, fornecimento de O₂, desenvolvimento, crescimento, absorção de nutrientes essenciais, remoção celular e de metabólitos e promover a manutenção da homeostase celular (BERNE et al., 2009; PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000).

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um grupo de doenças cardíacas (cardiomiopatia, disfunção isquêmica do coração, insuficiência cardíaca congestiva) e vasculares (doença arterial coronariana, hipertensão e aterosclerose) (KUMAR; SINGH; BAKER, 2007). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). A HAS é seguramente um grande problema de saúde pública mundial, sendo universalmente aceita como um importante prognóstico para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e mortalidade prematura (ELLIOTT, 2007). No Brasil, estudos apontam que apenas 20% a 40% dos hipertensos têm um controle efetivo da pressão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Baseado nestas considerações, a busca por novas substâncias químicas presentes em espécies vegetais, que possam ser utilizadas nas DCV, são de extrema importância para preservação da vida. Os óleos essenciais, certamente, constituem substâncias com atividades diversas, terapeuticamente e cientificamente comprovadas (SHUBINA; SIURIN; SAVCHENKO, 1990), fato que tem gerado vários estudos relacionados com as propriedades farmacológicas destes compostos. Sendo assim, novas pesquisas devem ser realizadas de modo a serem estudadas substâncias com potencial farmacológico, como os constituintes dos óleos essenciais, a fim de aprofundar os conhecimentos no que diz respeito às possíveis novas terapias.

O timol, um monoterpeno fenólico isolado do óleo essencial de algumas plantas, é conhecido por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, a qual foi alvo de algumas investigações (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001; ADAM et al., 1998; MANOHAR et al., 2001; BOTELHO et al., 2007; SIVROPOULOU et al., 1996). Uma vez que é frequentemente empregado como um antimicrobiano e também na prática médica, os efeitos cardiovasculares do timol começaram a ser extensivamente estudados (PERIAGO; MOEZELAAR, 2001).

Foram demonstrados vários efeitos do timol sobre os músculos liso, esquelético e cardíaco (SAKAI; FUJII; TAKEMOTO, 1967), agindo, principalmente, sobre o mecanismo de liberação do cálcio (Ca^{2+}) pelo retículo sarcoplasmático (PALADE, 1987; HISAYAMA; TAKAYANAGI, 1986; SZENTANDRÁSSY et al., 2004). O timol inibiu as correntes dos canais para Ca^{2+} do tipo-L ($I_{\text{Ca,L}}$) e as correntes de potássio (I_K) em cardiomiócitos ventriculares isolados de cães e humanos (MAGYAR et al., 2002), sendo posteriormente demonstrada a inibição dos $I_{\text{Ca,L}}$ em cães utilizando a técnica “patch clamp” (MAGYAR et al., 2004). Em estudos recentes, foram observados efeitos protetores do timol sobre inflamação ocorrida recorrente do infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos Wistar (MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015). Anteriormente, em nosso laboratório, estudos realizados com o timol demonstraram que esta substância é capaz de induzir hipotensão, bradicardia e relaxamento em diferentes leitos vasculares de ratos normotensos e hipertensos, apresentando também efeito inibitório sobre as $I_{\text{Ca,L}}$ em cardiomiócitos de ratos normotensos e hipertensos (ARAÚJO, 2011).

Apesar da literatura apontar o efeito do timol sobre o músculo cardíaco de algumas espécies, ela não contempla estudos do efeito do timol sobre o tecido cardíaco de ratos hipertensos, avaliando sua ação sobre a frequência e força contráteis. Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do timol sobre o cronotropismo e inotropismo em ratos normotensos e hipertensos, utilizando ratos espontaneamente hipertensos, bem como seu controle normotenso, como modelo animal da hipertensão arterial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Acoplamento excitação – contração cardíaca

O acoplamento excitação-contração cardíaco é o processo de excitação elétrica do miócito para a contração do coração. As células miocárdicas individuais devem despolarizar e contrair de modo coordenado para o coração gerar força suficiente para o sangue circular (BERS, 2001).

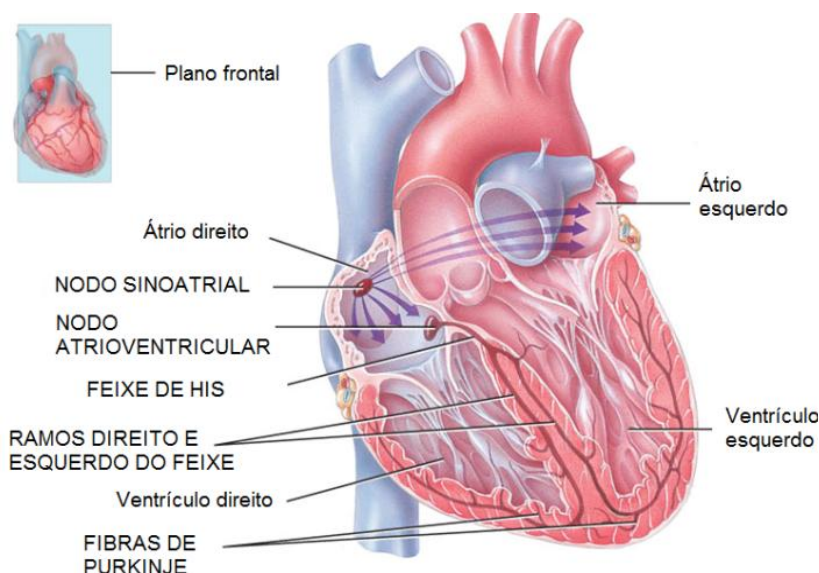
O coração possui um sistema de condução elétrica que é formado por um conjunto de fibras musculares com função de excitação e condução, que são representadas estruturalmente pelo nó sinoatrial (nó SA), nó atrioventricular (nó AV), vias de condução internodais, feixe de His e fibras de Purkinje. As células que formam o nó SA e o nó AV não necessitam de estímulo externo para iniciar um potencial de ação, sendo esta uma propriedade característica dessas células, denominada de automatismo (AIRES, 2012; COSTANZO, 2004).

A despolarização começa no nó SA, formado por células autoexcitáveis localizadas no átrio direito que atuam como o principal marcapasso do coração. Portanto, o potencial de ação gerado no nó SA propaga-se rapidamente por toda a massa muscular atrial, por meio de um sistema especializado de condução constituído de fibras autoexcitáveis não contráteis, característica da via internodal ramificada, conectando o nó SA ao nó AV, que também é constituído por células autoexcitáveis localizadas próximo ao assoalho do átrio direito. A condução elétrica é rápida pelas vias de condução internodais, porém é mais lenta através das células contráteis do átrio. Os potenciais de ação, espalhando-se pelos átrios, encontram o esqueleto fibroso do coração na junção entre os átrios e os ventrículos. Esta barreira impede que os sinais elétricos sejam transferidos dos átrios para os ventrículos. Assim, apenas o nó AV é o caminho para que os potenciais de ação alcancem as fibras contráteis dos ventrículos (GUYTON; HALL, 2006; SILVERTHORN, 2010).

Chegando ao nó AV, a onda despolarizante move-se para os ventrículos. As fibras de Purkinje, células de condução especializadas, transmitem sinais elétricos muito rapidamente a partir do feixe de His, localizado no septo entre os ventrículos, permitindo uma transmissão quase instantânea do impulso por todo o músculo

ventricular. Percorrido um curto caminho no septo, o feixe se divide em ramos, o ramo esquerdo e o ramo direito. Estes continuam se deslocando para o ápice do coração, onde se dividem em vários ramos menores chamados de ramos subendocárdicos (fibras de Purkinje) que se espalham entre as células contráteis (Figura 1). Estes ramos transmitem os impulsos rapidamente, com velocidades de até 4 ms, fazendo com que todas as células contráteis do ápice se contraíam quase ao mesmo tempo (GUYTON; HALL, 2006; SILVERTHORN, 2010).

