

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LEANDRO ALVES SCHNEIDER

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA *SCUTIA BUXIFOLIA* REISSEK
SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS**

DISSERTAÇÃO

Uruguiana

2015

LEANDRO ALVES SCHNEIDER

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA *SCUTIA BUXIFOLIA* REISSEK
SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleci Menezes Moreira

Uruguaiana

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos|
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S359e Schneider, Leandro Alves
Efeitos do extrato aquoso da casca da Scutia
buxifolia Reissek sobre parâmetros cardiovasculares
em ratos / Leandro Alves Schneider.
68 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015.
"Orientação: Cleci Menezes Moreira".

1. Efeitos do extrato aquoso da casca da Scutia
buxifolia Reissek sobre parâmetros cardiovasculares
em ratos . I. Título.

LEANDRO ALVES SCHNEIDER

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA *SCUTIA BUXIFOLIA* REISSEK
SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS**

Dissertação do programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 14/12/2015.

Banca examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Cleci Menezes Moreira (Orientadora)



Prof.ª. Dr.ª. Daniela Bitencourt Rosa Leal (UFSM)



Prof. Dr. Eduardo André Bender (UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem dado a oportunidade de estar nesse mundo e mostrado o caminho do bem e da bondade.

À Rose, o amor da minha vida, obrigado pelo companheirismo, auxílio e incentivo. Sem você seria difícil esta conquista.

À Cleci, minha orientadora, amiga de todas as horas, sempre compreensiva em todos os momentos, pela qual, tenho a maior admiração pela excelente professora e profissional que és.

À pequena-grande Karol, obrigado pela ajuda e apoio recebidos. Este trabalho também é teu.

À Liane, que sempre esteve disposta a compartilhar os seus conhecimentos conosco, meu muito obrigado.

Aos colegas Maquelen, Carlos, Fabrício e demais integrantes do GPFisCar, meu eterno agradecimento.

Ao professor Dalton, um exemplo, que mesmo à distância, sempre compartilhou seu conhecimento, com certeza é um exemplo de vida a ser seguido.

Por fim, agradeço ao eterno criador que de alguma maneira colocou a Farmácia no meu caminho. Obrigado!

“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton

RESUMO

A *Scutia Buxifolia* Reissek, árvore com ocorrência no Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai é popularmente conhecida como coronilha, sendo as cascas do tronco utilizadas na medicina popular com ações hipotensora e cardiotônica. Tendo sido relatados alguns estudos de intervenções fitoterápicas com esta planta, que minimizaram as alterações decorrentes da hipertensão arterial em animais, objetivou-se neste estudo avaliar as propriedades cardiovasculares do extrato aquoso bruto das cascas do vegetal. O extrato foi preparado por aquecimento em água até atingir 80° C, resfriado e filtrado. Foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) machos, com 90 dias para ensaios agudos e 60 dias de idade para tratamentos prolongados. Foram realizadas medidas hemodinâmicas pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC), contratilidade miocárdica e atividades das enzimas conversora de angiotensina (ECA) e ATPase miosínica. Para a hemodinâmica no tratamento agudo foram administrados *i.v.* 5mg/kg de extrato em salina. Após, seguiram-se os protocolos dos papilares acrescentando-se 50 mg de extrato em 1mL de água no banho de órgãos sempre que a solução era renovada. No tratamento prolongado de 30 dias, os animais foram submetidos à gavagem com o extrato aquoso 100 mg/kg diariamente. Ao final dos 30 dias, foram realizadas as medidas hemodinâmicas, coleta do sangue por punção da artéria aorta abdominal, para avaliação da atividade da ECA sérica. Os corações foram dissecados para utilização do ventrículo esquerdo (VE) nas determinações das atividades da ATPase miosínica e ECA tecidual. No tratamento agudo houve efeito antihipertensivo do extrato administrado nos SHR, sem alteração nos WKY. No tratamento prolongado as PAS e PAD diminuíram para (55,75 ± 7,93) e (9,52 ± 3,21) mmHg $p < 0,05$, respectivamente, em SHR. Houve efeito inotrópico positivo em ambos tratamentos, agudo: Controle SHR - CS (0,163 ± 0,0050) para Tratado SHR -SS (0,186 ± 0,004); prolongado:CS (0,216 ± 0,007) para SS (0,325 ± 0,031) g/mg $p < 0,05$, sem alteração nos WKY. O tempo de ativação (TA) foi aumentado nos ratos WKY e SHR no tratamento agudo de 0,157 ± 0,002 para 0,167 ± 0,003 e 0,163 ± 0,005 para 0,186 ± 0,004 ms $p < 0,05$, respectivamente. Nos animais SHR houve aumento de força com a variação da frequência de estimulação ($p < 0,05$). A resposta inotrópica positiva ao cálcio foi potencializada nos dois tratamentos ($p < 0,05$). A resposta β -adrenérgica ao isoproterenol na presença do extrato foi potencializada nos grupos WKY (41,57%) e SHR (18,33%) no tratamento agudo, entretanto, no tratamento prolongado, houve uma diminuição desta resposta nos grupos WKY (19,37%) e SHR (23,35%). No

tratamento agudo houve aumento nas contrações tetânicas dos grupos WKY (48%) e SHR (30%). Porém, no tratamento prolongado, a contração tetânica foi aumentada nos SHR (81%). Nos animais SHR o tratamento com o extrato por 30 dias aumentou a atividade da ATPase miosínica em 87,45 nmol/Pi/min/mg de proteína. Os resultados obtidos através deste estudo nos revelam o potencial antihipertensivo e cardiotônico do extrato aquoso da *Scutia buxifolia* Reissek em animais SHR. O efeito cardiotônico possivelmente pode estar ocorrendo pela ativação dos canais de cálcio de membrana e aumento da atividade ATPásica da miosina.

Palavras-chaves: *Scutia buxifolia* Reissek, antihipertensivo, cardiotônico.

ABSTRACT

The *Scutia buxifolia* Reissek, tree with occurrence in Rio Grande do Sul, Argentina and Uruguay and popularly known as “coronilha”, being used as barks of the trunk in folk medicine with actions hypotensive and cardiotoxic. Having been reported few studies of herbal interventions with this plant, which minimized the effects from high blood pressure in animals, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular properties of the crude aqueous extract of the bark of the plant. The extract was prepared by heating water until 80°C, cooled and filtered. They were used Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) males at 90 days for acute tests and 60 days of age prolonged treatments. Hemodynamic measurements were performed systolic blood pressure (SBP), diastolic (DBP) and heart rate (HR), myocardial contractility and activities of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ATPase myosin. To hemodynamics in acute treatment were administered *i.v.* 5 mg/kg in saline extract. After followed by the protocols of the papillary adding 50 mg of extract in 1 ml of water in the organ bath whenever solution was renewed. In prolonged treatment of 30 days, the animals were subjected to gavage with the aqueous extract 100 mg/kg daily. At the end of 30 days, hemodynamic measurements were performed, blood collected by puncturing the abdominal aorta artery for assessment of serum ACE activity. Hearts were dissected for use indeterminations of the activities of miosínica ATPase and tissue ACE. The acute treatment was anti-hypertensive effect of the extract of the SHR, without change in WKY. In prolonged treatment decreased the SBP and DBP to (55.75±7.93) and (9.52±3.21) mmHg, $p < 0.05$ respectively in SHR. There was a positive inotropic effect in both treatments, acute: SHR control (CS) (0.163 ± 0.0050) for SHR treated (SS) (0.186 ± 0.004); prolonged: CS (0.216 ± 0.007) to SS (0.325 ± 0.031) g/mg $p < 0.05$, no change in WKY. The activation time (AT) was increased in WKY and SHR rats in the acute treatment of 0.157 ± 0.002 to 0.167 ± 0.003 and 0.163 ± 0.005 to 0.186 ± 0.004 ms $p < 0.05$, respectively. In the SHR was increased strength with the variation of pacing rate ($p < 0.05$). The positive inotropic response to calcium was enhanced in both treatments ($p < 0.05$). The β -adrenergic response to isoproterenol in the presence of the extract was enhanced in WKY group (41.57%) and SHR (18.33%) in the acute treatment, however, in prolonged treatment, there was a decrease in this response in WKY groups (19.37%) and SHR (23.35%). The acute treatment increased by strength in tetanic contractions of WKY group (48%) and SHR (30%). However, the prolonged treatment, the tetanic contraction was increased in SHR (81%). In

SHR treatment for 30 days increased the activity of ATPase myosin in 87.45 nmol/Pi/min/mg of protein. Results from this study reveal the potential antihypertensive and cardiogenic the aqueous extract of *Scutia buxifolia* Reissek in SHR. The cardiogenic effect may possibly be occurring through activation of membrane calcium channels and increased ATPase activity of myosin.

Keywords: *Scutia buxifolia* Reissek, antihypertensive, cardiogenic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotografia da <i>Scutia buxifolia</i> Reissek.....	25
Figura 2. Ilustração de cardiomiócito – Acoplamento excitação-contração. Adaptado de Bers et al., 2002).	30
Figura 3. Registro típico de contração estabilizada de músculo papilar de rato.	36
Figura 4. Registro típico de potenciações pós-pausas de músculo papilar de rato.....	37
Figura 5. Registro típico de diferentes estimulações elétricas em músculo papilar de rato.	37
Figura 6. Registro típico de contrações de músculo papilar de rato submetido à crescente concentração de cálcio.....	37
Figura 7. Registro típico de resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5} M) em músculo papilar de rato.....	38
Figura 8. Registro típico de contrações tetânicas de músculo papilar de rato.....	38
Figura 9. Índice de hipertrofia	41
Figura 10. Pressão arterial sistólica (PAS) (A), diastólica (PAD) (B) e frequência cardíaca (FC) (C) – Tratamento agudo.	43
Figura 11. Pressão arterial sistólica (PAS) (A), diastólica (PAD) (B) e frequência cardíaca (FC) (C) – Prolongado.....	44
Figura 12. Força Isométrica no tratamento agudo (A) e prolongado (B).....	45
Figura 13. Tempo de ativação (A) e relaxamento (B) das contrações – Tratamento agudo. ...	46
Figura 14. Tempo de ativação (A) e relaxamento (B) das contrações – Prolongado.....	47
Figura 15. Potenciações pós-pausa dos músculos papilares (PPP) dos animais WKY (A) e SHR (B) – Tratamento agudo.....	48
Figura 16. Potenciações pós-pausa dos músculos papilares (PPP) dos animais WKY (A) e SHR (B) – Prolongado.....	48
Figura 17. Força desenvolvida pelos músculos papilares de acordo com aumento de frequência de estimulação de 0,1 a 1 Hz, dos animais WKY e SHR – Tratamento agudo (A) e Prolongado (B).	49
Figura 18. Força desenvolvida pelos músculos papilares nas concentrações crescentes de Ca 0,62 a 3,75 mM, tratamento agudo (A) e prolongado (B).	50
Figura 19. Força desenvolvida pelos músculos papilares na presença de isoproterenol no tratamento agudo (A) e prolongado (B).	51
Figura 20. Força desenvolvida pelos músculos papilares no pico das contrações tetânicas – Tratamento agudo (A) e prolongado (B).	52
Figura 21. Atividade da ECA sérica (A) e tecidual (B) medida nos animais dos grupos CK, SK, CS e SS no tratamento prolongado.....	53
Figura 22. Atividade da ATPase miosínica medida em preparações de miosina do VE dos animais dos grupos CK, SK, CS e SS.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina difosfato

AI - Angiotensina I

AII - Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT1 – Receptor de Angiotensina II

ATP – Adenosina Trifostato

ATPase – Adenosinatrifosfatase

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AVE – Acidente Vascular Encefálico

[Ca]_i – Concentração de cálcio intracelular

CaMKII - Proteína quinase II dependente de Ca/calmodulina

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CK - Grupo Controle Wistar Kyoto

CS - Grupo Controle SHR

DCV – Doença cardiovascular

DIC – Doença isquêmica do coração

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FC – Frequência cardíaca

FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FR – Fatores de risco

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HEPES – N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

Hip-His-Leu - Hipuril-histidina-leucina

His-Leu – Histidina-leucina

HVE - Hipertrofia ventricular esquerda

IC – Insuficiência cardíaca

ICa – Corrente de cálcio

i.p. - intraperitoneal

Lmax - Comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima

L-NAME - N^o-nitro-L-arginina metil ester

M ± EPM – Média mais ou menos erro padrão da média

MHC - Cadeia pesada da miosina

Na⁺_i – Sódio intracelular

Na⁺/K⁺ATPase – Enzima Sódio Potássio ATPase

NCX - Trocador Na⁺/ Ca²⁺

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NTPDse – Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – Nível de significância

PA – Pressão arterial

PACS - Programa Agentes Comunitários de Saúde

PAD – Pressão arterial diastólica

PAS – Pressão arterial sistólica

PSF - Programa Saúde da Família

pH – Potencial Hidrogeniônico

PC – Peso Corporal

P_i – Fosfato inorgânico

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PPP – Potenciações pós-pausas

RS – Retículo sarcoplasmático

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

SERCA - Bomba de cálcio do RS

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SIPPEE – Sistema de Informação Projetos de Pesquisa, Ensino e Extensão

SK - Grupo Extrato Wistar Kyoto

SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SS - Grupo Extrato SHR

TA – Tempo de ativação

TCA – Ácido tricloroacético

TGF-β - Fator de crescimento transformador beta

TnC – Troponina C

TR – Tempo de relaxamento

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

UI – Unidade internacional

VE – Ventrículo esquerdo

WKY – Ratos Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	21
3.1.1	FAMÍLIA RHAMNACEAE	23
3.1.2	<i>SCUTIA BUXIFOLIA</i> REISSEK	23
3.2	HIPERTENSÃO ARTERIAL	25
3.3	CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	COLETA E PREPARAÇÃO DA <i>S. BUXIFOLIA</i>	33
4.1.1	PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO	33
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
4.2.1	RATOS WISTAR E SHR	33
4.2.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.2.2.1	Para o tratamento agudo	34
4.2.2.2	Para o tratamento prolongado (30 dias).....	34
4.3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	35
4.3.1	PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	35
4.3.2	AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA	35
4.3.2.1	Força Isométrica	36
4.3.2.2	Potenciações relativas após pausas (PPP)	36
4.3.2.3	Frequência de estimulação elétrica	37
4.3.2.4	Resposta inotrópica ao Cálcio	37
4.3.2.5	Resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol.....	38
4.3.2.6	Contrações tetânicas.....	38
4.3.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA.....	38
4.3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPASE MIOSÍNICA.....	39
4.3.4.1	Preparação da fração miosínica.....	39
4.3.4.2	Medida da ATPase miosínica	39
4.3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	TRATAMENTO AGUDO E PROLONGADO (30 DIAS)	41
5.1.1	ÍNDICE DE HIPERTROFIA.....	41
5.1.2	ESTUDO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	42
5.1.2.1	Pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca.....	42
5.1.3	ESTUDO DA CONTRAÇÃO MIOCÁRDICA	44
5.1.3.1	Análise da Força Isométrica.....	44
5.1.3.2	Análise dos parâmetros temporais: tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento(TR).....	46
5.1.3.3	Análise das potenciações pós-pausa.....	47
5.1.3.4	Análise das respostas dos músculos papilares frente às mudanças de frequência de estímulo.....	48
5.1.3.5	Efeito inotrópico ao Cálcio	50
5.1.3.6	Avaliação dos receptores β-adrenérgicos dos músculos papilares.....	51
5.1.3.7	Avaliação das contrações tetânicas dos músculos papilares.....	52
5.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	53
5.2.1	ESTUDO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA.....	53
5.2.2	ESTUDO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPASE MIOSÍNICA	54
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e seus derivados representam mais de 50% do total de substâncias em uso clínico para tratamento de doenças cardiovasculares (GURIB-FAKIN, 2006). O uso de plantas como medicamento, para prevenção ou tratamento de doenças, se deve a presença de metabólitos secundários, geralmente de imenso valor terapêutico, sintetizados pelas plantas (SIMÕES et al., 2007).

Diversas plantas medicinais são utilizadas pela população para o tratamento de patologias que afetam o sistema cardiovascular como a hipertensão, aterosclerose e a diabetes. No entanto, poucas dessas plantas têm sua segurança, efetividade e mecanismo de ação confirmada cientificamente (VORA et al., 2005). A validação das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros não pode ser feita somente com base no conhecimento e usos populares. Por isso, a autorização oficial do uso de plantas medicinais como medicamento é necessária e deve ser fundamentada em dados experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que demonstrem os benefícios obtidos a partir do uso de drogas de origem vegetal de forma que sejam superiores aos riscos que eles oferecem àqueles que os utilizam (YUNES et al., 2001).

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de acompanhamento médico em pacientes de muitos países do mundo (YUSUF et al., 2001). Estima-se que mais de 5 milhões de adultos nos Estados Unidos sofram de insuficiência cardíaca e que o tratamento destes pacientes custe ao sistema de saúde americano mais de 37 bilhões de dólares anualmente (LLOYD-JONES et al., 2009). Um dos principais fatores de risco para as desordens cardiovasculares é a pressão sanguínea elevada (CARRETERO et al., 2000). A hipertensão é uma das doenças mais comuns em humanos, sendo que de 90 a 95% dos hipertensos desconhece a causa (KU, 2006). É considerada de origem multifatorial (JACOB, 1999), envolvendo predisposição genética e fatores ambientais (fisiológicos e psicológicos) como dieta, atividade física, obesidade e fumo (CRACKOWER et al., 2002; KAKAR et al., 2006). De acordo com Ku (2006), a ideia mais aceita é que a hipertensão seja causada por uma interação entre fatores, do tipo genéticos-metabólicos e/ou patogênicos-ambientais.

O tratamento para a hipertensão se faz necessário para garantir a sobrevivência do paciente, bem como a qualidade de vida do mesmo (MAR et al., 2001), uma vez que é considerada uma das principais causas de eventos cardiovasculares, como infartos,

insuficiência cardíaca e AVC (acidente vascular cerebral). E, dentre os fatores de risco cardiovascular, a hipertensão apresenta-se como o mais preocupante, pois na maioria dos casos está presente de forma assintomática e crônica, sendo de detecção quase sempre tardia (SOUZA, 1999).

Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante períodos longos é a adesão do paciente ao tratamento. Esta adesão pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural/Plantas Medicinais, que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que “acreditam” na ação benéfica da planta e, desta forma, pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade. Além disto, as descobertas de novas substâncias com ação inédita irão aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (YUNES et al., 2001).

Neste contexto insere-se a *Scutia buxifolia* Reissek, uma pequena árvore ou arbusto nativo das matas do sul da América Meridional, com ocorrência principalmente no Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, pertencente à família Rhamnaceae, popularmente conhecida como coronilha (WASICKY et al., 1964). As cascas do tronco são utilizadas pela medicina popular como tendo ações diurética, hipotensora e cardiotônica (GONZALEZ, 1974).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase III. Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, as plantas medicinais estão tendo seu valor terapêutico pesquisado e ratificado pela ciência e vem crescendo sua utilização recomendada por profissionais de saúde.

Tratando-se de plantas medicinais, apesar das informações populares serem valiosas, ressalta-se a importância de estudos científicos que venham comprovar ou não estas informações, bem como determinar os possíveis efeitos tóxicos, a fim de proporcionar maior eficácia e segurança à população usuária. É importante salientar o crescente papel que a pesquisa acadêmica vem exercendo na busca de novos conhecimentos sobre as plantas, suas propriedades terapêuticas e toxicológicas (BRASIL, 1998).

No Brasil, 30% dos óbitos são por doenças cardiovasculares. Além disso, essas doenças representam um fator com impacto econômico importante, tendo em vista o número

de internações hospitalares, além da incapacitação dos indivíduos afetados. A *Scutia buxifolia* Reissek, fazendo parte do Bioma Pampa é usada empiricamente como terapia para as doenças cardiovasculares. Os fitoterápicos com eficácia comprovada poderão ser sugeridos com segurança para humanos hipertensos, como auxiliares aos medicamentos anti-hipertensivos, especialmente importantes como alternativa para os indivíduos resistentes ao uso de medicação ou para aqueles com dificuldades de aquisição. Tendo sido relatados alguns estudos de intervenções fitoterápicas que minimizaram as alterações decorrentes da hipertensão arterial em ratos, estudos do extrato aquoso bruto de coronilha, popularmente já utilizada como alívio nos casos de hipertensão, são necessários para comprovar o uso do vegetal como opção terapêutica contra a hipertensão arterial e melhoramento da função cardíaca (SOARES, 2005).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos do extrato aquoso da *Scutia buxifolia* Reissek na função cardiovascular de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos do extrato aquoso da planta sobre a hemodinâmica (pressões sistólica, diastólica e frequência cardíaca) no tratamento agudo e prolongado;
- Avaliar o efeito do extrato da planta na contratilidade miocárdica através da medida de força isométrica do músculo papilar no tratamento agudo e prolongado;
- Avaliar o efeito do extrato da planta sobre a atividade de enzimas envolvidas no sistema cardiovascular: ATPase da miosina e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) circulante e tecidual.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

A importância das pesquisas com plantas medicinais em países em desenvolvimento, como o Brasil, se dá por diversos motivos dentre os quais destacamos o fato de que, apesar de possuímos imensa biodiversidade vegetal, o crescimento de pesquisas nessa área ainda é baixo. Tal fato dificulta o uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pela população em geral devido à carência de informações adequadas sobre aspectos como eficácia e segurança desses produtos. Isso ainda estimula a crescente exclusão de espécies nativas, da medicina e dos guias farmacêuticos oficiais (BRASIL, 1998; SILVA et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006, 2008).

Em um país biologicamente tão rico, pesquisas com plantas medicinais deveriam ser mais incentivadas, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (BRASIL, 1998; FALCÃO et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2005; MARIZ et al., 2006; SILVA et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006; 2008; CARVALHO et al., 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008). Este aumento justifica-se por se acreditar que os fitoterápicos apresentam menor número de efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas, e por se mostrarem aparentemente eficazes em casos onde a medicina convencional não alcançou resultados mais seguros (CALIXTO, 2000).

Na América Latina, em especial nas regiões tropicais, existem diversas espécies de plantas medicinais de uso local, com possibilidade de geração de uma relação custo-benefício bem menor para a população, promovendo saúde a partir de plantas produzidas localmente. No Brasil existem diversidades e peculiaridades, com concepções, opiniões, valores, conhecimentos, práticas e técnicas diferentes, que precisam ser incorporadas e respeitadas no cotidiano, influenciadas por hábitos, tradições e costumes (SIMÕES et al., 2007).

O comércio de plantas medicinais e produtos fitoterápicos encontra-se em expansão em todo o mundo e um dos fatores que contribui para isto é o alto custo dos medicamentos industrializados (BRANDÃO et al., 1998). Por isso, parte da população de países subdesenvolvidos permanece dependente de plantas medicinais para o cuidado da saúde, devido ao estado de pobreza destes países (NOUMI et al., 1999).

Atualmente, existe uma tendência para estudos etnobotânicos, referentes à utilização de plantas medicinais como alternativa e solução terapêutica, e também de evolução farmacológica e fitoquímica de novos compostos bioativos. Em adição, a OMS encoraja a inclusão de plantas medicinais em programas de países em desenvolvimento, por causa do grande potencial que essas plantas representam no combate a várias doenças (NOUMI et al., 1999). O Ministério da Saúde, através da Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, implementou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) como forma de incentivar o uso de plantas medicinais como tratamento em pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (MONTELLANO, 1975; UNANDER et al., 1995). Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (JÚNIOR et al., 1996).

Mesmo a fitoterapia sendo eficaz, cabe aos profissionais de saúde orientar as pessoas quanto ao uso indiscriminado de algumas plantas medicinais. Sendo um assunto de Saúde Pública, caberia aos profissionais de saúde e aos programas nacionais de saúde (Programa Saúde da Família - PSF e Programa Agentes Comunitários de Saúde - PACS) esclarecer dúvidas da população, orientando a utilização correta de plantas medicinais nas Unidades de Saúde e nas visitas domiciliares (ARNOUS et al., 2005).

3.1.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE

A família Rhamnaceae compreende cerca de 50 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita e hábito muito variável, que inclui desde árvores e arbustos, com frequência xerófilos, até trepadeiras lenhosas e raras ervas (SANTOS, 2008).

No Brasil, de acordo com Souza et al. (2005), ocorre 13 gêneros na flora nativa, sendo que algumas espécies da família têm importância farmacêutico-medicinal. Destacam-se, neste sentido, *Discaria americana*, *Gouania ulmifolia*, *Scutia buxifolia*, *Reissekia smilacina*, *Zizyphus exserta* e *Z. mauritiana*, no tratamento de doenças infecciosas. *Discaria americana*, *Ceanothus spp.*, *Colletia spinosissima* e *C. paradoxa*, são usadas no combate à febre; *Hovenia dulcis*, para asma; *Rhamnus catharticus*, *R. purshiana*, *R. pumila* e *R. alpina*, como laxantes (popularmente conhecidas como cáscara-sagrada); *Discaria americana*, *Scutia buxifolia*, *Retanilla ephedra*, *R. obcordata*, *Rhamnus inebrians* e *Ceanothus spp.*, como tônicos; e *Scutia buxifolia* por suas propriedades digitalóides, diuréticas e hipotensivas (CORRÊA, 1926; MARZOCCA et al., 1951; TORTOSA, 1983).

Ainda com relação às propriedades terapêuticas, cabe mencionar que, estudos fitoquímicos e farmacológicos recentes, realizados na Universidade Federal de Santa Maria, indicaram a presença de atividades antimicrobianas em extratos de partes aéreas, bem como nas raízes de *Discaria americana*, *Colletia paradoxa*, *Gouania ulmifolia*, *Scutia buxifolia* e *Condalia buxifolia*, comprovando as propriedades medicinais destas plantas (GIACOMELLI, 2005; MALDANER, 2005; MISSAU, 2003).

3.1.2 SCUTIA BUXIFOLIA REISSEK

A espécie *S. buxifolia*, conhecida popularmente como coronilha, é uma planta nativa da América do Sul, ocorrendo principalmente no Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai (MENEZES et al., 1996; WASICKY et al., 1964). É usada popularmente como cardiotônica, hipotensora e diurética através da infusão em água da casca do tronco e folhas (WASICKY et al., 1964).

Wasicky e colaboradores (1964) encontraram nesta planta, glicosídeos antracênicos, alcaloides, saponinas e taninos. Extratos preparados da casca, em álcool a 21% provocaram bradicardia e parada cardíaca em corações isolados de rã, mas não no de sapo; bradicardia no coração *in situ* de *Cavia porcellus* e hipotensão arterial no cão anestesiado e no homem. Da porção diclorometano do extrato etanólico das cascas do tronco e das folhas de *Scutia buxifolia*

Reissek foram isolados lupeol, β -sitosterol e estigmasterol, sendo o β -sitosterol um dos constituintes majoritários, e da fração com acetato de etila, foram isolados os constituintes quercitina, quercitrina e isoquercitrina (BOLIGON et al., 2009a, 2010).