Figura 1 Estruturas que representam o sistema de condução elétrica responsável pelo processo de acoplamento excitação – contração cardíaca

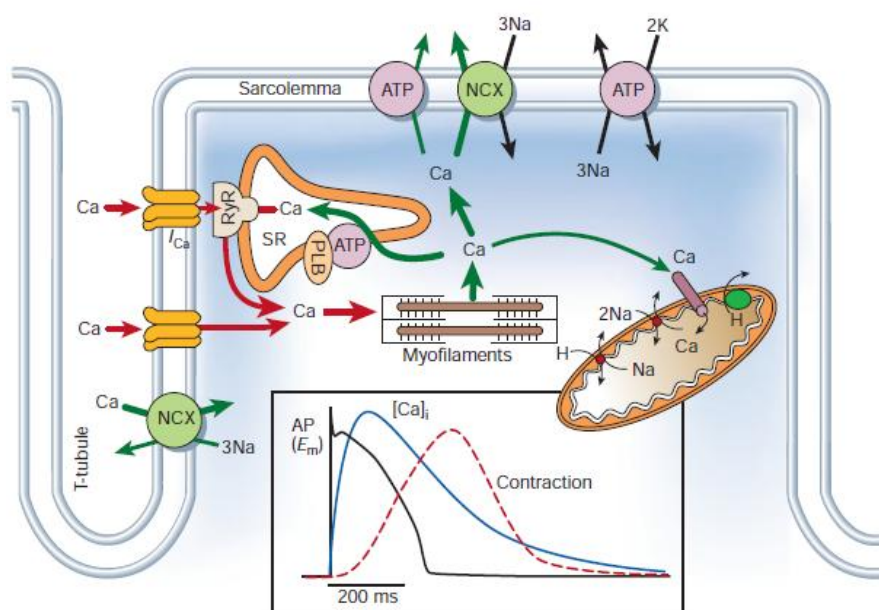


Fonte: <https://www.studyblue.com>. (Modificado por GUSMÃO, 2015).

O potencial de ação cardíaco exibe um “platô” de várias centenas de milissegundos de duração após a despolarização rápida inicial. Durante esse platô, os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L se abrem e permitem a entrada de Ca^{2+} no interior da célula, porém não em quantidades suficientes para ativar diretamente o mecanismo de contração. Com efeito, essa entrada inicial de Ca^{2+} atua sobre os receptores de rianodina (RyR) para liberar Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, produzindo uma onda secundária e muito maior de liberação de Ca^{2+} . Como os próprios RyR do músculo cardíaco são ativados pelo Ca^{2+} , a onda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é um evento regenerativo tudo-nada (RANG et al., 2004). Esse processo de

amplificação, chamado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , causa um rápido aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para um nível capaz de promover ligação do Ca^{2+} a troponina C e indução da contração (BERS, 2001; BODI et al., 2005) (Figura 2).

Figura 2 Indução da contração cardíaca a partir do Ca^{2+} nos miócitos ventriculares. NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; ATP: ATPase; PLB: fosfolambam; SR: Retículo sarcoplasmático.



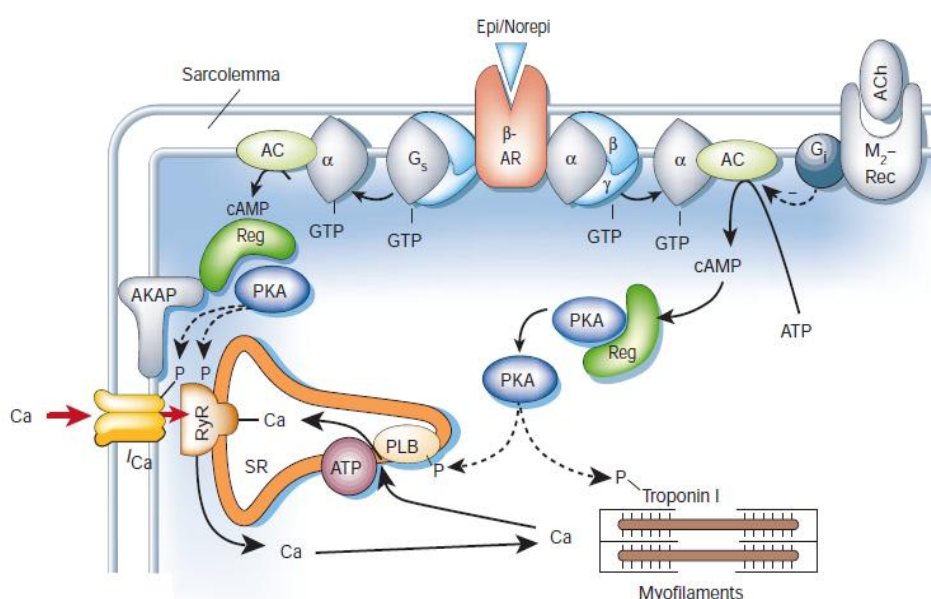
Fonte: (BERS, 2002).

2.2 Regulação do acoplamento excitação – contração pelo sistema nervoso autonômico

O sistema nervoso autonômico apresenta comunicação bidirecional entre o coração e o sistema nervoso central. No coração, uma de suas principais características é aumentar ou diminuir, de maneira variável, a frequência de seus batimentos (LONGO; FERREIRA; CORREIA, 1995). A inervação autonômica é mais rica nos átrios que nos ventrículos, diferindo-se entre lado direito e esquerdo do coração e também entre camadas do miocárdio. Essa diferença é responsável pela adequada modulação da atividade cardíaca (KUKANOVA; MRAVEC, 2006).

O sistema nervoso simpático atua sobre o coração de forma a aumentar a força de contração (efeito inotrópico positivo), aumentar a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo), aumentar a automaticidade, repolarizar e restaurar a função após despolarização cardíaca generalizada e reduzir a eficiência cardíaca. Todos esses efeitos resultam da ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos (RANG et al., 2004). A estimulação dos receptores de β -adrenérgicos ativa uma proteína de ligação a GTP (G_s), que estimula a ciclase de adenilil para produzir AMPc, que por sua vez ativa PKA. Esta proteína cinase fosforila várias proteínas relacionadas com acoplamento excitação-contração, como por exemplo: fosfolambam, canais de Ca^{2+} tipo L, receptores de rianodina, troponina I e proteína C de ligação à miosina (BERS, 2002) (figura 3). Para que a ativação destes receptores ocorra, o potencial de ação da membrana plasmática, que depende dos canais de sódio regulados por voltagem, deve propagar-se rapidamente ao longo de toda a fibra, movendo-se pelo sarcolema e entrando nos túbulos T, que é onde se encontram os canais de cálcio controlados por voltagem tipo L. (RANG, DALE, 2004; SILVERTHORN, 2010).

Figura 3 Ativação de receptor β -adrenérgico e fosforilação de alvos relevantes para o acoplamento excitação-contração. AC: ciclase de adenilil; ACh, acetilcolina; AKAP: proteína de ancoragem à cinase A; β -AR: receptor β -adrenérgico; M_2 -Rec: receptor muscarínico M_2 ; PLB: fosfolambam; Reg: subunidade reguladora de PKA; SR: retículo sarcoplasmático.



Fonte: (BERS, 2002).

O sistema nervoso parassimpático é responsável por modular a atividade cardíaca, exercendo atividade sobre o nodo sinoatrial, nodo atrioventricular e o músculo atrial (LEVY, 1977). No coração, a inervação parassimpática é realizada pelo nervo vago, que libera a acetilcolina (KUKANOVA; MRAVEC, 2006). Este neurotransmissor se liga ao seu receptor muscarínico no coração (receptor M_2) que é acoplado à proteína G_i que, por sua vez, promove inibição da atividade da ciclase de adenilil, reduzindo os níveis de AMPc (OPIE, 1991; BOURNE, 1998).

2.3 Hipertensão arterial

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morbimortalidade da população, apresentando uma prevalência significativa e, conseqüentemente, representando um desafio à saúde pública brasileira. A exposição que vem desde a infância aos fatores de riscos para o desenvolvimento das DCV e a precariedade nos serviços de saúde oferecidos à população levam à impactos socioeconômicos no país (MOREIRA; GOMES; SANTOS, 2010). Entre os fatores de risco de maior probabilidade para o desenvolvimento das DCV destacam-se o tabagismo, as dislipidemias, o *diabetes mellitus*, a obesidade, o sobrepeso, a inatividade física, a dieta pobre em vegetais e frutas, alimentação rica em sódio e gorduras, o uso do álcool e o estresse (BRANDÃO; AMODEO; NOBRE, 2012; MION JR et al., 2002).

A pressão arterial (PA) é determinada por fatores físicos, tais como: débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT). A interação destas variáveis é fornecida pela seguinte equação: $PA = DC \times RVPT$. Estes elementos são regulados por meio da ação integrada de fatores neurais, endócrinos e parácrinos (COWLEY, 2006). Os níveis de pressão sanguínea estabelecidos como adequados encontram respaldo científico em grandes estudos epidemiológicos que correlacionam valores de PA aos riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular, sendo a elevada pressão arterial um fator de risco importante e independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FIELDS et al., 2004; MACMAHON et al., 1990).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é conceituada como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial e está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, levando ao aumento do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares, sejam eles fatais ou não fatais (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

A HAS é considerada um grande problema de saúde pública mundial e, geralmente, todas as outras doenças cardiovasculares são frequentemente associadas a essa enfermidade (NGUELEFACK et al., 2007; ELLIOTT, 2007), como o acidente vascular encefálico, o infarto agudo do miocárdio e a insuficiência cardíaca (COGOLLUDO; VIZCAÍNO-PÉREZ; TAMARGO, 2005). A HAS possui alta prevalência e baixas taxas de controle (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010) e isso está muitas vezes relacionado à grande parcela de indivíduos que são hipertensos, mas que não diagnosticados e nem tratados adequadamente (PASSOS; ASSIS; BARRETO, 2006). No Brasil estudos apontam uma prevalência de HAS acima de 30%. Levando-se em consideração valores de PA iguais ou superiores que 140/90 mmHg, estudos demonstram prevalências entre 22,3% e 43,9% (média de 32,5%), com mais de 50% dos indivíduos na faixa etária entre 60 e 69 anos e 75% dos indivíduos com idade acima dos 70 anos. A prevalência é de 35,8% nos homens e de 30% nas mulheres. Mundialmente, a prevalência é de 37,8% nos homens e 32,1% nas mulheres (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Etiologicamente, a HAS pode ser apresentada de duas formas, hipertensão primária ou essencial e hipertensão secundária ou adquirida. A hipertensão essencial, cuja prevalência é aproximadamente 95%, caracteriza-se por uma elevação da pressão sanguínea sem causa aparente, e estando associada a vários fatores de risco, como a predisposição genética, sedentarismo, obesidade, consumo elevado de álcool e sal (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). A hipertensão secundária apresenta causa identificável, passível ou não de correção e se expressa de várias formas tais como: hipertensão arterial renovascular, hipertensão arterial por excesso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo), por excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing) e por excesso de catecolaminas (feocromocitoma) (CARVALHO, 1996).

2.4 Modelo animal de hipertensão arterial

Existem várias linhagens de animais geneticamente hipertensos desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a patogênese da hipertensão arterial humana (LERMAN et. al., 2005). A julgar pelo número de publicações, dentre os vários modelos de ratos geneticamente hipertensos, a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* - SHR), selecionada por Okamoto e Aoki (1963) é sem dúvida a espécie mais estudada.

A linhagem isogênica de animais SHR foi desenvolvida no Japão, na década de 1960 por Okamoto e colaboradores, a partir dos ratos Wistar-Kyoto (*Wistar-Kyoto rats* - WKY), por cruzamento meticuloso entre os irmãos com pressão arterial elevada, resultando em 100% de progênie com hipertensão espontânea (OKAMOTO; AOKI, 1963). Desde então, vários especialistas relatam que a linhagem SHR é um excelente modelo para estudo de hipertensão essencial (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; KUNDU; RAO, 2008).

Como em seres humanos, a resposta hipertensiva da linhagem de ratos SHR inicia-se com o avanço da idade, e a causa do aumento da pressão sanguínea permanece desconhecida. O aumento da PA começa por volta de 5 - 6 semanas de idade e a pressão arterial sistêmica pode atingir valores entre 180 e 200 mmHg em animais adultos. Aproximadamente entre 40 - 50 semanas de idade os animais SHR apresentam doenças cardiovasculares características, como a hipertrofia do coração e vasos sanguíneos (CONRAD et. al., 1995; KUNDU; RAO, 2008).

Em relação ao debate sobre a aplicabilidade do SHR a hipertensão humana, este modelo tem sido muito útil para o entendimento de aspectos fisiopatológicos de uma hipertensão genética, tendo em vista que os componentes genéticos são de importante relevância também para o desenvolvimento da hipertensão em humanos. Portanto, este modelo vem sendo extensivamente empregado na pesquisa para a avaliação dos efeitos anti-hipertensivos de muitas substâncias.

2.5 Tratamento da hipertensão arterial

A hipertensão arterial possui tratamento que consiste na administração de medicamentos anti-hipertensivos e também em medidas não medicamentosas (BALDISSERA; CARVALHO; PELLOSO, 2009).

A HAS essencial não tem cura, porém deve-se adotar um tratamento, pois ele previne as possíveis complicações. É interessante que, antes de ser prescrito algum medicamento anti-hipertensivo, sejam adotadas medidas que estimulem hábitos de vida saudáveis (MION JR et al., 2002). A terapia não-medicamentosa visa reduzir a morbidade e a mortalidade causadas por problemas cardiovasculares, realizando mudanças no estilo de vida, a fim de reduzir a PA (OLIVEIRA, 2011). Algumas medidas a serem adotadas na vida de um paciente hipertenso incluem: redução do peso corporal, diminuição da ingestão do sódio, maior ingestão de alimentos ricos em potássio, redução do consumo de bebidas alcoólicas, prática de exercícios físicos com regularidade, abandono do tabagismo, controle do *diabetes mellitus* e das dislipidemias, não utilizar medicamentos que elevam a pressão arterial e evitar o estresse (MION JR et al., 2002).

Já terapia medicamentosa para hipertensão tem o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovasculares do hipertenso por reduzir danos ao órgão alvo e impedir a evolução das doenças cardiovasculares (MION JR et al., 2002; OPARIL; SCHMIEDER, 2015). O tratamento medicamentoso é realizado utilizando qualquer medicamento dos grupos de anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil, desde que resguardadas as indicações e contraindicações específicas. Esses grupos são: diuréticos, inibidores adrenérgicos (de ação central, betabloqueadores e alfabloqueadores), vasodilatadores diretos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina II e inibidor direto da renina. Estudos demonstram que a monoterapia só foi suficiente para reduzir a pressão arterial de forma satisfatória em apenas um terço dos casos, sendo necessária, na maioria das vezes, a utilização de dois ou mais medicamentos anti-hipertensivos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Apesar da grande diversidade terapêutica para o tratamento da HAS uma parcela importante dos pacientes hipertensos apresenta resistência aos medicamentos disponíveis. Estima-se que cerca de 10% a 15% da população hipertensa em geral tem hipertensão resistente, ou seja, PA não-controlada com o uso de 3 ou mais anti-hipertensivos de classes diferentes ou exigindo mais que 4

medicamentos para conseguir o controle da pressão (PERSELL, 2011; SIM et al., 2013). Além disso, aproximadamente 0,5% dos hipertensos têm hipertensão refratária e, portanto, possuem uma PA descontrolada com a utilização de 5 ou mais medicamentos (CALHOUN et al., 2014). Então, se faz necessário a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento desta enfermidade que apresenta uma incidência relativamente alta na população. Aliado a este fato, substâncias originadas de produtos naturais têm sido uma importante fonte de obtenção de novos fármacos.

2.6 Utilização de produtos naturais

Muitas evidências apontam as plantas medicinais como a mais antiga e importante forma de medicação difundida no mundo (MCNEILL; JURGENS, 2006). Desta forma, as plantas, pelas suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular. A flora brasileira é riquíssima em exemplares que são utilizados pela população para fins medicinais. Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer, é denominada de planta medicinal (CRAVO, 1995). Além do mais, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos (KOEHN; CARTER, 2005; LI; VEDERAS, 2009; MOLINARI, 2009).

Dentre os vários constituintes das plantas, os óleos essenciais, essências vegetais ou óleos voláteis, são caracterizados como misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975). O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo mais frequente a destilação por arraste em vapor d'água (CRAVEIRO et al., 1981).

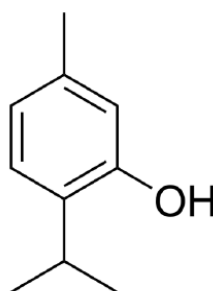
Os óleos essenciais apresentam-se constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Os monoterpenos e

sesquiterpenos dos óleos essenciais, que são formados por duas e três unidades isoprênicas respectivamente, são encontrados normalmente em sementes, frutos, cascas, folhas e flores de muitas espécies vegetais, e são considerados, em muitos casos, como responsáveis pelos odores de plantas aromáticas (CHÁVEZ, 1991).

2.7 O Timol

O timol é um monoterpeno quimicamente denominado 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol e possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso de 150,2 g/mol (Figura 4). Apresenta-se em forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos. O timol possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao tomilho, bem como, pouca solubilidade em água. Seu ponto de fusão é de 52 °C e seu ponto de ebulição é de 233 °C.

Figura 4 Estrutura química do timol (5-metil-2-(1-metiletil)-fenol).



O timol é conhecido por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, a qual foi alvo de algumas investigações *in vitro* (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001) e *in vivo* (ADAM et al., 1998; MANOHAR et al., 2001). Entretanto, este monoterpeno também é alvo de pesquisas envolvendo os tecidos musculares e foi visto ele timol afeta o acoplamento excitação-contração do músculo esquelético, liso e cardíaco (SAKAI; FUJII; TAKEMOTO, 1967). Alguns estudos mostram que o timol induz a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático no músculo esquelético

(PALADE et al., 1987), músculo liso (HISAYAMA; TAKAYANAGI, 1986) e em neurônios (KOSTYUK; BELAN, TEPIKIN; 1991). Szentrandrássy e colaboradores (2004) demonstraram que o timol gerou um efeito inotrópico negativo sobre as preparações de músculo cardíaco em cães e cobaias, devido à combinação da liberação de Ca^{2+} pelo timol e pela inibição da bomba de cálcio, além de um efeito sensibilizador de cálcio em concentrações mais baixas do timol, indicando que o composto é susceptível de interagir com a maquinaria contrátil da musculatura do coração. Em adição a isso, foi demonstrado que o timol inibe a Ca^{2+} -ATPase em vesículas do retículo sarcoplasmático isoladas do músculo esquelético e ativamente carregadas com cálcio e também induz a ativação do receptor de rianodina tipo- 1 (RyR1) incorporado em uma bicamada lipídica artificial (SÁRKÖZI et al., 2007). Além disso, Magyar e colaboradores (2004) estudando os efeitos de timol em cardiomiócitos ventriculares isolados de seres humanos e de cães e fazendo uso da técnica de "patch clamp", demonstraram que o timol foi capaz de inibir as correntes de Ca^{2+} tipo-L .