Os alcaloides extraídos foram isolados e identificados como alcaloides peptídicos cíclicos denominados “scutianinas” (TSCHESCHE et al., 1967, 1977). Maldaner (2009), verificou que metabólitos isolados extraídos da casca da *S. buxifolia* (scutianina B, scutianina C e scutianeno C), foram bastante promissores na inibição da acetilcolinesterase (AChE). Maldaner (2011) realizou “screening” fitoquímico de frações da casca desta espécie confirmando a presença de alcaloides ciclopeptídicos. As atividades antimicrobianas das frações e metabólitos (contra bactérias gram negativas e gram positivas) sugerem que tanto a estereoquímica dos aminoácidos que constituem a estrutura dos alcalóides bem como a presença do grupo básico (β -fenilserina) destas estruturas, são importantes para este tipo de atividade (MOREL et al., 2005).

É sugerida também atividade antioxidante de derivados de flavonol e polifenóis extraídos desta planta (BOLIGON et al., 2009, 2012a, b), assim como atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial extraído de suas cascas (BOLIGON et al., 2014a). A citotoxicidade de extratos das folhas, galhos e cascas do tronco desta planta foi avaliada pelo ensaio da *Artemisia salina*, bem como a atividade antimicrobiana contra várias cepas de microrganismos (BOLIGON et al., 2012b). O extrato bruto de *S. buxifolia* nas concentrações de (100, 200 e 400 mg/kg) demonstrou proteção da mucosa gástrica de ratos frente a danos causados por etanol (BOLIGON et al., 2014b). Freitas et al. (2013), avaliaram a hepatotoxicidade do extrato aquoso da espécie em ratos, demonstrando a sua não toxicidade.

Foi encontrada uma inibição nas atividades da NTPDse e 5'-nucleotidase de linfócitos e plaquetas bem como proteção da agregação plaquetária induzida por ADP com uso do extrato aquoso de folhas e cascas (BOLIGON et al., 2015).

Antunes (1993), utilizando extratos da casca, cerne e folhas de *Scutia buxifolia* Reissek sobre músculo liso de jejuno de rato, observou uma inibição na contração induzida por acetilcolina. Além disso, constatou inibição dose-dependente com efeito reversível no músculo estriado (reto abdominal de rã) com os extratos alcoólico e aquoso das folhas. Em coração isolado de rato e rã, encontrou alterações no cronotropismo e inotropismo, utilizando extrato aquoso bruto das folhas. Com a administração intravenosa deste extrato aquoso em cães anestesiados, observou inicialmente queda da pressão arterial (15%), que permaneceu por mais tempo com 10% abaixo do controle.

Da Silva (2012), utilizando extrato bruto das cascas e das folhas obtido da planta *Scutia buxifolia* Reissek e suas respectivas frações, sugere que componentes ativos presentes são capazes de promover relaxamento vascular de modo dependente e independente de endotélio funcional, parecendo depender da ativação do óxido nítrico e da subsequente estimulação da guanilato ciclase solúvel. Ainda, Da Silva (2015), observou os efeitos hipotensivos e diuréticos da fração solúvel butanólica das cascas da *S. buxifolia* (Figura 1) sobre ratos normotensos e SHR, sugerindo, novamente, a dependência da via do NO e guanilatociclase.

Figura 1. Fotografia da *Scutia buxifolia* Reissek.



<http://www.chicosnaturalistas.com.ar/img/cor>

<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florar>

3.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma apresentação clínica multifatorial caracterizada por elevados e sustentados níveis de pressão arterial (PA), associando-se, frequentemente, a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos (coração, encéfalo, rins e

vasos sanguíneos) e a alterações no metabolismo que, por consequência, levam ao aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais ou não fatais (SBC, 2010).

A HAS pode ser classificada em primária e secundária. A HAS primária é poligênica, de etiologia desconhecida e parece improvável que uma única causa explique suas diversas alterações hemodinâmicas e fisiopatológicas. Quaisquer que sejam os mecanismos patogênicos envolvidos, eles podem acarretar um aumento da resistência vascular periférica total induzindo vasoconstrição ou a um aumento do débito cardíaco ou ambos (CASTRO, 1999), razão pela qual participam dessa gênese, os aspectos genéticos, vasculares, humorais, renais e neurais, podendo ser modificáveis (tabagismo, sedentarismo, alimentação, alcoolismo, obesidade) e não modificáveis (raça, sexo, faixa etária, hereditariedade) (NOBRE et al., 1998). Por outro lado a HAS secundária está associada a uma causa específica que pode ser renal ou não (CASTRO, 1999).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, é considerada um dos principais fatores de risco (FR) modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA de forma linear, contínua e independente. Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PA (54% por acidente vascular encefálico - AVE e 47% por doença isquêmica do coração - DIC), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. Em nosso país, as DCV têm sido a principal causa de morte. Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório (SBC, 2010).

O revestimento endotelial dos vasos sanguíneos é crítico para a saúde vascular e constitui uma das principais defesas contra a hipertensão. A disfunção endotelial se caracteriza pela liberação alterada de fatores relaxadores derivados do endotélio (por exemplo, óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e aumenta a liberação de fatores constritores, pró-inflamatórios, pró-trombóticos e de crescimento derivados do endotélio. Estes últimos incluem a endotelina, o tromboxano e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). O endotélio de todos os vasos sanguíneos possui a enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser ativada por bradicinina ou acetilcolina, ou pela força de cisalhamento que acompanha a hipertensão decorrente do aumento da pressão de pulso. Uma vez ativada, a NOS converte L-arginina em citrulina, uma substância inerte, e em óxido nítrico (NO), um gás volátil que se difunde para a musculatura vascular lisa adjacente e ativa uma série de quinases G que culminam em vasodilatação (LIBBY et al., 2010).

A variação de diâmetro das arteríolas em consequência da vasoconstrição e da vasodilatação afeta o fluxo sanguíneo através dos capilares e, ao mesmo tempo, a pressão arterial a montante dos capilares. Dessa maneira, o aumento da resistência periférica total devido à vasoconstrição arteriolar pode elevar a pressão arterial. A pressão arterial também pode ser aumentada pelo aumento do débito cardíaco. Este pode ser consequência da elevação da frequência cardíaca ou do volume sistólico, que por sua vez são afetados por outros fatores. As três variáveis mais importantes que afetam a pressão arterial são a frequência cardíaca, o volume sistólico (determinado basicamente pelo volume sanguíneo) e a resistência periférica total. O aumento de qualquer um desses fatores, quando não compensado por uma diminuição de outra variável, acarreta aumento da pressão arterial (FOX, 2007).

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um dos mecanismos mais importantes que contribuem para a disfunção da célula endotelial, remodelamento vascular e hipertensão. A renina, uma protease produzida apenas pelas células juxtaglomerulares renais, cliva o angiotensinogênio (substrato da renina produzido no fígado) em angiotensina I (AI), que é convertida pela enzima conversora de angiotensinogênio (ECA) em angiotensina II (AII). A ECA é mais abundante nos pulmões, mas também está presente no coração e na vasculatura sistêmica (ECA tecidual). A quimase, uma serino-protease presente no coração e nas artérias sistêmicas, fornece uma via alternativa para a conversão de AI em AII. A interação da AII com os receptores AT1 acoplados à proteína G ativam numerosos processos celulares que contribuem para a hipertensão e aceleram a lesão hipertensiva de órgãos-alvo. Estes processos incluem vasoconstrição, geração de espécies reativas de oxigênio, inflamação vascular, remodelamento vascular e cardíaco e produção de aldosterona, principal mineralocorticoide. Existem evidências crescentes de que a aldosterona, a AII e até mesmo a renina e a pró-renina ativam múltiplas vias de sinalização que podem afetar a saúde vascular e causar hipertensão (LIBBY et al., 2010).

Em pacientes hipertensos, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é um poderoso fator preditivo independente de morbidade e mortalidade, predispondo à insuficiência cardíaca, taquiarritmia ventricular, AVC isquêmica, fibrilação atrial e AVC embólico. Tem havido muitos avanços na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na hipertrofia dos cardiomiócitos por sobrecarga de pressão. Além disso, as anormalidades estruturais no coração do hipertenso não se limitam à hipertrofia dos cardiomiócitos. Elas também incluem a hipertrofia da túnica média das artérias coronárias intramiocárdicas, assim como a deposição de colágeno, levando à fibrose cardíaca. Estas alterações resultam em parte

da sobrecarga de pressão e em parte da ativação neuro-hormonal que contribui para a hipertensão. Em modelos animais, a AII, a aldosterona, a noradrenalina e a pró-renina aceleram a hipertrofia dos cardiomiócitos por sobrecarga de pressão e promovem fibrose cardíaca, que é o marco principal da HVE patológica (LIBBY et al., 2010).

3.3 CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Dentre as doenças destacadas anteriormente, a Insuficiência Cardíaca (IC) pode estar relacionada com a excessiva vasoconstrição causada pela hipertensão arterial sistêmica e o reduzido débito cardíaco. Embora esses processos hemodinâmicos sejam os principais responsáveis pela IC, não podemos deixar de enfatizar as mudanças moleculares e celulares inerentes à doença com função sistólica deprimida como determinantes primários para a progressão do quadro patológico. Vários eventos cardíacos patológicos, advindos tanto de uma sobrecarga de volume quanto de sobrecarga de pressão ou alterações metabólicas, desencadeiam alterações em proteínas envolvidas na contratilidade miocárdica. As principais moléculas envolvidas no ciclo de contração-relaxamento são as duas proteínas contráteis principais, o segmento fino, actina, e o segmento grosso, miosina. São os íons cálcio que iniciam o ciclo de contração interagindo com a troponina C e aliviando a inibição exercida sem sua presença pela troponina I. Participando deste processo está a titina, uma proteína recém descoberta, que é uma grande molécula elástica com a função de sustentação da miosina. O ciclo da contração em termos moleculares se dá através da hidrólise do ATP em ADP e P_i pela atividade de ATPase da cabeça miosínica flexionando-a. Quando o ATP é hidrolisado, a cabeça miosínica liga-se a uma unidade actínica adjacente. O P_i é então liberado da cabeça havendo uma ligação forte da cabeça miosínica à actina. Em seguida, a cabeça estende-se, isto é, organiza-se (LIBBY et al., 2010).

O mecanismo de acoplamento excitação-contração cardíaco compreende os processos de ativação elétrica dos miócitos que desencadeiam a contração do coração (Figura 2). O cálcio é um íon intimamente envolvido na atividade elétrica cardíaca e, por interagir diretamente com os miofilamentos, na contração muscular. Durante o potencial de ação cardíaco o cálcio entra na célula através dos canais de cálcio ativados por despolarização e gera a corrente de cálcio, chamada I_{Ca} , que geralmente se refere à entrada através dos canais

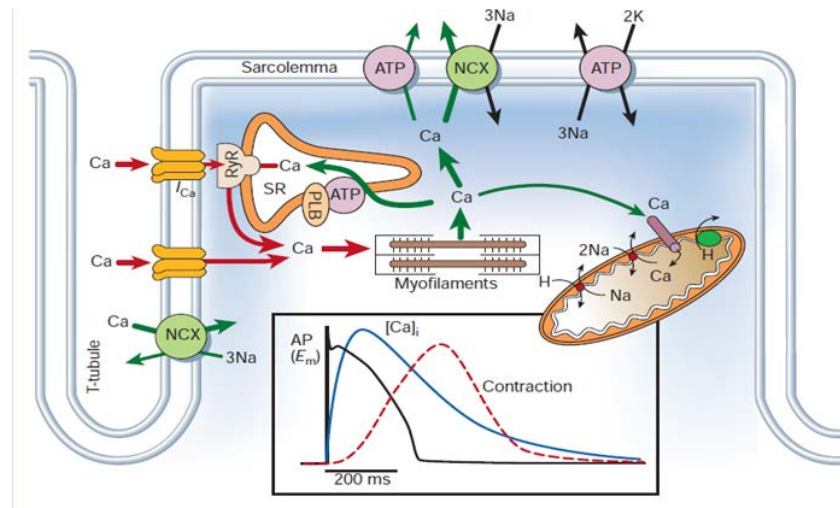
de cálcio do tipo L. A entrada de cálcio pelo sarcolema desencadeia a liberação de cálcio-cálcio induzida do retículo sarcoplasmático (RS), pelos canais de rianodina. A combinação entre o influxo e a liberação de cálcio aumenta a concentração de cálcio intracelular ($[Ca]_i$), possibilitando a ligação do cálcio com a TnC, e desta forma, desencadeia o processo contrátil. O relaxamento do cardiomiócito ocorre com o desprendimento do cálcio da TnC e a posterior redução da $[Ca]_i$. Esta redução é possibilitada por ação de 4 mecanismos, envolvendo: a bomba de cálcio do RS (SERCA ou Ca^{2+} -ATPase do RS), a qual recapta ativamente este íon para seu interior; a Ca^{2+} -ATPase do sarcolema; o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) do sarcolema; e o uniporte de cálcio na mitocôndria (BERS, 2002).

O trocador Na^+/Ca^{2+} do sarcolema é reversível e, desta forma, além de participar do processo de contração, também auxilia no processo de relaxamento. Este trocador possui uma estequiometria de 3 Na^+ para cada 1 Ca^{2+} , e gera a corrente $I_{Na/Ca}$, a qual pode resultar da extrusão ou do influxo de cálcio. Na repolarização ou no repouso celular o trocador trabalha em seu modo normal, ou seja, favorecendo a extrusão de cálcio e o influxo de sódio. Durante a despolarização, o potencial de membrana torna-se positivo e atinge valores maiores que o do potencial de equilíbrio do trocador. Esta alteração elétrica causa inversão do NCX, portanto, o mesmo trabalha retirando sódio e favorecendo o influxo de cálcio no miócito (BERS et al., 2006).

Outra forma de controlar a atividade do NCX, além das mudanças do potencial de membrana, consiste nas alterações na disponibilidade destes íons para o transporte. A elevação do Na^+_i dificulta, rápida e intensamente, a troca Na/Ca no estado de repouso, basicamente porque o aumento do Na^+_i diminui o gradiente difusional do Na^+ através da membrana. Além disso, o trocador possui 2 sítios intracelulares onde se ligam Na^+ e Ca^{2+} . A ligação do Na^+ provoca redução da atividade da troca, enquanto a ligação com o Ca^{2+} a estimula. Desta forma, condições que promovem elevação dos níveis de Na^+_i , tais como os digitálicos, dificultam a extrusão do Ca^{2+} via troca Na/Ca , aumentando a força de contração (BLAUSTEIN et. al., 1991).

Em ratos, a bomba de cálcio do RS é a principal responsável pela queda da concentração de cálcio (10^{-8} M) intracelular após a contração (92%) e o trocador Na^+-Ca^{2+} (7%), bomba de Ca^{2+} sarcolemal e uniporte mitocondrial de cálcio possuem pouca participação na extrusão de cálcio (1%) (NAYLER et al., 1975; MILL et al., 1994; BERS, 2002).

Figura 2. Ilustração de cardiomiócito – Acoplamento excitação-contração. Adaptado de Bers et al., 2002).



Para tornar ainda mais complexo o processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco, surgiu recentemente evidências de que outra enzima envolvida neste processo em músculo liso tem efeito também no coração. É uma proteína multifuncional, a proteína quinase II dependente de Ca/calmodulina (CaMKII). Com a produção de animais nocaute foi comprovada a sua implicação no processo AEC e relaxamento cardíaco. Esta enzima sinaliza e regula diversas proteínas envolvidas não somente no processo AEC e relaxamento mas também na morte celular, transcrição gênica da hipertrofia, inflamação e arritmias. Ela fosforila os canais de Ca tipo L de membrana, o receptor de rianodina do RS, o fosfolamban e também tem sua ação nuclear. O aumento do cálcio intracelular e/ou das EROs podem ativar a CaMKII que resulta em maior produção de EROs levando à oxidação e à fosforilação dos receptores de rianodina e fosfolamban, o que aumenta a carga de cálcio do RS e sua liberação resultando numa corrente despolarizante dependente do NCX, que gera arritmia cardíaca (CURRAN et al., 2014; NEGRONI et al., 2015; MATTIAZZI, et al., 2015)

Uma série de informações pode ser obtida de registros de contrações isométricas, referentes às variações da amplitude da contração e de seus parâmetros temporais. A amplitude da contração traduz a quantidade de força desenvolvida pelo músculo e os parâmetros temporais fornecem informações sobre a cinética de ativação e relaxamento da

contração muscular. O tempo de ativação é o tempo despendido do início da contração até seu pico máximo e traduz a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, processos que aumentam a concentração e a cinética de entrada de cálcio no mioplasma. Já o tempo de relaxamento é medido do pico máximo até o término da contração e reflete a cinética dos processos envolvidos no relaxamento ou diminuição do cálcio mioplasmático (VASSALLO et. al., 2008).

Embora a amplitude do desenvolvimento de força seja um determinante importante da função cardíaca, a cinética em que as contrações têm lugar também é importante. Sabe-se que, em várias patologias cardíacas, a força da contração é relativamente bem preservada, resultando em uma preservada fração de ejeção. No entanto, nestas patologias, a cinética de relaxamento é lenta, resultando em um baixo volume ventricular diastólico final, que, então, mesmo com uma contração vigorosa priva o corpo do débito cardíaco suficiente (GROSSMAN, 1990).

Outra manobra realizada com músculos papilares cardíacos pode ser as potenciações-pós-pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica. Sabe-se que em músculos cardíacos de mamíferos a primeira contração após curto período de pausa é potencializada (LEITE et al., 1991; MILL et al., 1992). As contrações obtidas após pausas têm maior dependência da liberação de cálcio pelos seus estoques intracelulares do que pelo influxo de cálcio pelo sarcolema. Desta forma, as mensurações das PPP visam avaliar a atividade do Retículo Sarcoplasmático (RS), tanto a magnitude de liberação de cálcio ativador quanto, a capacidade de recaptar cálcio (WUSSLING et al., 1980; WUSSLING et al., 1986; LEITE et al., 1991; MILL et al., 1992; MILL et al., 1994).

Durante o potencial de ação cardíaco, o cálcio entra na célula via canais ativados por despolarização, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. O músculo cardíaco possui um potencial de ação longo, isso previne que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização. Portanto, o tétano não pode ser obtido em condições normais, nas quais é impossível a fusão das contrações. Por esse motivo, utiliza-se a cafeína ou rianodina (BASSANI et al., 1992; BASSANI et al., 1994) e aumento da frequência de estimulação elétrica (10 Hz) para se produzir a ativação máxima da maquinaria contrátil em músculos papilares (LEITE et al., 1995).

Em miocárdio de ratos, as contrações tetânicas obtidas após tratamento com cafeína são menores que as contrações em condição estabilizada. Isto sugere que a ativação da

maquinaria contrátil nas contrações tetânicas é dependente da entrada de cálcio pelo sarcolema e a manutenção da contração é dependente da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (LEITE et al., 1995).

Uma das proteínas contráteis que podem ser avaliadas em laboratório é a miosina. A cadeia pesada da miosina (MHC) existe sob duas isoformas, alfa-MHC e beta-MHC, com velocidade de hidrólise do ATP mais rápida e mais lenta, respectivamente (BARANY, 1967). Um coração submetido a uma sobrecarga muda a expressão das isoformas da miosina na tentativa de manter a função cardíaca gastando menos energia (ATP), uma vez que o aporte está comprometido. Se a mudança da isoforma não for suficiente para manutenção da função, o miocárdio entra em insuficiência (GUPTA, 2007). Dessa forma, a quantificação da atividade da ATPase miosínica cardíaca tem sido admitida como um bom indicador da função cardíaca (MOREIRA et al., 2012).

Com isso, considera-se importante a necessidade de estudos acerca de possíveis substâncias para utilização no combate aos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como o estudo da *S. buxifolia*. Uma vez que os animais SHR além da hipertensão (muito semelhante a hipertensão essencial humana) (FAZAN et al., 2001), tem um prejuízo na contratilidade e como a coronilha é utilizada popularmente no chimarrão, para hipertensão e também como cardiotônico, decidimos investigar cientificamente se realmente estes efeitos se confirmam em animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS *BUXIFOLIA*

As cascas do tronco de *S. buxifolia* foram coletadas nas proximidades do município de Uruguaiana, RS, coordenadas geográficas 29°46'56''Sul e 057°02'43''Oeste, nos meses de abril e maio de 2014. Uma exsicata do vegetal foi elaborada e enviada para o Campus de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa para identificação e depósito no herbário. As cascas foram secas em estufa a temperatura controlada de 40° C por 72 horas e posteriormente, trituradas em moinho de facas sendo o pó resultante acondicionado em frasco âmbar ao abrigo da luz.

4.1.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO

O pó preparado da planta foi aquecido em água lentamente até 80° C. Após foi realizada filtragem do produto em papel filtro e levado à estufa a 40° C para secagem e obtenção do extrato bruto aquoso seco. Este foi acondicionado em frasco protegido da luz para utilização nos experimentos.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

4.2.1 RATOS WISTAR E SHR

Foram utilizados ratos machos: Wistar Kyoto com 2 meses para o tratamento prolongado, pesando entre 200-250 g e com 3 meses para o tratamento agudo, pesando entre 280-300 g. Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) com 2 meses para o tratamento prolongado, pesando entre 180-200 g e com 3 meses para o tratamento agudo, pesando entre

240-280 g, provenientes do Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, nasala4 de experimentação do Biotério da Universidade Federal do Pampa, *Campus* Uruguaiana (RS).

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estavam em concordância com os Princípios Internacionais para a Pesquisa envolvendo Animais (Genebra), e com a legislação brasileira disposta na Lei nº 11.794/2008 (Procedimentos para uso científico de animais) e no Decreto 24.645/34 (Dos Direitos dos Animais). Este projeto foi registrado no SIPPEE e aprovando pela CEUA da UNIPAMPA sob protocolo nº 09/2014.

4.2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.2.2.1 Para o tratamento agudo

Foram utilizados 16 animais WKY de 3 meses de idade divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle Wistar Kyoto (CK); e
- Grupo Extrato Wistar Kyoto (SK).

E 16 animais SHR de 3 meses de idade divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle SHR (CS); e
- Grupo Extrato SHR (SS).

Receberam comida e água livremente durante o tempo em que ficaram alojados no biotério.

4.2.2.2 Para o tratamento prolongado (30 dias)

Foram utilizados 16 animais WKY de 2 meses de idade divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle Wistar Kyoto (CK): recebeu comida e água livremente. Diariamente recebeu 1 mL de água por gavagem; e

- Grupo Extrato Wistar Kyoto (SK): recebeu comida e água livremente. Diariamente recebeu extrato em 1 mL de água (100mg/kg) por gavagem.

E 16 animais SHR de 2 meses de idade divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle SHR (CS): recebeu comida e água livremente. Diariamente recebeu 1 mL de água por gavagem; e
- Grupo Extrato SHR (SS): recebeu comida e água livremente. Diariamente recebeu extrato em 1 mL água (100mg/kg) por gavagem.

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para as medidas de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais do tratamento agudo foram previamente anestesiados com uretana (1,2g/kg *i.p.*) e um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com soro fisiológico heparinizado (100 UI/mL; Cristália®) foi inserido na artéria carótida direita para as medidas e na veia jugular para a administração do extrato. O cateter arterial foi ligado a um transdutor de pressão (TSD 104A) equipado com um conversor analógico (MP150 Biopac Systems, Inc., CA). Após estabilização da PA por 30 minutos foi administrado 500 µL de salina nos animais controle e 500 µL do extrato (5mg/kg) em salina. A aquisição dos dados de PAS, PAD e FC foram nos tempos 0 (administração do extrato), 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos após. Para o tratamento por 30 dias as medidas da PAS, PAD e FC foram realizadas após estabilização de 30 minutos.

4.3.2 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

O tórax dos ratos foi aberto para a extração do coração e os músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE) foram dissecados e colocados em uma solução nutritora (20 mL) de Krebs-Henseleit, pH 7.4, aerada com CO₂ 5% e O₂ 95%, a 29° C. Os músculos foram fixados por argolas, e então presos em uma extremidade fixa e outra ligada a um transdutor de força. A estimulação elétrica dos músculos papilares se dá através de um par de eletrodos de platina

posicionados ao longo de toda a extensão do músculo (pulsos retangulares com duração de 12 ms e voltagem um e meio vezes o limiar). A frequência de estimulação foi de 0,5 Hz. Os músculos foram estirados até Lmax (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais:

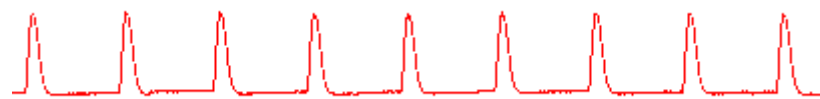
Para o tratamento agudo, após a estabilização, foi administrado no banho de órgãos (capacidade para 20 mL de solução nutritora), 50 mg do extrato em 1 mL de água. A cada troca de solução foi renovada a quantidade de extrato.

Para o tratamento por 30 dias seguiu-se os protocolos normais com as respectivas soluções sem a administração do extrato.

4.3.2.1 Força Isométrica

A força desenvolvida (Figura 3) foi normalizada pelo peso do músculo (g/mg de músculo) e medida por meio de transdutor de força isométrica (TSD125- Biopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Biopac Systems, Inc; CA) e registrada por um sistema de aquisição de dados (MP100 Biopac Systems, Inc; CA) conectado a um microcomputador. Para a aquisição dos dados foi utilizado registro de amostragem de 500 amostras / segundo.

Figura 3.Registro típico de contração estabilizada de músculo papilar de rato.

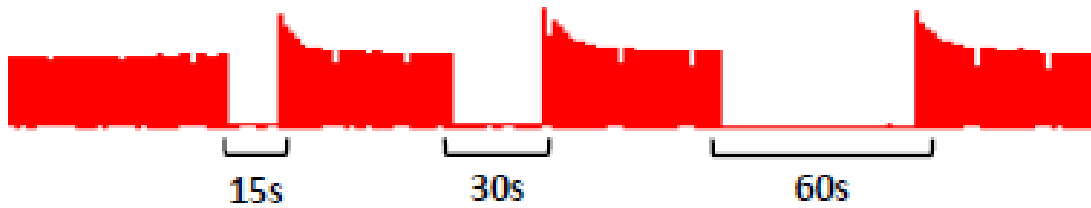


Contração estabilizada 30 min
0,5 Hz

4.3.2.2 Potenciações relativas após pausas (PPP)

A potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos (Figura 4) foi obtida com o objetivo de avaliar, de forma indireta a contribuição do retículo sarcoplasmático (RS) na contração. Foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração anterior à pausa.

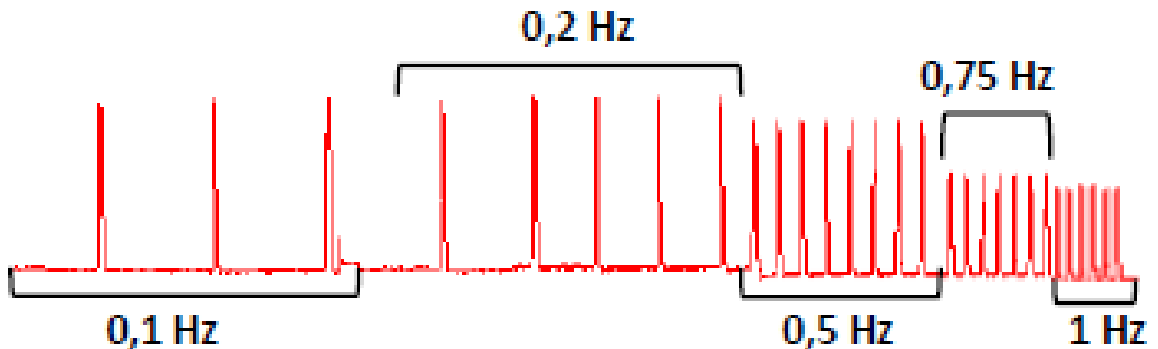
Figura 4. Registro típico de potenciações pós-pausas de músculo papilar de rato.