Beer e colaboradores (2007) demonstraram que o timol, em concentrações menores que 1 μM , é um agonista de receptores α_1 , α_2 e β -adrenérgicos em segmentos de músculo liso de estômago e veia porta de cobaia . Em concentrações superiores a 1 μM , o timol apresentou efeito espasmolítico, cujo mecanismo de ação não foi descrito. Por outro lado, Peixoto-Neves e colaboradores (2010) demonstraram que o timol promove efeito relaxante independente do endotélio em aorta de rato pré-contráida com KCl, provavelmente por envolvimento de múltiplos mecanismos relacionados à dinâmica do Ca^{2+} , como: alteração da liberação do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, sensibilização do Ca^{2+} ao sistema contrátil e efeito inibitório sobre o influxo de Ca^{2+} .

Estudos eletrofisiológicos demonstram que o timol inibe de maneira dependente de concentração I_{Ca} e I_{K} em músculo esquelético, (SZENTANDRÁSSY et al., 2003) cardiomiócitos ventriculares isolados de cães e humanos (MAGYAR et al., 2002) além de ativar I_{K} em células GH3 (HUANG; WU; SHEN, 2005).

Recentemente, Meeran, Jagadeesh e Selvaraj (2015) constataram os efeitos protetores do timol sobre a inflamação ocorrida recorrente do infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos Wistar, por inibir a liberação de enzimas lisossomais e reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando o seu potente efeito anti-inflamatório.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, foi observado que o timol induz hipotensão, bradicardia e relaxamento em diferentes leitos vasculares de ratos normotensos e hipertensos mediado pelo bloqueio de canais cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e apresenta efeito inibitório sobre as $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos de ratos normotensos e hipertensos (ARAÚJO, 2011). Entretanto, não existem estudos a respeito do cronotropismo e inotropismo em ratos normotensos e hipertensos com timol.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o efeito do timol sobre o inotropismo e o cronotropismo cardíacos, utilizando preparações de átrio isolado de ratos normotensos e hipertensos.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do timol sobre a força de contração do átrio esquerdo isolado de ratos normotensos e hipertensos;
- Avaliar o efeito do timol sobre a frequência de batimento do átrio direito isolado de ratos normotensos e hipertensos.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) estando entre 16 - 18 semanas de idade, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro das 6 às 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB parecer nº 113/2015.

4.2 Drogas e sais utilizados

Para a realização dos protocolos experimentais foi utilizado o timol e os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de potássio (KH_2PO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4) (Todos da Sigma, St. Louis; MO, EUA).

4.3 Solução nutritiva

A solução fisiológica utilizada nos experimentos foi a solução Krebs Henseleit sem EDTA, cuja composição está descrita no quadro abaixo.

Quadro 1: Composição da solução de Krebs Henseleit (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,4
KCl	4,7
CaCl₂	2,5
MgSO₄	1,2
NaHCO₃	25,0
KH₂PO₄	1,2
Glicose	10,0

Fonte: (NASA et al., 1992).

4.4 Preparação das soluções de timol

Antes de cada experimento o timol foi solubilizado em cremofor (Sigma, Cat # C5135) (3% por mL de solução) e diluído em água de osmose reversa de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. A concentração final de cremofor nas abordagens utilizadas não excedeu 0,03%.

4.5 Preparo dos átrios isolados de rato

Os átrios foram isolados de acordo com a técnica descrita por Nasa e colaboradores (1992). Para o isolamento dos átrios, os ratos foram eutanasiados. Em seguida, os átrios direito e esquerdo foram retirados perpendicularmente ao eixo do coração, suspensos em hastes e mantidos em cubas para órgão isolado contendo 10 mL, preenchidas com solução Krebs-Henseleit e continuamente gaseificadas com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), à temperatura de 37° C (pH 7,4). Os átrios foram acoplados a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália). Cada átrio foi mantido a uma tensão inicial de

0,5 g por 30 minutos, que corresponde ao período de estabilização. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 10 minutos, para evitar a interferência de metabólitos indesejáveis.

Como o átrio esquerdo não possui o nodo sino-atrial, ele recebeu estimulação por meio de um estimulador elétrico (Panlab, Harvard, EUA) através de eletrodos de platina, por pulsos retangulares com uma frequência de 3 Hz, duração de 3 ms e uma voltagem 1,5 vezes o limiar de excitação. Os parâmetros cardíacos foram captados pelo sistema de aquisição LabChart (ML870/P, versão 7.0, ADInstruments, Austrália).

O efeito inotrópico foi calculado a partir da amplitude de contração do átrio esquerdo antes (controle) e após a administração do timol. O efeito cronotrópico foi avaliado no átrio direito, por conter o nodo sino-atrial. A frequência controle (batimentos/minuto) foi registrada no início do experimento, sendo considerada como 100%.

4.6 Avaliação do efeito de timol sobre o cronotropismo e inotropismo em átrios isolados de rato

Após um período de estabilização de 30 min, foi obtido um registro controle para cronotropismo (átrio direito) e inotropismo (átrio esquerdo) cardíacos e, em seguida, concentrações crescentes e de forma cumulativa de timol (1 μ M – 1mM) foram adicionadas separadamente à cuba para a obtenção de uma curva concentração - resposta.

4.7 Análise estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). Os testes *t* de Student foi utilizado para avaliar a significância das diferenças entre as médias. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os valores de pD_2 (logaritmo negativo da concentração responsável por 50%

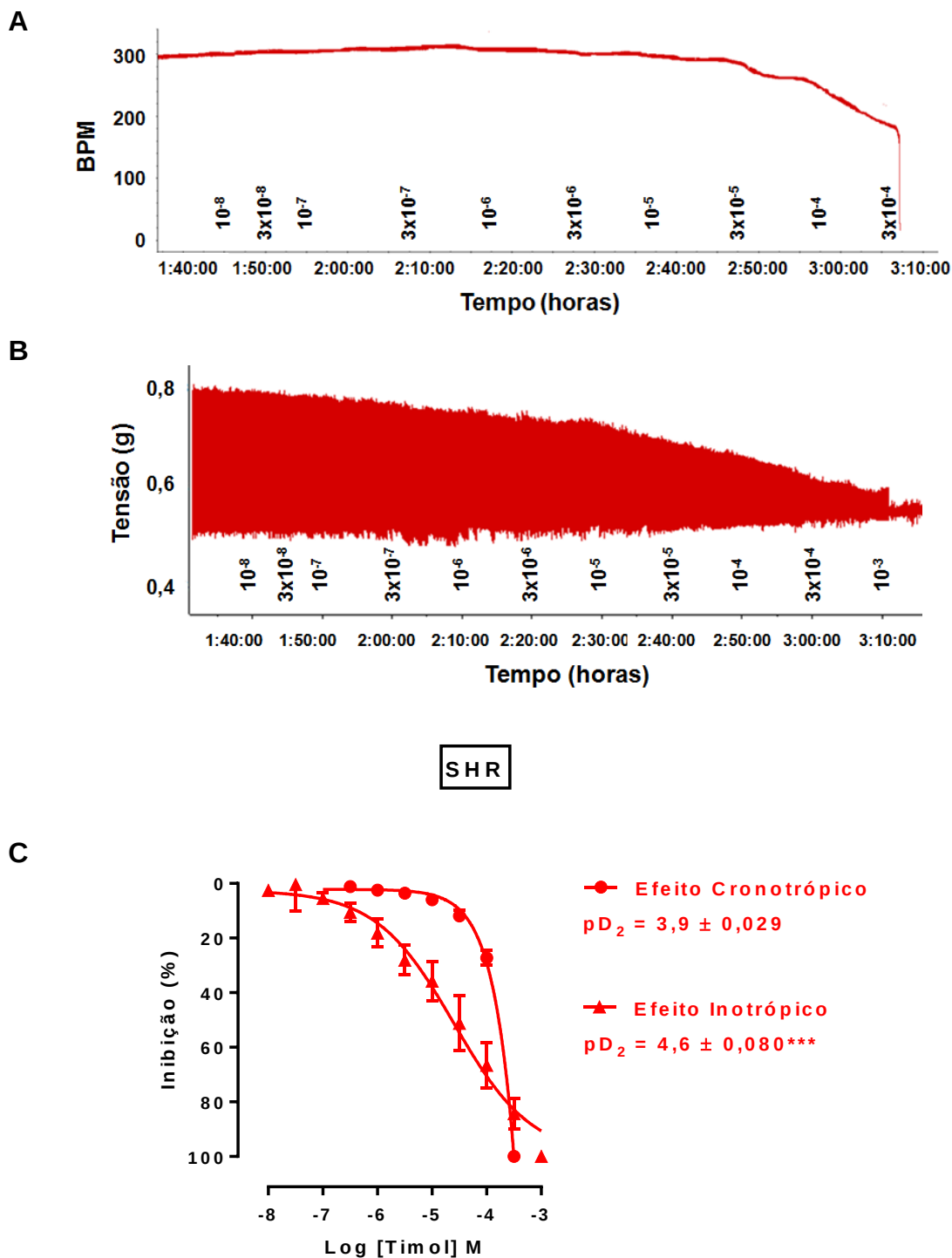
do efeito máximo) foram obtidos através de regressões não lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas induzidas pelo timol em cada experimento. Para todos esses procedimentos foi utilizado o programa estatístico Graph Pad Prism 6.0[®].