4.3.2.3 Frequência de estimulação elétrica

Os músculos papilares foram submetidos às crescentes frequências de estimulação elétrica: 0,1, 0,2, 0,5, 0,75 e 1 Hz (Figura 5).

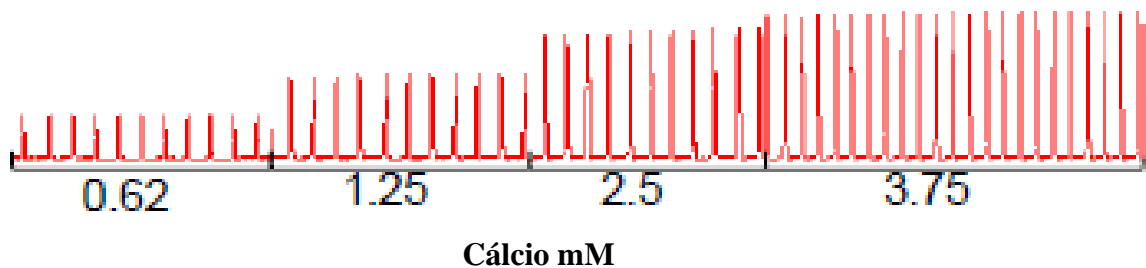
Figura 5. Registro típico de diferentes estimulações elétricas em músculo papilar de rato.



4.3.2.4 Resposta inotrópica ao Cálcio

Curva dose-resposta inotrópica ao cálcio nas concentrações crescentes de CaCl_2 (0,62; 1,25; 2,50 e 3,75 mM) – Resposta ao cálcio (g/mg) (Figura 6).

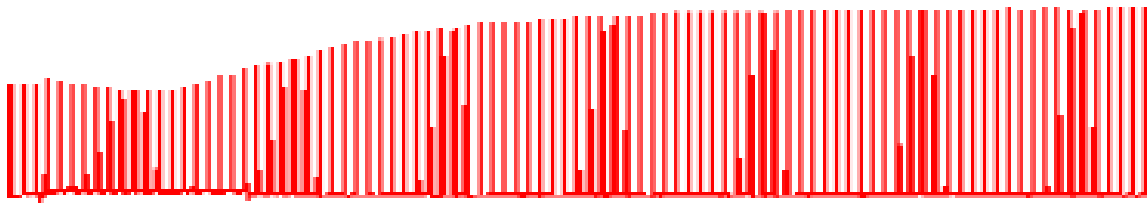
Figura 6. Registro típico de contrações de músculo papilar de rato submetido à crescente concentração de cálcio.



4.3.2.5 Resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol

Resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5}M) (Figura 7)– avalia a interferência do tratamento na resposta β -adrenérgica no músculo cardíaco. Foi normalizada como a razão entre a amplitude máxima na força de contração na presença do isoproterenol e a amplitude da contração estabilizada anterior ao isoproterenol (LEITE et al., 1995).

Figura 7. Registro típico de resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5}M) em músculo papilar de rato.



4.3.2.6 Contrações tetânicas

Avaliação dos efeitos do extrato nas contrações tetânicas (Figura 8) - foi obtida após 30 minutos de tratamento com 5 mM de cafeína, em uma frequência de 10 Hz, e duração de 15 segundos, como previamente descrita (VASSALLO et. al., 2008; MOREIRA et. al., 2012).

Figura 8. Registro típico de contrações tetânicas de músculo papilar de rato.



4.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

O efeito do extrato na atividade da ECA será determinado como previamente descrito por Friedland; Silverstein (1976) e Oliveira et al. (2000). O sangue dos animais foi coletado via artéria aorta abdominal, após a realização do protocolo da hemodinâmica. Amostras de soro foram incubadas em 40 μL de tampão (borato de sódio 0,4 M, NaCl 0,9M, pH 8,3), 5 μL do substrato (5mM Hip-His-Leu) Hipuril-histidina-leucina, por 15 min a 37°C. A reação foi

interrompida pela adição de 190 μ L de NaOH 0,34N. O produto His-Leu foi medido fluorimetricamente a 365 nm de excitação e 495 nm de emissão após a adição de 17 μ L de o-phthaldialdehyde (2%) em metanol. Para corrigir a fluorescência intrínseca do soro, brancos foram incluídos pela adição de Hipo-His-Leu e o-phthaldialdehyde. A curva de calibração com o produto (His-leu) foi incluída em cada experimento.

4.3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MIOSÍNICA

4.3.4.1 Preparação da fração miosínica

A preparação da fração miosínica foi realizada conforme Bremel; Weber (1975) e descrito por Moreira et al. (2003). Parte do VE dos ratos após o tratamento foi homogeneizado em solução tampão fosfato 150 mM contendo 0,6M de KCl, pH 6,5, sendo assim a miosina solubilizada, precipitada com adição lenta de água, centrifugada a 30.000 x g por 30 min. O precipitado foi solubilizado em tampão fosfato com KCl e novamente centrifugado a 30.000 xg por 30 min. Estes procedimentos de centrifugação foram realizados mais duas vezes. O último precipitado foi ressuspensão em 50 mM HEPES, pH 7,0; 600 mM KCl e 50 % (v/v) glicerol, alíquotado e estocado a -80°C . Para a determinação da atividade da enzima, a fração estocada foi diluída em água (1:12), centrifugado por 15 min a 30.000 x g, sendo o precipitado ressuspensão em 50 mM HEPES, pH 7,0, 600 mM KCl e esta fração miosínica utilizada para determinação da atividade enzimática.

4.3.4.2 Medida da ATPase miosínica

Para a avaliação bioquímica da capacidade do coração de gerar força contrátil, a atividade ATPásica da miosina foi determinada usando um meio tampão (pH 7,0) contendo 50 mM HEPES; 5mM de CaCl_2 ; 0,6 M KCl; 1 mM de ATP em um volume final de 200 μ L (MOREIRA et al., 2003). O tempo de incubação e a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação foram escolhidos de modo a assegurar a linearidade da formação do produto a 30°C . A reação foi iniciada pela adição da fração miosínica. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 5%. Alíquotas de 100

μL foram retiradas, diluídas em água (volume final $400 \mu\text{L}$) para a determinação do fosfato liberado. O produto final medido na reação foi o fosfato inorgânico (P_i), pelo método de Chan et al. (1986). As amostras foram ensaiadas em triplicatas, sendo a hidrólise não enzimática corrigida através de controles feitos nas mesmas condições da amostra, exceto que a fração enzimática foi adicionada após a interrupção da reação pelo TCA.

A atividade específica foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto e por mg de proteína (nmol/ P_i /min/mg). A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976) usando albumina bovina (1mg/mL) como padrão.

4.3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm \text{EPM}$). Os valores foram analisados usando teste *t*-Student não-pareado e ANOVA de duas vias, com *post-hoc* de *Bonferroni*. Foram consideradas como estatisticamente significativas, as diferenças de médias com valor de $p < 0.05$.

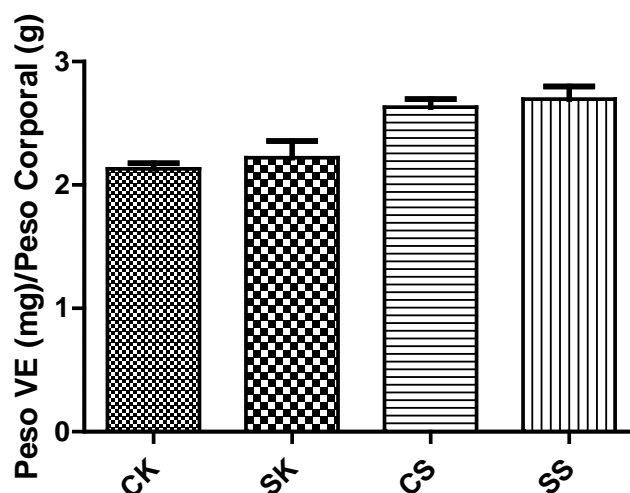
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRATAMENTO AGUDO E PROLONGADO (30 DIAS)

5.1.1 ÍNDICE DE HIPERTROFIA

A hipertrofia cardíaca constitui-se num mecanismo adaptativo do coração, em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. No coração infartado, por exemplo, ocorre hipertrofia em todas as regiões não afetadas pela isquemia (MILL et al., 1990). A relação peso VE/PC é considerada um índice de hipertrofia ventricular. A Figura 9 mostra a relação VE/PC dos ratos submetidos ao tratamento com *S. buxifolia* e analisados 30 dias após. Podemos observar que a relação VE/PC não apresentou modificações entre os animais dos grupos tratados e seus respectivos controles. Trabalhos na literatura mostram que o efeito de óleos essenciais vegetais, tais como o das folhas de *A. zerumbet* podem reverter a hipertrofia cardíaca (BARCELOS et al., 2010), assim como o extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (açai) (ZAPATA-SUDO et al., 2014). Considerando que é comum observar que animais SHR desenvolvem hipertrofia cardíaca (aumento de 30%) entre os 18 e 24 meses de idade (PINTO et al., 1998), podemos sugerir que os ratos tratados com *S. buxifolia* não tenham atingido a idade necessária para o desenvolvimento dessa condição, talvez, por isso, os dados não tenham revelado a melhora do quadro.

Figura 9. Índice de hipertrofia



5.1.2 ESTUDO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

5.1.2.1 Pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca

Os resultados do tratamento realizado demonstram que o extrato aquoso da *S. buxifolia* apresenta efeito antihipertensivo nos tratamentos agudo (Figura 10A e B) e prolongado (30 dias) nos animais SHR (Figura 11A e B), não influenciando na pressão dos ratos WKY. Também observamos que o mesmo ocorreu com a frequência cardíaca (Figuras 10C e 11C). Zainudin et al., (2015), estudando o extrato aquoso das folhas de *Piper sarmentosum*, também obtiveram melhora no quadro hipertensivo de animais SHR. Já Da Silva et al. (2015) incubando anéis isolados de aorta de ratos normotensos e SHR comprovaram o efeito vasorrelaxante de fração butanólica das cascas de *S. buxifolia*. Corroborando com os nossos achados Bopda et al. (2014) utilizaram extrato aquoso de *K. pinnata* em ratos sensíveis ao sal e não observaram alteração na FC desses animais.

A presença de compostos fenólicos na fração acetato de etila das folhas da *S. buxifolia*, tais como, os flavonoides quercetina, quercitrina (composto majoritário), isoquercitrina e rutina (BOLIGON et al., 2010) podem ser sugeridos como responsáveis pela possível ação protetora do sistema cardiovascular pois essas substâncias são conhecidas por terem comprovada ação antioxidante. Por isso, dietas ricas em frutas, vegetais e vinho tinto são indicadas para os humanos com ações benéficas por conter grandes quantidades destes compostos (DUARTE et al., 2001).

O isolamento das substâncias lupeol, β -sitosterol e estigmasterol do extrato etanólico das cascas do tronco da *S. buxifolia* (BOLIGON et al., 2009a) também fornece evidência de que a planta tem potencial hipoglicemiante e antihipertensivo pois as mesmas substâncias são encontradas na espécie *P. brachystachyum*, planta utilizada na medicina folclórica do México para estes fins (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2012).

Os alcaloides são substâncias conhecidas por agir sobre o sistema cardiovascular trazendo benefícios como, por exemplo, a diminuição da pressão arterial. Estas substâncias encontradas em inúmeros vegetais e frutas da dieta humana favorecem a diminuição do risco de desenvolvimento de DCV (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2012). Considerando que das cascas e folhas da *S. Buxifolia* foram extraídos alcaloides ciclopeptídicos (TSCHESCHE, HILLEBRAND, 1977) justifica-se a utilização do extrato como fonte de substâncias

protetoras dos vasos sanguíneos e coração, uma vez que encontramos resultados positivos quanto ao efeito antihipertensivo (Figuras 10 e 11).

Figura 10. Pressão arterial sistólica (PAS) (A), diastólica (PAD) (B) e frequência cardíaca (FC) (C) – Tratamento agudo.