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol em animais SHR

O objetivo da realização deste protocolo em átrio foi avaliar os efeitos cardíacos *in vitro* do timol na linhagem de animais SHR. Os efeitos de timol sobre o cronotropismo e inotropismo cardíacos foram avaliados em átrios direito e esquerdo isolados de rato SHR, respectivamente. A administração do timol (10^{-8} – 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa às preparações atriais isoladas de animais SHR foi capaz de induzir um efeito cronotrópico negativo ($pD_2 = 3,9 \pm 0,029$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 10$). No átrio esquerdo a administração de timol (10^{-8} – 10^{-3} M) induziu um efeito inotrópico negativo de maneira dependente de concentração ($pD_2 = 4,6 \pm 0,080$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$). Interessantemente, o efeito sobre a força de contração cardíaca apresentou maior potencia ($p < 0,001$) quando comparado ao efeito induzido no cronotropismo cardíaco. O efeito do timol sobre a cronotropismo e inotropismo em preparações de átrios isolados de ratos SHR são mostrados na figura 5.

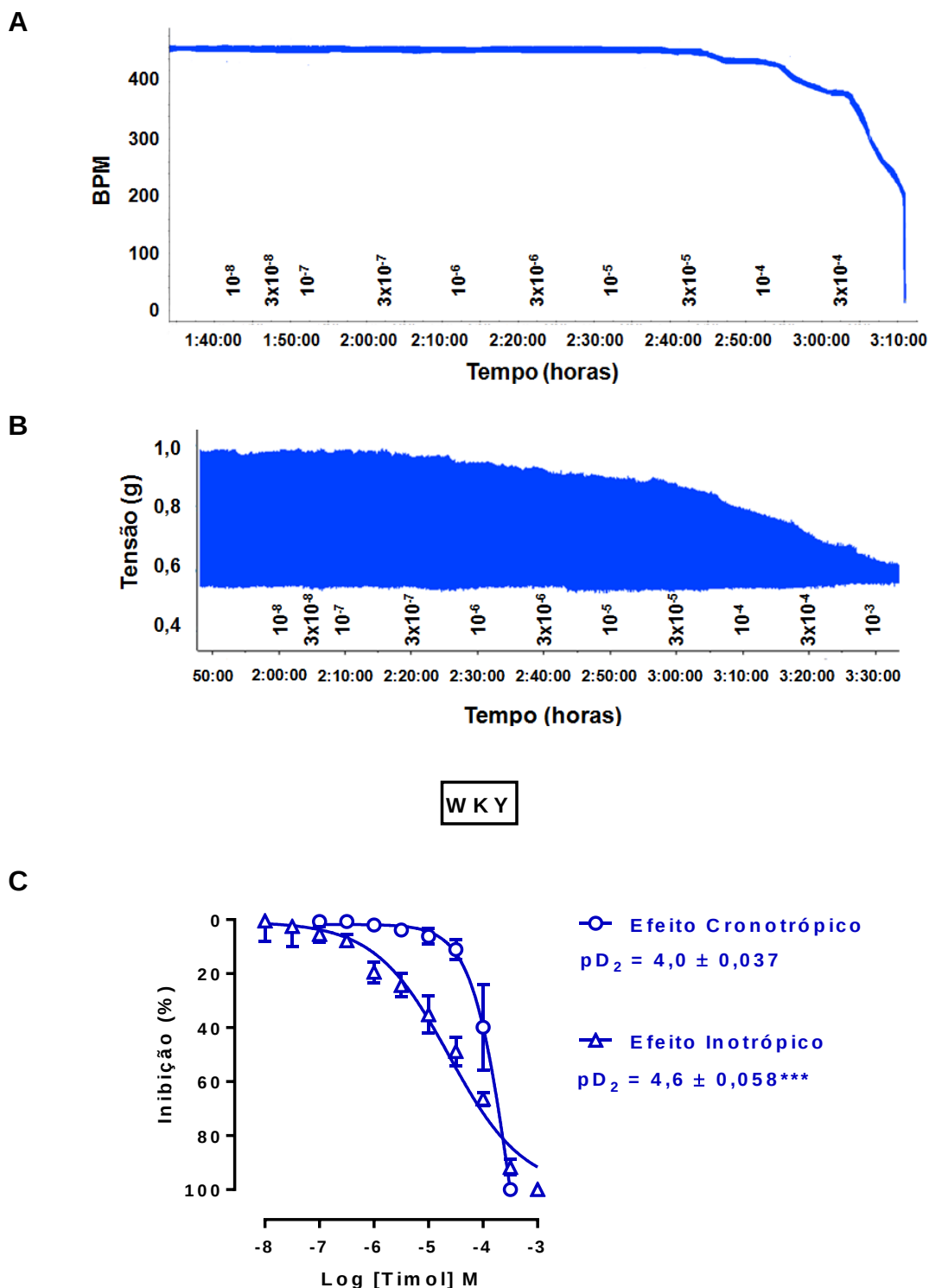
Figura 5 A. Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato SHR. **B.** Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato SHR. **C.** Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por timol. Curvas concentração-resposta para o timol em átrios direito ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) e esquerdo ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) isolados de rato SHR. Os dados estão representados como médias $\pm$ erro padrão da média dos experimentos. *** $p < 0,001$ (teste t).



5.2 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol em animais WKY

Este protocolo experimental em átrio foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos cardíacos *in vitro* do timol na linhagem de animais WKY. Os efeitos de timol sobre o cronotropismo e inotropismo cardíacos foram avaliados em átrios direito e esquerdo isolados de rato WKY, respectivamente. A administração do timol (10^{-8} – 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa às preparações atriais isoladas de animais WKY foi capaz de induzir um efeito cronotrópico negativo ($PD_2 = 4,0 \pm 0,037$, $E_{máx} = 100 \pm 0\%$, $n = 5$). No átrio esquerdo a administração de timol (10^{-8} – 10^{-3} M) induziu um efeito inotrópico negativo de maneira dependente de concentração ($PD_2 = 4,6 \pm 0,058$, $E_{máx} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$). Assim como observado para os animais SHR, o efeito sobre a força de contração cardíaca apresentou maior potencia ($p < 0,001$) quando comparado ao efeito induzido no cronotropismo cardíaco. O efeito do timol sobre a cronotropismo e inotropismo em preparações de átrios isolados de ratos WKY são mostrados na figura 6.

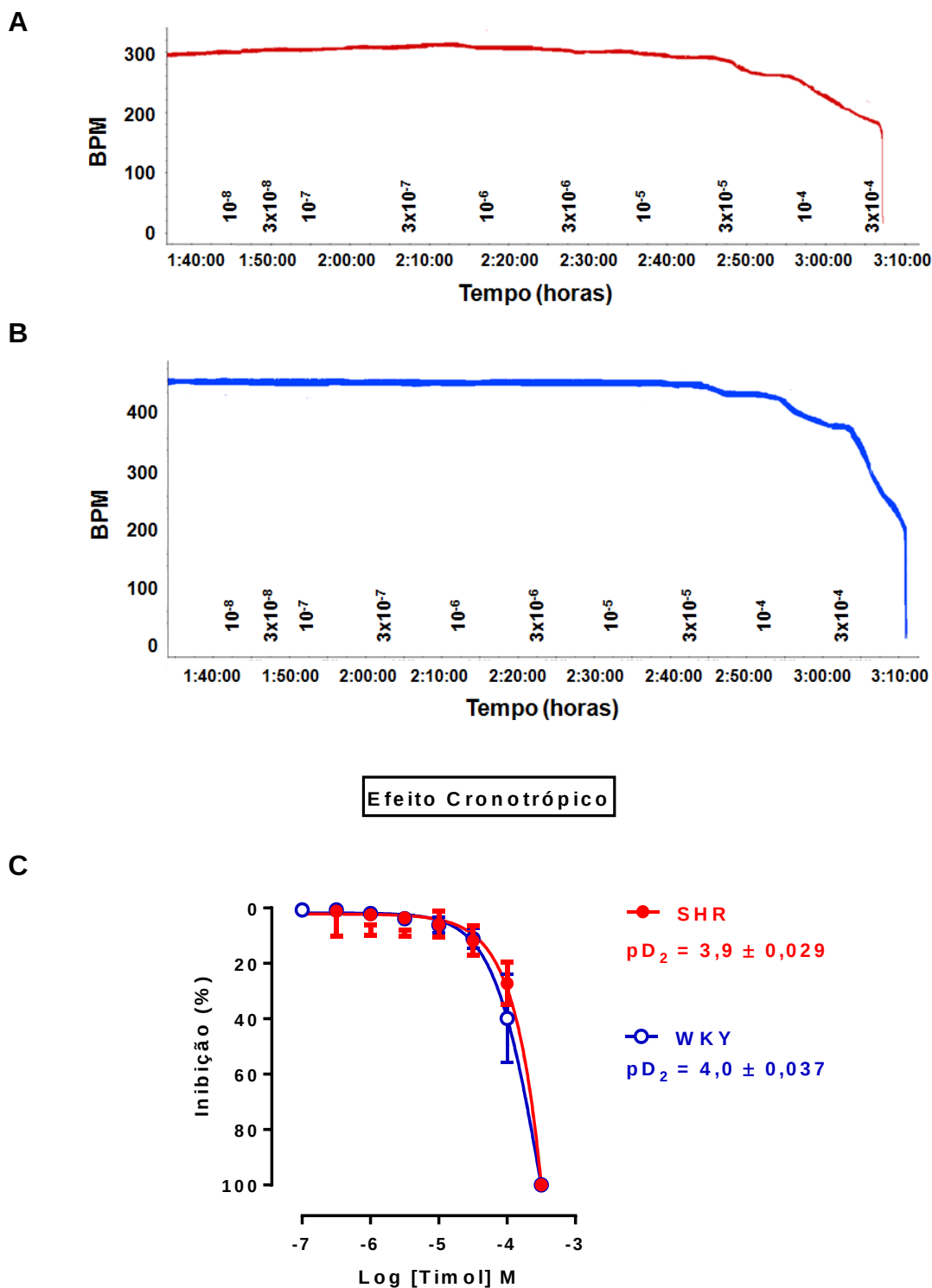
Figura 6 A. Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato WKY. **B.** Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato WKY. **C.** Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por timol. Curvas concentração-resposta para o timol em átrios direito ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) e esquerdo ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) isolados de rato WKY. Os dados estão representados como médias $\pm$ erro padrão da média dos experimentos. *** $p < 0,001$ (teste t).



5.3 Comparação do efeito cronotrópico negativo induzido pelo timol em animais SHR e WKY

Quando comparado o efeito cronotrópico induzido pelo timol nos dois modelos animais, foi observado que o monoterpreno reduziu a frequência de batimentos do átrio direito de maneira estatisticamente semelhante em ratos hipertensos ($pD_2 = 3,9 \pm 0,029$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 10$) e normotensos ($pD_2 = 4,0 \pm 0,037$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 5$), como mostrado na figura 7.

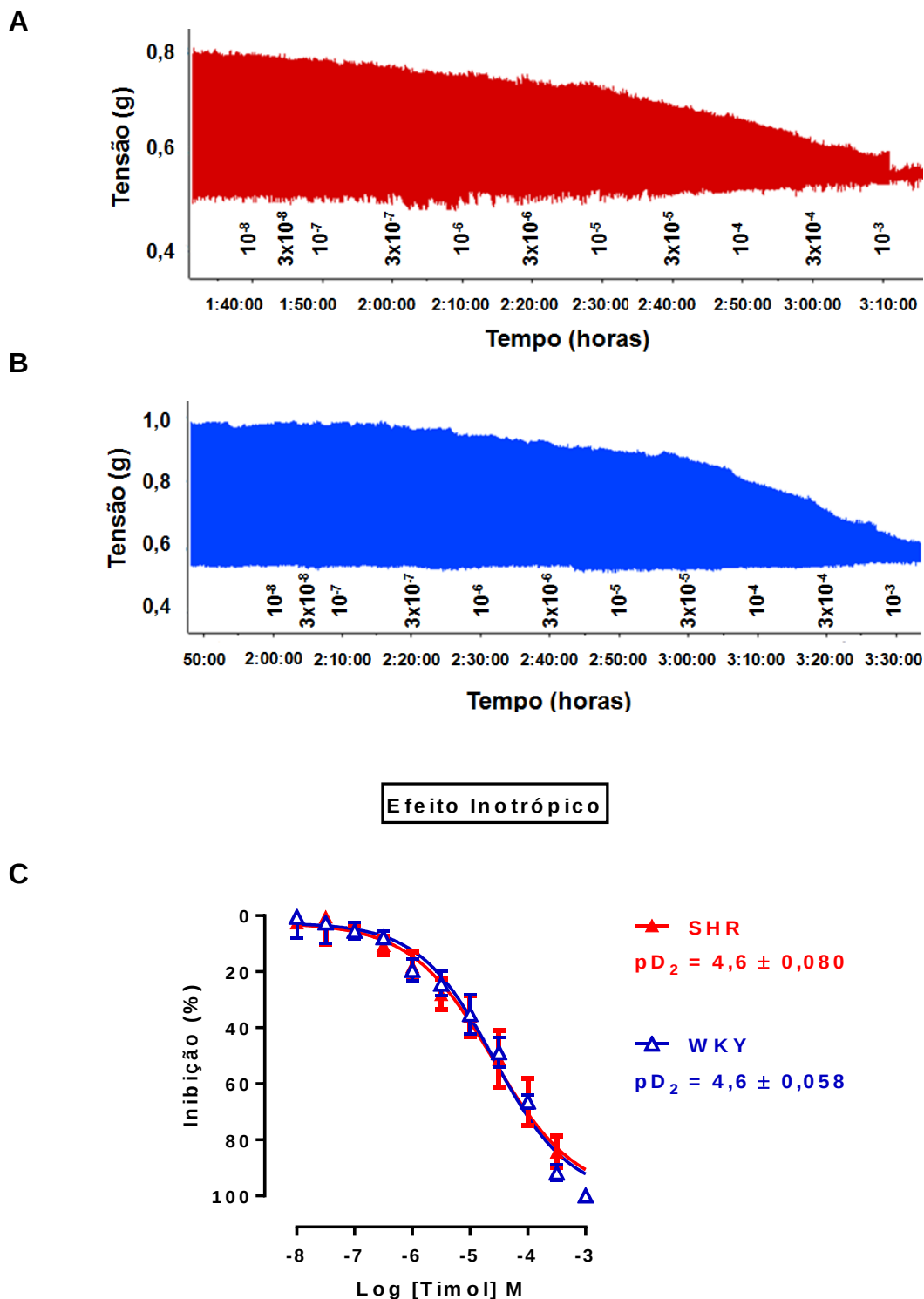
Figura 7 A. Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato SHR. **B.** Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrio direito isolado de rato WKY. **C.** Efeito cronotrópico induzido por timol em ratos SHR e WKY. Curvas concentração-resposta para o timol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em átrios direitos isolados de animais SHR e WKY. Os dados estão representados como médias $\pm$ erro padrão da média dos experimentos. *** $p < 0,001$ (teste t).



5.4 Comparação do efeito inotrópico negativo induzido pelo timol em animais SHR e WKY

Quando comparado o efeito inotrópico induzido pelo timol em átrio isolado de ratos normotensos e hipertensos, foi observado que o composto reduziu a força de contração do átrio esquerdo de maneira estatisticamente semelhante em ratos hipertensos ($PD_2 = 4,6 \pm 0,080$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$) e normotensos ($PD_2 = 4,6 \pm 0,058$, $E_{m\acute{a}x} = 100 \pm 0\%$, $n = 7$), como mostrado na figura 8.

Figura 8 A. Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato SHR. **B.** Representação do traçado original de um experimento da curva concentração-resposta do timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrio esquerdo isolado de rato WKY. **C.** Efeito inotrópico induzido por timol em ratos SHR e WKY. Curvas concentração-resposta para o timol ($10^{-8} - 10^{-3}$ M) em átrios esquerdos isolados de animais SHR e WKY. Os dados estão representados como médias $\pm$ erro padrão da média dos experimentos. *** $p < 0,001$ (teste t).