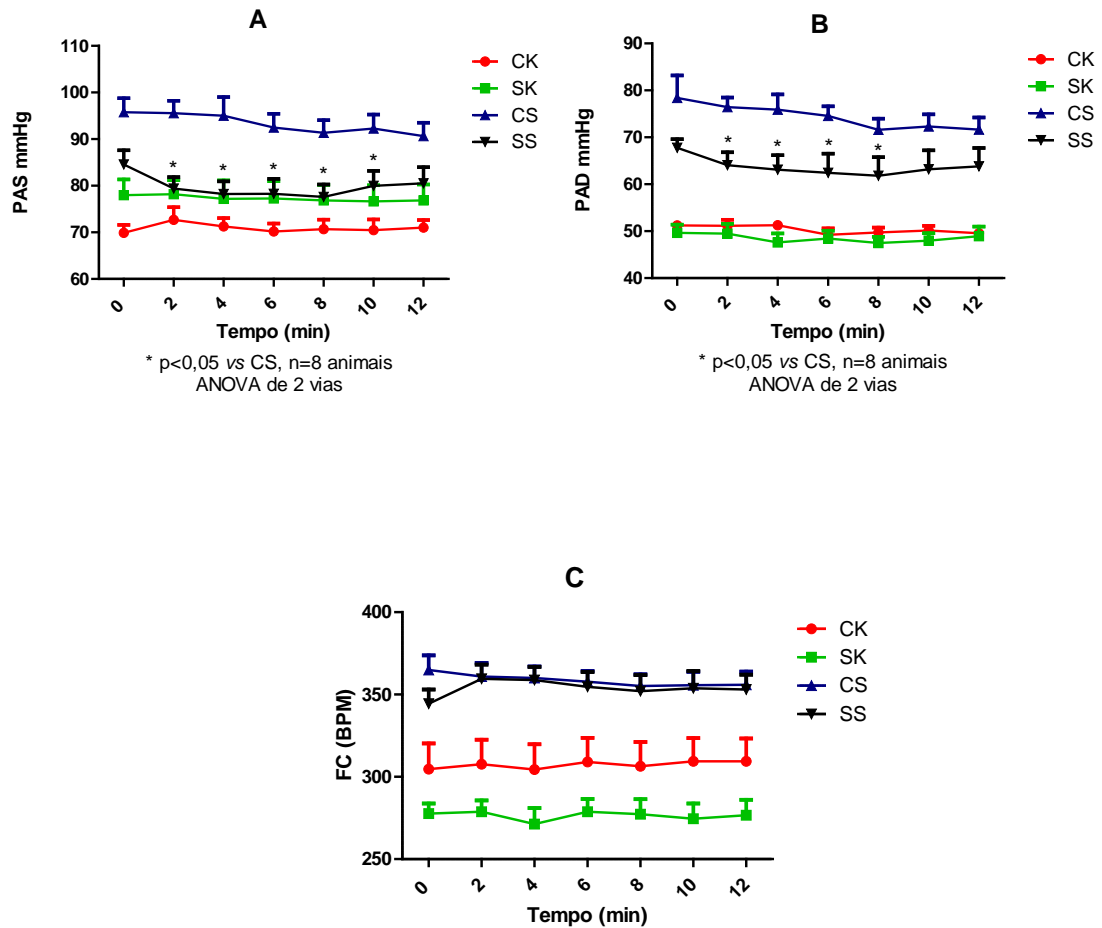
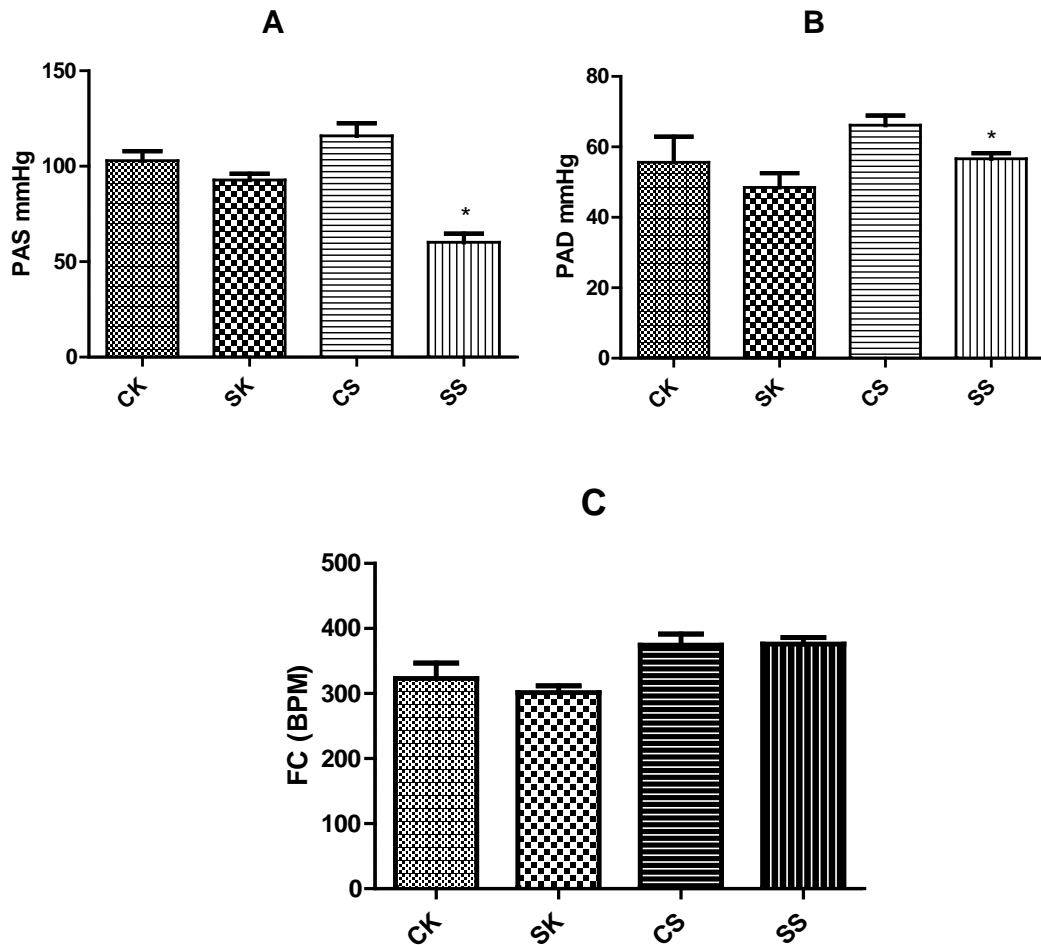


Figura 11. Pressão arterial sistólica (PAS) (A), diastólica (PAD) (B) e frequência cardíaca (FC) (C) – Tratamento prolongado.



5.1.3 ESTUDO DA CONTRAÇÃO MIOCÁRDICA

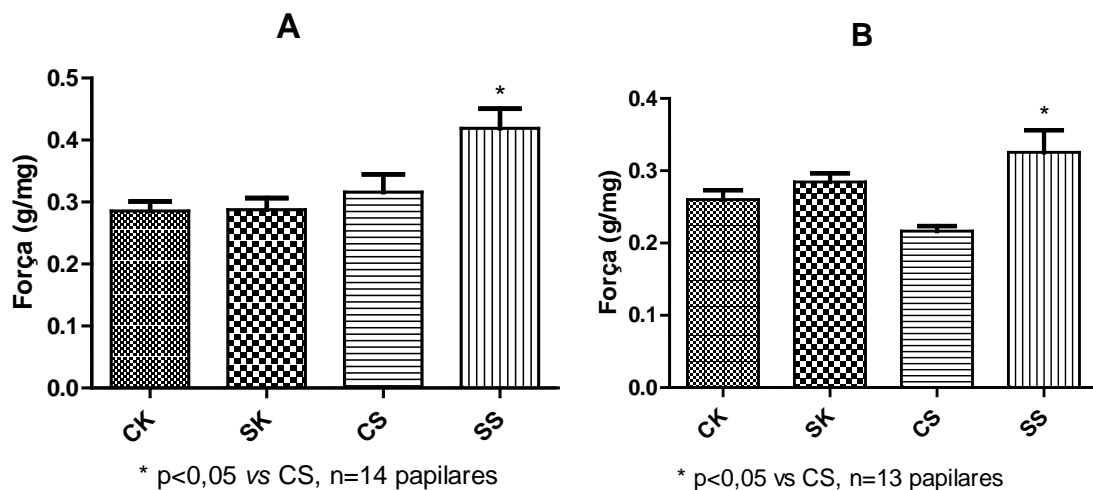
5.1.3.1 Análise da Força Isométrica

A força isométrica foi utilizada para avaliação da funcionalidade do músculo em termos de capacidade contrátil. A força dos músculos papilares de animais WKY e SHR aos 3 meses de idade é semelhante (MOREIRA et al., 2012), os SHR ainda não desenvolveram insuficiência nesta idade. A amplitude máxima da força desenvolvida pelos músculos papilares do VE de animais controles e tratados está mostrada na Figura 12. Nos animais WKY, podemos observar que o extrato da *S. buxifolia* não afetou a força isométrica gerada pelos músculos papilares. Porém, os animais SHR tratados com o extrato aumentaram significativamente esta força, demonstrando, assim, um efeito inotrópico positivo, ou seja,

uma melhora na capacidade de geração de força. Mesmo ainda não estando insuficientes, estes animais têm uma genética modificada para tal. Este extrato, pode ser benéfico para indivíduos hipertensos e com prejuízo na capacidade de geração de força cardíaca, ou seja, para indivíduos com insuficiência cardíaca. Estes dados confirmam o uso empírico da casca desta planta como tendo ação cardiotônica. Dima et al., (2003), pesquisando os efeitos de *Bidens pilosa* L. sobre o sistema cardiovascular de ratos anestesiados, verificou um aumento da força contrátil dos músculos papilares a partir da dose de 30 mg/kg. O tratamento com o extrato aquoso de *Campomanesia xantocarpa* também apresenta efeito inotrópico positivo em ratos com Síndrome Metabólica induzida por frutose (SANT'ANNA, 2012). Entretanto, o eucaliptol e o eugenol mostraram efeito inotrópico negativo em músculo papilar de ratos Wistar (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005).

Os heterosídeos encontrados na *S. buxifolia* (WASICKY et al., 1964) e heterosídeos cardiotônicos (BOLIGON et al., 2009b) também podem contribuir para os efeitos cardiotônicos verificados no nosso estudo. Pesquisas realizadas com compostos presentes em plantas e animais utilizados na medicina tradicional chinesa tais como, bufalina, ginsenosídeo, ácido ursólico, sarsasapogenina, astragalosídeo, entre outros, são capazes de inibir reversivelmente a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, enzima fundamental presente na membrana de cardiomiócitos. A inibição desta enzima leva à elevação intracelular da concentração de sódio, que por sua vez, ativa o NCX resultando em elevação do Ca^{2+} intracelular, culminando com aumento da contração cardíaca (CHEN et al., 2010).

Figura 12. Força Isométrica no tratamento agudo (A) e prolongado (B)



5.1.3.2 Análise dos parâmetros temporais: tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR).

As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados do tempo de ativação e tempo de relaxamento dos músculos papilares, respectivamente. O tratamento agudo com o extrato colocado no banho de órgãos foi capaz de aumentar o TA sem alterar o TR nos músculos. Entretanto, a exposição prolongada ao extrato, nas condições utilizadas, não foi capaz de influenciar os parâmetros temporais da contração isométrica. O TA mede a cinética dos processos que elevam a disponibilidade de cálcio ou interferem na sensibilidade dos miofilamentos a este íon. Já o TR mede os processos que retiram o cálcio intracelular. Este processo depende muito da capacidade do retículo sarcoplasmático em captar cálcio, principalmente nos ratos, no qual esta organela é responsável por sequestrar, aproximadamente, 90% do cálcio citoplasmático durante o relaxamento (BERS, 2002). Os tratamentos de músculos papilares com eucaliptol e eugenol foram capazes de diminuir tanto o TA quanto o TR (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005). Ao contrário, o tratamento com extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* foi capaz de aumentar estes dois parâmetros cinéticos da contração (SANT'ANNA, 2012)

Figura 13. Tempo de ativação (A) e relaxamento (B) das contrações – Tratamento agudo.

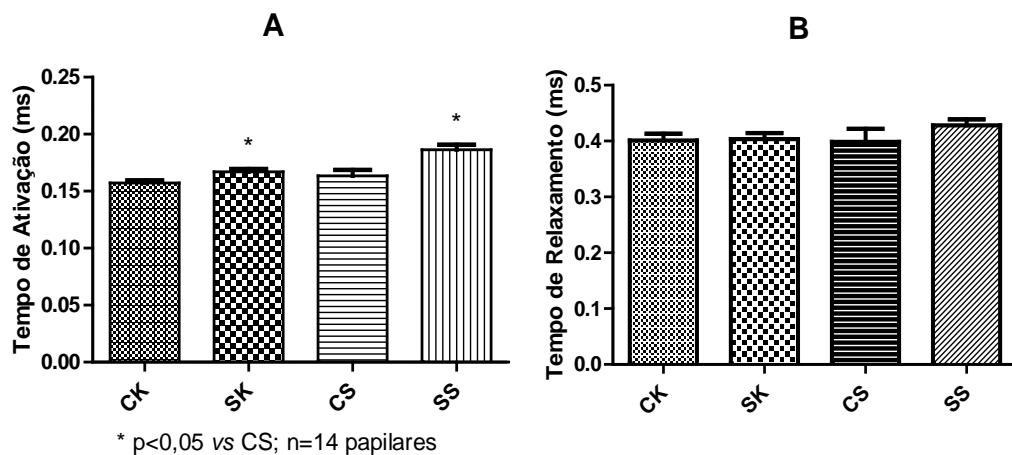
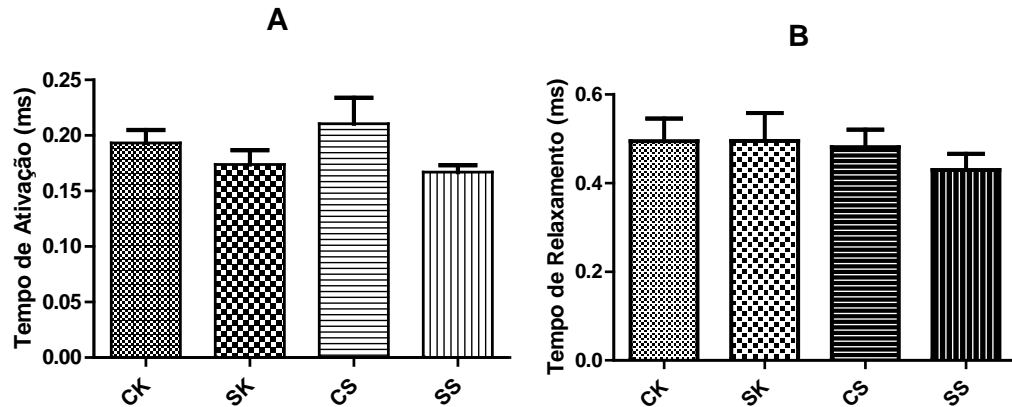


Figura 14. Tempo de ativação (A) e relaxamento (B) das contrações – Tratamento prolongado.



5.1.3.3 Análise das potenciações pós-pausa

A potenciação pós-pausa (PPP) foi utilizada para avaliar um possível efeito do tratamento com *S. buxifolia* sobre a atividade do RS. O tratamento com este extrato não modificou o funcionamento do RS, visto que os valores de pausas do estímulo de 15, 30 e 60 segundos, nos músculos provenientes de ratos tratados são semelhantes aos dos músculos de ratos dos seus respectivos controles, como demonstrado na Figura 15 e 16. As principais proteínas envolvidas no manuseio do cálcio no RS são a SERCA2 e fosfolamban, responsáveis pela receptação de cálcio e o receptor de rianodina, envolvido na liberação de cálcio do RS. Possivelmente as ações destas proteínas não estejam sendo modificadas pelo tratamento com o extrato de *S. buxifolia*. Corroborando com esses resultados, como observado anteriormente, o TR também não foi influenciado por este tratamento. Extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* também não afeta as PPP em ratos com Síndrome Metabólica induzida por frutose (SANT'ANNA, 2012). Ao contrário, as PPP dos músculos papilares são potencializadas na presença de eugenol com tratamento agudo (DAMIANI et al., 2004).

Figura 15. Potenciações pós-pausa dos músculos papilares (PPP) dos animais WKY (A) e SHR (B) – Tratamento agudo.

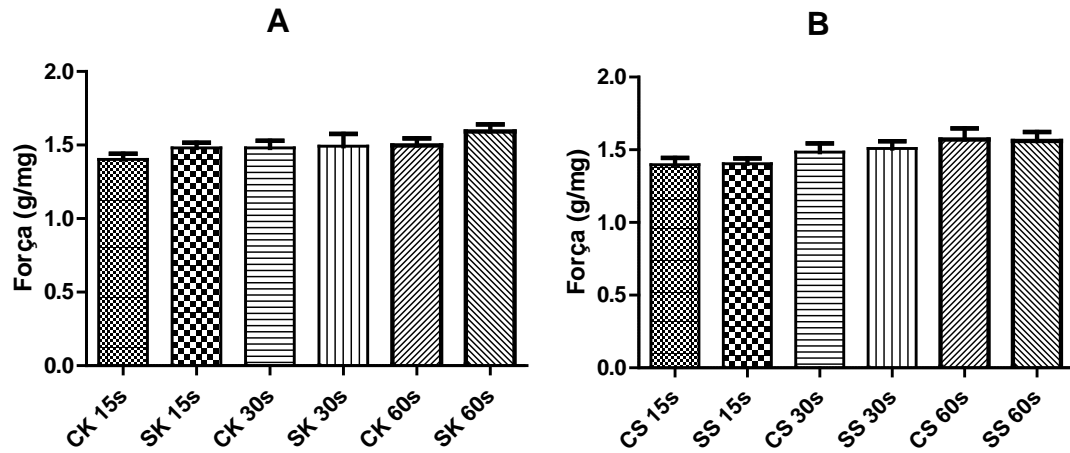
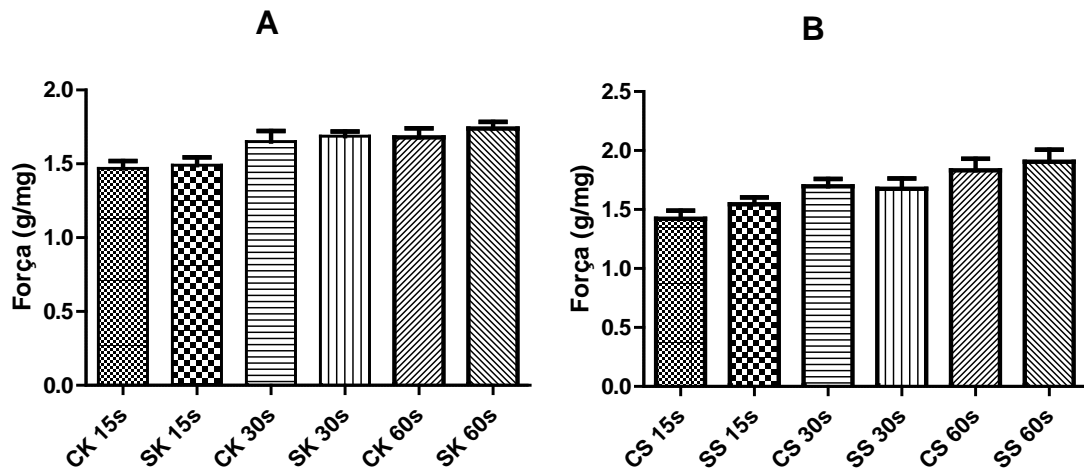


Figura 16. Potenciações pós-pausa dos músculos papilares (PPP) dos animais WKY (A) e SHR (B) – Tratamento prolongado.

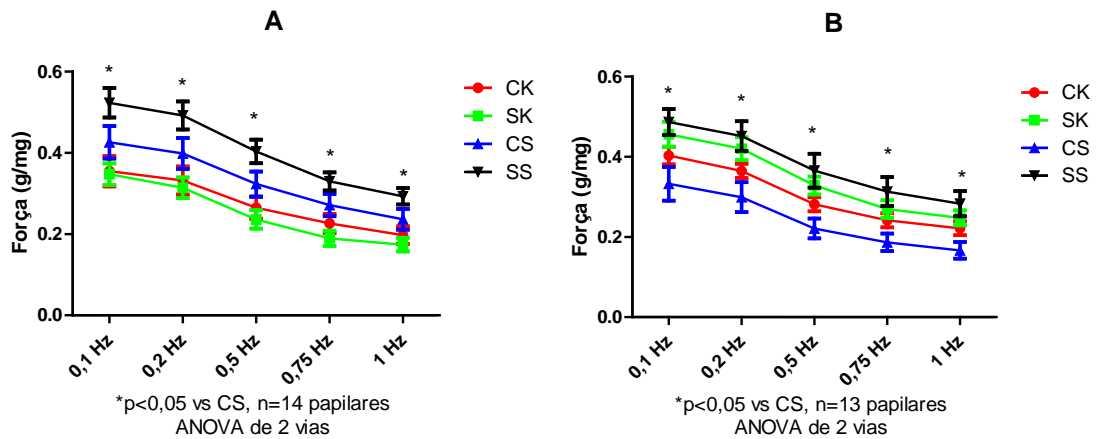


5.1.3.4 Análise das respostas dos músculos papilares frente às mudanças de frequência de estímulo

A bomba de cálcio do RS (SERCA2), em ratos, é a principal responsável pela queda da concentração de cálcio (10^{-8} M) intracelular após a contração (92%) e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (7%), bomba de Ca^{2+} sarcolemal e uniporte mitocondrial de cálcio possuem pouca participação na extrusão de cálcio (1%) (NAYLER; DUNNET, 1975; MILL et al., 1994; BERS, 2002). Então, a observação da força desenvolvida em diferentes frequências de

estimulação elétrica em músculos papilares visa avaliar se os mecanismos de extrusão de cálcio estão preservados em músculos papilares de VE de ratos dos grupos tratados. Como nenhuma alteração no desenvolvimento de força foi encontrada nas diferentes frequências de estimulação elétrica nos animais WKY (Figuras 17A e B), podemos sugerir que os miócitos desses ratos tratados por 30 dias ou de forma aguda com *S. buxifolia* possuem os mecanismos de extrusão de cálcio inalterados. Porém, a força desenvolvida foi potencializada em ratos SHR sugerindo que em alguns dos mecanismos do trânsito de cálcio o extrato esteja agindo e, provavelmente, não seja via SERCA2 uma vez que o PPP não foi modificado (Figuras 15B e 16B)

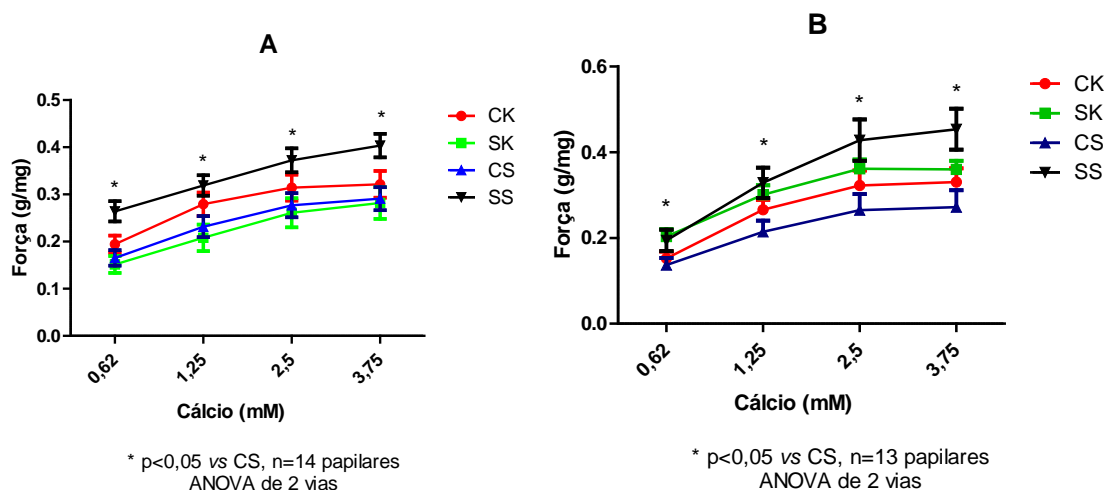
Figura 17. Força desenvolvida pelos músculos papilares de acordo com aumento de frequência de estimulação de 0,1 a 1 Hz, dos animais WKY e SHR – Tratamento agudo (A) e prolongado (B).



5.1.3.5 Efeito inotrópico ao Cálcio

Sabe-se o que o aumento do Ca^{2+} extracelular resulta no aumento da entrada de cálcio via canais de Ca^{2+} do tipo L de membrana, estimulando a liberação de Ca^{2+} dos estoques de cálcio do RS. Isto, por sua vez, aumenta o Ca^{2+} intracelular livre culminando no encurtamento do miofilamento e a contração celular (BERS; PEREZ-REYES, 1999). À medida que aumenta-se a concentração de cálcio extracelular há um aumento na capacidade de geração de força, porém nos animais SHR (Figura 18) tratados com o extrato, podemos observar uma potencialização deste efeito, sugerindo que o extrato possa estar ativando os canais de cálcio de membrana, com isso levando a um efeito inotrópico positivo maior, a partir da concentração de 0,62mM de cálcio. Extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* também apresenta efeito inotrópico ao cálcio potencializado em ratos com Síndrome Metabólica induzida por frutose (SANT'ANNA, 2012). Ao contrário, o tratamento com eugenol levou a um efeito inotrópico negativo ao cálcio, sugerindo uma inibição dos canais de cálcio de membrana, o que foi confirmado com os experimentos de *voltagem-clamp*, onde houve uma diminuição da corrente de cálcio pelos canais de Ca tipo L (DAMIANI et al., 2004).

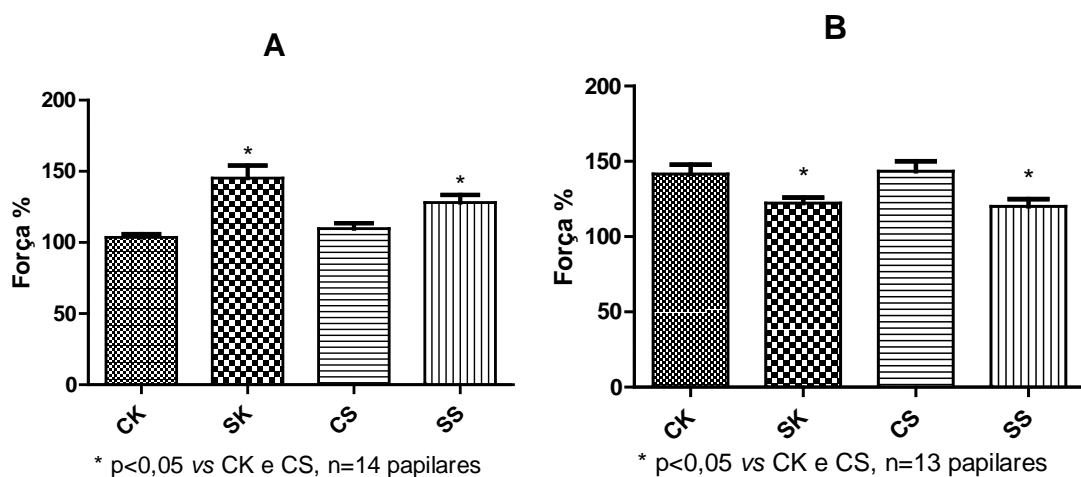
Figura 18. Força desenvolvida pelos músculos papilares nas concentrações crescentes de Ca 0,62 a 3,75 mM, tratamento agudo (A) e prolongado (B).



5.1.3.6 Avaliação dos receptores β -adrenérgicos dos músculos papilares

A estimulação β -adrenérgica com isoproterenol aumenta o influxo de Ca^{2+} transmembrana e produz uma rápida recaptação do cálcio pelo RS, que resulta em aumento de força e atinge o pico da contração mais rapidamente, isto é, tempo de ativação menor. Para este protocolo utiliza-se 0,62 mM de cálcio para não haver um *overload* de cálcio, o que pode levar a uma diminuição de força (SOARES et al., 2005). A ativação beta-adrenérgica do músculo cardíaco culmina coma fosforilação dos canais de cálcio de membrana e dos canais de rianodina, levando a um aumento de cálcio intracelular (NEGRONI et al., 2015). De forma aguda, a administração do extrato no músculo levou a um efeito inotrópico positivo (Figura 19A), entretanto, de forma prolongada (Figura 19B) os efeitos do isoproterenol sobre os músculos tratados com *S. buxifolia* mostraram um decréscimo significativo da força de contração muscular. Sugerimos que pode ter ocorrido uma *downregulation* dos receptores β -adrenérgicos, uma vez que os canais de cálcio de membrana tipo L podem estar ativados. A ativação destes dois mecanismos poderia levar este músculo a um *overload* de cálcio (TARDIFF et al. 2015). Portanto, esta resposta inotrópica negativa ao isoproterenol no tratamento prolongado, possa ser um mecanismo protetor da contração. O efeito inotrópico negativo do eugenol foi revertido por isoproterenol (DAMIANI et al., 2004).