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos cardíacos induzidos pelo timol, um monoterpene encontrado na constituição dos óleos essenciais de algumas plantas, em um modelo animal de hipertensão essencial, bem como em seu controle normotenso.

São relatados na literatura efeitos de diversos óleos essenciais sobre a função cardiovascular e os seus mecanismos de ação. Cunha e colaboradores (2004) demonstraram que o óleo essencial presente nas folhas de *Ocotea duckei* Vattimo foi capaz de induzir a hipotensão em ratos, e isto ocorreu devido à diminuição da RVPT, bem como a bradicardia devido à ativação indireta dos receptores muscarínicos cardíacos por meio do estímulo do nervo vago. Além disso, também foram relatados os efeitos cronotrópico e inotrópico negativos em átrio de rato, por inibir o influxo de Ca^{2+} . Em outro estudo, Santos e colaboradores (2007) reportaram que o óleo essencial da *Hyptis fruticosa* tem um efeito hipotensor com aumento da frequência cardíaca, provavelmente de forma reflexa. A hipotensão parece ser resultado de uma vasodilatação direta, provavelmente devido a uma inibição do influxo dos íons Ca^{2+} através de canais de Ca_v .

A literatura é contemplada de alguns estudos farmacológicos de plantas medicinais que possuem o timol como constituinte dos seus óleos essenciais, sobre o sistema cardiovascular. É o caso do óleo essencial da espécie *Lippia microphylla* Cham. (OELM), que possui como constituinte majoritário o timol. O OELM promoveu um relaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato de maneira independente do endotélio vascular, provavelmente mediado por uma inibição do influxo de Ca^{2+} por meio de canais Ca_v e esses efeitos farmacológicos induzidos pelo OELM em artéria mesentérica parecem ser mediados pelo o timol (ARAÚJO, 2011).

A literatura relata que o timol gerou um efeito inotrópico negativo no músculo cardíaco de cães e cobaias, devido redução do teor de cálcio do retículo sarcoplasmático devido à combinação da liberação de Ca^{2+} induzida por timol e inibição da bomba de cálcio, o que indica que este monoterpene é capaz de atuar na maquinaria contrátil da musculatura cardíaca (SZENTRANDRÁSSY et al., 2004). Mais tarde, foi relatado que o timol inibe de maneira dependente de concentração as

$I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos isolados de ratos SHR e WKY e induz hipotensão, bradicardia e relaxamento em diferentes leitos vasculares nestes animais (ARAÚJO, 2011). Mais recentemente, foi visto que o timol apresenta efeitos protetores sobre os danos inflamatórios recorrentes da indução infarto do miocárdio por isoproterenol em ratos Wistar, efeitos estes gerados por meio da inibição da liberação de enzimas lisossomais e redução da expressão de citocinas pró-inflamatorias (MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015).

Então, devido aos vários estudos já publicados na literatura sobre a ação cardiovascular dos monoterpenos constituintes dos óleos essenciais e também devido aos poucos estudos sobre as ações do timol no sistema cardiovascular e de suas atividades cardíacas, foi realizado um trabalho visando verificar se o composto atua sobre a frequência e a força de contração do coração, bem como se existem diferenças de seus efeitos em animais hipertensos e normotensos.

Sabendo que os animais SHR representam um importante modelo experimental de hipertensão essencial humana, foi escolhido este modelo de hipertensão para caracterização farmacológica dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo timol. Para isto, foram realizados experimentos por meio da técnica de sistema de órgãos isolados *in vitro* utilizando átrios isolados de ratos SHR e WKY.

A automaticidade cardíaca foi avaliada em preparações de átrio direito isolado de rato, pois é neste átrio que são encontradas as células autoexcitáveis responsáveis por gerar a frequência cardíaca. Foi observado que o timol induziu intenso efeito cronotrópico negativo, tanto em ratos SHR quanto em ratos WKY, atingindo o efeito máximo de 100% e apresentando potências equivalentes em ambos os animais. A força contrátil foi avaliada através das preparações de átrio esquerdo e foi observado que concentrações crescentes do timol reduziram gradualmente a contratilidade do átrio esquerdo, com efeito inotrópico negativo máximo de 100%, sendo este efeito, bem como as potências, equivalentes em ambos os animais. Quando comparados os efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol, foi observado que os parâmetros em estudo atingiram o efeito máximo de 100%, entretanto o efeito inotrópico negativo foi mais potente tanto em animais SHR quanto em WKY. Estes dados estão em concordância com a literatura que mostra que o timol induz vasorrelaxamento dependente de concentração em artéria mesentérica e aorta torácica de ratos

normotensos e hipertensos de forma similar em ambos os animais e no mesmo estágio da hipertensão avaliado no presente estudo (ARAÚJO, 2011).

Os resultados obtidos, que demonstram que o timol tem efeito máximo de 100% sobre o cronotropismo e inotropismo cardíacos *in vitro*, estão relacionados com as concentrações aplicadas nos átrios isolados de ratos SHR e WKY até atingir estes efeitos. Vale salientar que alguns medicamentos utilizados atualmente na clínica para a terapia anti-hipertensiva e antiarrítmica, como o é o caso do diltiazem e do verapamil, que são bloqueadores dos canais de cálcio, podem reduzir a contratilidade e a condutibilidade do coração e ainda desencadeiam, como efeito adverso, a bradicardia, a piora da insuficiência cardíaca e até a parada cardíaca em altas doses (BOMBIG; PÓVOA, 2009; ABERNETHY; SCHWAR, 1999).

A observação de que o timol é capaz de interagir com Ca_v1 (tipo-L) em miócitos vasculares e apresenta efeito inibitório sobre as $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos de ratos normotensos e hipertensos (ARAÚJO, 2011) e os estudos que demonstram que o timol induz inibição das $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos isolados de cães e humanos (MAGYAR et al., 2002), corroboram com a hipótese de que os efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo timol em animais normotensos e hipertensos sejam devido a uma ação do timol sobre o músculo cardíaco através da interação com canais Ca_v cardíacos. Entretanto, outros protocolos experimentais devem ser realizados a fim de descrever esse mecanismo.

Estes resultados em conjunto demonstram que o timol apresenta um efeito direto sobre o cronotropismo e inotropismo cardíacos no modelo animal de hipertensão essencial utilizado, como também em seu controle. Além disso, foi observado que o monoterpeno apresenta o mesmo efeito tanto em animais hipertensos, quanto em animais normotensos, nos dois parâmetros avaliados neste estudo.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vitro*, demonstrou que:

- O timol induz os efeitos cronotrópico e inotrópico negativos em átrios direito e esquerdo, respectivamente, isolados de ratos SHR e WKY.
- O efeito inotrópico negativo induzido pelo timol apresenta maior potência quando comparado ao efeito cronotrópico negativo.
- Os efeitos sobre a frequência e a força de contração cardíaca não apresentam diferenças significativas entre animais hipertensos e animais normotensos.

REFERENCIAS

ABERNETHY, D. R.; SCHWAR, J. B. Calcium-Antagonist Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1447 – 1457, novembro. 1999.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739-1745, abril. 1998.

AIRES, M. M. **Fisiologia**, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1352 p.

ARAÚJO, I. G. A. **Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol**: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. João Pessoa, 2011. 158 p. Tese (Doutorado em farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

BALDISSERA V. D. A., CARVALHO M. D. B., PELLOSO S. M. Adesão ao tratamento não-farmacológico entre hipertensos de um centro de saúde escola. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 30, n. 1, p. 27 – 32, março. 2009.

BEER, A. M.; LUKANOV, J.; SAGORCHEV, P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 65 – 69, janeiro. 2007.

BERNE, R. M. et. al. **Fisiologia**, 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 289 p.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-204, janeiro. 2002.

BERS, D. M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2 ed. Holanda: Kluwer Academic, 2001.

BODI, I.; MIKALA, G.; KOCH, S. E.; AKHTER, S. A.; SCHWARTZ, A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n. 12, p. 3306-3317, dezembro. 2005.

BOMBIG, M. T. N.; PÓVOA, R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo – Antagonistas dos canais de cálcio. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 226 – 230, 2009.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 349-356, março. 2007.

BOURNE, H. R. **The Heart Physiology, from Cell to Circulation**, 3 ed. Filadélfia – Nova Iorque: Lippincott–Raven, 1998. 173 p.

BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. **Hipertensão**, 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

CALHOUN, D. A., BOOTH, J. N. III; OPARIL, S., IRVIN, M. R., SHIMBO, D., LACKLAND, D. T., HOWARD, G., SAFFORD, M. M., MUNTNER, P. Refractory hypertension: determination of prevalence, risk factors, and comorbidities in a large, population-based cohort. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 451 – 458, março. 2014.

CARVALHO, J. G. R. Hipertensão arterial secundária. In: SIMPÓSIO HIPERTENSÃO ARTERIAL. Medicina, Ribeirão Preto. v. 29, p. 220-231. 1996.

CHÁVEZ, J. P. **Terpenóides de Ocotea corymbosa [Meissn] Mez**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO-PÉREZ, F.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, n. 5, p. 423 – 427, setembro. 2005.

CONRAD, C. H.; BROOKS, W. W.; HAYES, J. A.; SEN, S.; ROBINSON, K. G. O. H. L. Myocardial Fibrosis and Stiffness With Hypertrophy and Heart Failure in the Spontaneously Hypertensive Rat. **Circulation**, v. 91, n. 1, p. 161-170, janeiro. 1995.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**, 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 464 p.

COSTA, A. F. **Farmacognósia**, 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.

COWLEY, A. W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v.7, n. 11, p. 829-840, novembro. 2006.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v. 16, p. 224 – 228, novembro. 1993.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: U.F.C., 1981. 209 p.

CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam**, 5 ed. São Paulo-SP: Helmus, 1995.

CUNHA, R. M.; FARIAS, S. R. Q.; DUARTE, J. C.; SANTOS, M. R. V.; RIBEIRO, E. A. N.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced in rats by the essential oil of *Ocotea duckei* Vattimo (LAURACEAE). **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p.12 – 18. 2004.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, fevereiro. 2000.

ELLIOTT, W. J. Systemic hypertension. **Currents Problems in Cardiology**, v. 32, n. 4, p. 201-259, abril. 2007.

FIELDS, L. E.; BURT, V. L.; CUTLER J. A.; HUGHES, J; ROCCELLA, E; SORLIE, P. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 398-404, outubro. 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**, 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1128 p.

HISAYAMA, T.; TAKAYANAGI, I. Some properties and mechanisms of thymolinduced release of calcium from the calcium-store in guinea-pig taenia caecum. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 69-82, janeiro. 1986.

HUANG, M. H.; WU, S. N.; SHEN, A. Y. Stimulatory actions of thymol, a natural product, on Ca²⁺-activated K⁺ current in pituitary GH(3) cells. **Planta Medica**, v. 71, n. 12, p. 1093 – 1098, 2005.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206 – 220, março. 2005.

KOSTYUK, P. G.; BELAN, P. V.; TEPIKIN, A. V. Free calcium transients and oscillations in nerve cells. **Experimental Brain Research**, v. 83, n. 2, p. 459 – 464, janeiro. 1991.

KUKANOVA, B; MRAVEC, B. Complex intracardiac nervous system. **Bratislava Medical Journal**, v. 107. n. 3, p. 45 – 51, 2006.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. The intracellular renin–angiotensin system: a new paradigm. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 208 – 214, julho. 2007.

KUNDU, S.; RAO, J. P. The story of spontaneously hypertensive rat (SHR): A Review. **Al Ameen Journal of Medical Science**, v. 1, n. 1, p. 65-66, 2008.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, setembro. 2001.

LERMAN, L. O.; CHADE, A. R.; SICA, V.; NAPOLI, C. Animal models of hypertension: an overview. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160 – 173, setembro. 2005.

LEVY, M.N. Parasympathetic control of the heart. **Neural Regulation of the heart**. Nova lorque: Oxford University Press, p. 97-129.1977.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 235, n. 5937, p.161 – 165, julho. 2009.

LONGO, A.; FERREIRA. D.; CORREIA, M. J. Variabilidade da frequência cardíaca. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 14, n. 3, p. 241 – 262, 1995.

MACMAHON, S.; PETO, R.; COLLINS, R.; GODWIN, J.; MACMAHON, S.; CUTLER, J.; SORLIE, P.; ABBOTT, R.; COLLINS, R.; NEATON, J.; ABBOTT, R.; DYER, A.; STAMLER, J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease: prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **The Lancet**, v. 335, n. 8692, p. 765-774, março. 1990.

MAGYAR, J.; SZENTANDRÁSSY, N.; BÁNYÁSZ, T.; FÜLÖP, L.; VARRÓ, A.; NÁNÁSI, P. P. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine

and human ventricular cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, n. 1–3, p. 29 – 36, março. 2004.

MAGYAR, J.; SZENTANDRÁSSY, N.; BÁNYÁSZ, T.; FÜLÖP, L.; VARRÓ, A.; NÁNÁSI, P. P. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 330-338, maio. 2002.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; ECHARD, B. W.; BAGCHI, D.; PREUSS, G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, p. 111-117, dezembro. 2001.

MCNEILL, J. R.; JURGENS, T. M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, n. 8 – 9, p. 803 – 821, outubro. 2006.

MEERAN, M. F. N.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Thymol attenuates inflammation in isoproterenol induced myocardial infarcted rats by inhibiting the release of lysosomal enzymes and downregulating the expressions of proinflammatory cytokines. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 153–161, maio. 2015.

MION JR, D.; MACHADO, C. A.; GOMES, M. A. M.; NOBRE, F. **Hipertensão Arterial – Abordagem geral**. Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2002.

MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology: Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 655, p.13 – 27, 2009.

MOREIRA, T. M. M., GOMES E. B., SANTOS J. C. Fatores de risco cardiovasculares em adultos jovens com hipertensão arterial e/ou *diabetes mellitus*. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 31, n. 4, p. 662 – 669, dezembro. 2010.

NASA, Y.; ICHIARA, K.; YOSHIDA, R.; ABIKO, Y. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British Journal of Pharmacology**, v.105, n. 3, p. 696-702, março. 1992.

NGUELEFACK, T. B.; MEKHFI, A. B.; DONGMO, A. B.; DIMO, T.; WATCHO, P.; ZOHEIR, J.; LEGSSYER, A.; KAMANYI, A.; ZIYYAT, A. Hypertensive effects of oral administration of the aqueous extract of *Solanum torvum* in L-NAME treated rats:

Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. **Nitric oxide**, v. 124, n. 3, p. 592 – 599, julho. 2009.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, n. 3, p. 282-293, janeiro. 1963.

OLIVEIRA, A. Tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial. **Revista Bioquímica da Hipertensão**. São Paulo – SP. 2011. Disponível em: <http://bioquimicadahipertensao2011.blogspot.com>. Acesso em 20/05/2015.

OPARIL, S; SCHMIEDER, R. E. New Approaches in the Treatment of Hypertension. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 1074 – 1095, março. 2015.

OPIE, L. H. **The Heart Physiology and Metabolism**, 2 ed. Nova Iorque: Raven Press, 1991. 145 p.

PALADE, P. Drug-induced Ca²⁺ release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Releases involving a Ca²⁺-induced Ca²⁺ release channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 6142-6148, maio. 1987.

PASSOS V. M.; ASSIS T. D.; BARRETO S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n. 1, p. 35 – 45, março. 2006.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D. M.; LIMA, F. C.; LAHLOUA, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341 – 350, junho. 2010.

PERIAGO, P. M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1 – 2, p. 141 – 148, agosto. 2001.

PERSELL, S. D. Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003 – 2008. **Hypertension**, v. 57, n. 6, p. 1076 – 1080, junho. 2011.

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system an overview of structure and function. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 2, p. 333-340, set – out. 2000.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

SAKAI, T.; FUJII, K.; TAKEMOTO, N. Thymol contracture and rapid cooling contraction of thymol-treated muscle fibres. **Nippon Seirigaku Zasshi**, v. 29, n. 10, p. 600-601. 1967.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186 – 191, abril. 2007.

SÁRKÖZI, S.; ALMÁSSY, J.; LUKÁCS, B.; DOBROSI, N.; NAGY, G.; JÓNA, I. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, n. 2 – 3, p. 167 – 174, fevereiro. 2007.

SHUBINA, L. P.; SIURIN, S. A.; SAVCHENKO, V. M. Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis. **Vrachebnoe Delo**, v. 5, p.66-67, maio. 1990.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana – Uma abordagem integrada**, 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 960 p.

SIM, J. J.; BHANDARI, S. K.; SHI, J.; LIU, I. L., CALHOUN, D. A., MCGLYNN, E. A.; KALANTAR- ZADEH, K., JACOBSEN, S. J. Characteristics of resistant hypertension in a large, ethnically diverse hypertension population of an integrated health system. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n. 10, p. 1099 – 1107, outubro. 2013.

SZENTANDRÁSSY, N.; SZENTESI, P.; MAGYAR, J.; NÁNÁSI, P. P.; CSERNOCH, L. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. **BMC Pharmacology**, v. 3, p. 3 – 9, julho. 2003.

SZENTANDRÁSSY, N.; SZIGETI, G.; SZEGEDI, C.; SÁRKÖZI, S.; MAGYAR, J.; BÁNYÁSZ, T.; CSERNOCH, L.; KOVÁCS, L.; NÁNÁSI, P. P.; JÓNA, I. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. **Life Sciences**, v. 74, n. 7, p. 909 – 921, janeiro. 2004.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309-319, março. 1981.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Arq Bras Cardiol**. 2010; 95 (1 supl.1): 1-51