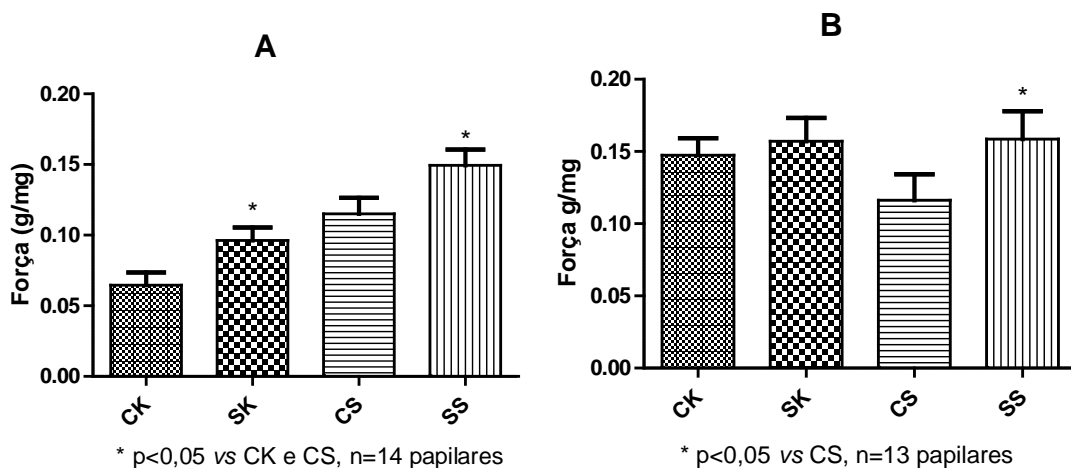
Figura 19. Força desenvolvida pelos músculos papilares na presença de isoproterenol no tratamento agudo (A) e prolongado (B).



5.1.3.7 Avaliação das contrações tetânicas dos músculos papilares

O potencial de ação do músculo cardíaco é longo, isso previne que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização. Por isso, o tétano não pode ser obtido em condições normais, nas quais é impossível a fusão das contrações. Por esse motivo, utiliza-se a cafeína, que depleta os estoques de cálcio do RS por ligar-se aos receptores de rianodina (BASSANI et al., 1992; BASSANI et al., 1994) mantendo-os abertos. Além do uso da cafeína, aumenta-se a frequência de estimulação elétrica (10 Hz) para se produzir a ativação máxima da maquinaria contrátil em músculos papilares (LEITE et. al., 1995). Em miocárdio de ratos, estas contrações tetânicas são menores que as contrações em condição estabilizada. As contrações nestas condições são dependentes da entrada de cálcio pelo sarcolema, por isso são menores (LEITE et. al., 1995) e a ativação da maquinaria contrátil nas contrações tetânicas e manutenção desta contração são dependentes da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, conseqüentemente, mantendo a interação actina-miosina sustentada. Na Figura 20A observamos que o tratamento agudo com o extrato foi capaz de aumentar a força das contrações tetânicas em ambos os grupos. Entretanto, no tratamento por 30 dias, apenas os SHR apresentaram aumento de força destas contrações (Figura 20B) Isso sugere que o extrato possa influenciar a entrada de cálcio pelo sarcolema e/ou a sensibilidade dos miofilamentos. As contrações tetânicas também foram potencializadas com o tratamento do extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* (SANT'ANNA, 2012). Ao contrário, foram diminuídas com o tratamento com eucaliptol e eugenol (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005)

Figura 20. Força desenvolvida pelos músculos papilares no pico das contrações tetânicas – Tratamento agudo (A) e prolongado (B).

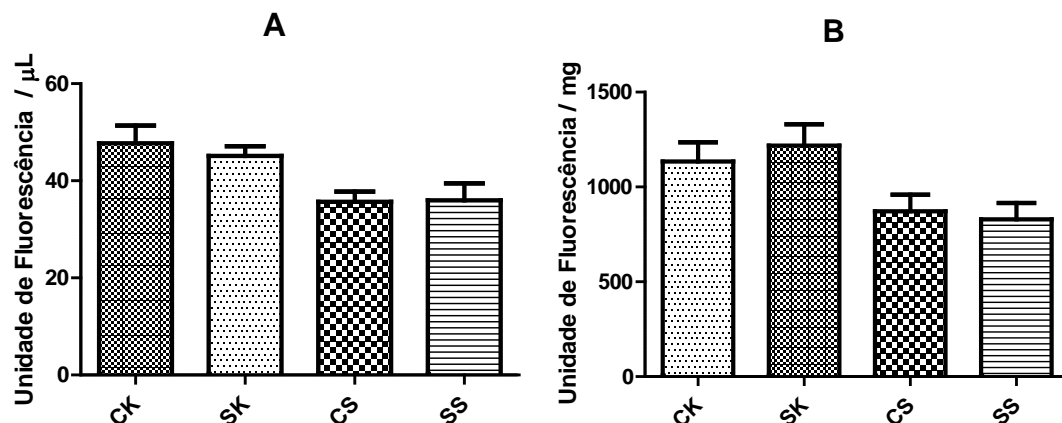


5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.2.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

Analisando nossos resultados quanto à atividade da ECA sérica e tecidual (Figura 21) podemos observar que não houve alteração na atividade desta enzima chave do SRAA nos animais submetidos ao tratamento por 30 dias com a *S. buxifolia*. Entretanto, alguns estudos apontam o efeito inibitório *in vitro* de extratos contendo flavonoides frente à ECA, tais como o extrato de *Cynara scolymus* que inibiu 31% da atividade desta enzima na concentração de 100µg/mL (VILLIGER et al., 2015). Ainda, Sikora et al. (2014) estudando os efeitos de *Aronia melanocarpa* (rica em polifenóis) em humanos com síndrome metabólica verificou o efeito inibitório (25 e 30%) deste extrato sobre a ECA em 1 e 2 meses de administração por via oral, respectivamente. Extrato de *Cecropia pachystachya*, rica em flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina, isoquercitrina e procianidinas também é eficiente em diminuir a atividade da ECA renal em ratos nefrectomizados (MAQUIAVELI, et al., 2014). Diante disso, como não ocorreu alteração da atividade da ECA sérica com o tratamento do extrato podemos sugerir que a diminuição da AII (potente vasoconstritor) não esteja envolvida na ação anti-hipertensiva da *S. buxifolia*. Em protocolos de reatividade vascular com bloqueio da síntese de NO por L-NAME, Da Silva et al. (2005) mostrou que o extrato butanólico da *S. buxifolia* produziu efeito vasorrelaxante por este mecanismo.

Figura 21. Atividade da ECA sérica (A) e tecidual (B) medida nos animais dos grupos CK, SK, CS e SS no tratamento prolongado.

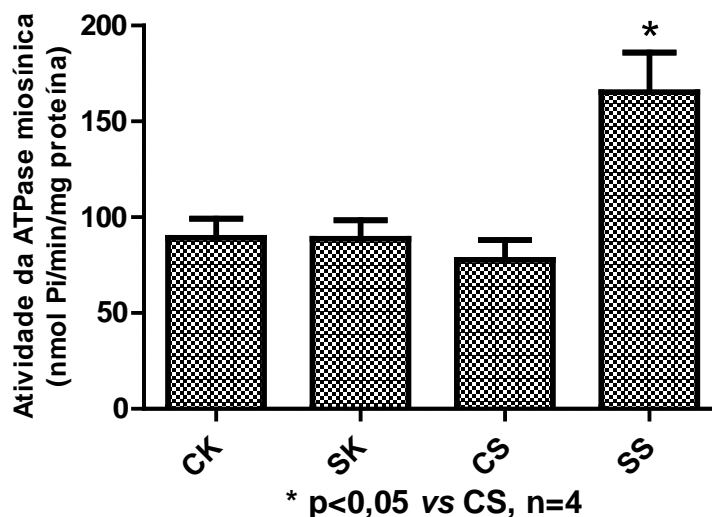


5.2.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MIOSÍNICA

A ATPase miosínica de ratos WKY bem como de SHR são semelhantes em suas atividades específicas, assim como em percentual das isoformas da cadeia pesada da miosina, alfa e beta-MHC (MOREIRA et al., 2012). O tratamento por 30 dias com o extrato de *S. buxifolia* foi capaz de aumentar a atividade desta enzima, sugerindo uma melhora no percentual das isoformas com velocidade de hidrólise do ATP maior (alfa-MHC). Este aumento na atividade ATPásica, aumenta a quantidade de energia disponível, refletindo-se em aumento da capacidade de geração de força contrátil pelo músculo cardíaco.

A atividade aumentada da ATPase miosínica observada na Figura 22 confirma os resultados encontrados no nosso estudo, onde verificamos um aumento da força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de animais SHR. Em contrapartida, amostras de miosina extraídas de VE de ratos incubadas com 0,3 mM de eucaliptol e 0,1 e 0,5 mM de eugenol, não modificaram sua atividade, porém, estas substâncias provocaram efeito inotrópico negativo em músculos papilares de ratos Wistar (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005).

Figura 22. Atividade da ATPase miosínica medida em preparações de miosina do VE dos animais dos grupos CK, SK, CS e SS.



6 CONCLUSÃO

Os efeitos cardiovasculares do extrato aquoso da *S. buxifolia* foram avaliados tanto no tratamento agudo – doses de 5mg/kg (hemodinâmica) e 50mg/mL (papilares), quanto no tratamento prolongado (30 dias) na dose de 100mg/kg, respectivamente, sobre o índice de hipertrofia, PAS, PAD e FC, força isométrica, PPP, frequências crescentes de estímulo, resposta inotrópica à concentrações crescentes de cálcio, resposta β -adrenérgica ao isoproterenol e contrações tetânicas, em ratos WKY e SHR.

- O extrato provocou efeito antihipertensivo em animais SHR diminuindo a pressão arterial sistólica e diastólica, não afetando a frequência cardíaca destes animais, tanto no tratamento agudo quanto prolongado por 30 dias;
- O extrato não provocou efeito hipotensor em ratos WKY e não afetou a frequência cardíaca destes animais tanto no tratamento agudo quanto prolongado por 30 dias;
- Ocorreu efeito inotrópico positivo em músculos papilares dos animais SHR nos dois tratamentos;
- Não houve modificação da força gerada pelos músculos papilares frente às potenciações pós-pausas de 15, 30 e 60 segundos nos dois tratamentos;
- O extrato aumentou a resposta dos músculos papilares frente às mudanças de estímulo elétrico dos músculos papilares de animais SHR nos dois tratamentos não afetando os animais do grupo WKY;
- O efeito inotrópico positivo ao cálcio foi potencializado nos músculos papilares dos animais SHR nas concentrações crescentes do íon nos tratamentos agudo e prolongado, não afetando os animais do grupo WKY;
- A resposta β -adrenérgica dos músculos papilares ao isoproterenol foi aumentada em ambos os grupos WKY e SHR no tratamento agudo. Porém, foi diminuída, no tratamento prolongado;

- As contrações tetânicas dos músculos papilares dos animais WKY e SHR no tratamento agudo foram potencializadas. Entretanto, no tratamento por 30 dias, apenas o grupo SHR apresentou melhora neste parâmetro;
- A atividade da ECA não foi modificada pelo extrato da *S. buxifolia* nos tratamentos agudo e prolongado nos 2 grupos estudados;
- A atividade ATPásica da miosina foi aumentada nos animais SHR tratados de forma prolongada por 30 dias, porém não foi modificada nos animais WKY.

Os resultados obtidos através deste estudo nos revelam o potencial antihipertensivo e cardiotônico do extrato aquoso da *Scutia buxifolia* Reissek em animais SHR. Este efeito antihipertensivo não é pela inibição da ECA. O efeito cardiotônico possivelmente pode estar ocorrendo pela ativação dos canais de cálcio de membrana e aumento da atividade ATPásica da miosina.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, E.F. **Efeitos dos extratos de coronilha (*Scutia buxifolia*, Reissek) sobre a contração muscular e pressão arterial.** Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas Medicinais de Uso Caseiro – Conhecimento Popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

BARANY, K. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. **Journal of General Physiology**, v. 50, n.2, p. 197-216, 1967.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCOBCELOS, T.H. C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BARCELOS, F.F.; OLIVEIRA, M.L.; GIOVANINNI, N.P.B.; LINS, T.P.; FILOMENO, C.A.; SCHNEIDER, S.Z.; PINTO, V.D.; ENDRINGER, D.C.; ANDRADE, T.U. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt&R.M.Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.48-56, 2010.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.N.; BERS, D.M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **Journal of Physiology**, v. 453, p. 591-608, 1992.

BASSANI, J.W.N.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. **Journal of Physiology**, v. 476, p. 279-293, 1994.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-205, 2002.

BERS, D.M.; DESPA, S. Cardiac Myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in Normal and Failing Hearts. **Journal of Pharmacological Science**, v. 100, p. 315 – 322, 2006.

BERS, D.M.; PEREZ-REYES, E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. **Cardiovascular Research**, v. 42, p. 339-360, 1999.

BLAUSTEIN, M.P., DIPOLO, R.; REEVES, J.P. Sodium-calcium exchange. Proceedings of the second international conference. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 639, 1991.

BOLIGON, A.A.; PEREIRA, R.P.; FELTRIN, A.C.; MACHADO, M.M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J.B.; ATHAYDE, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6592-6598, 2009a.

BOLIGON, A.A.; JANOVIK, V.; FELTRIN, A.C.; MACHADO, M.M.; FROLICH, J.K.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes Isolados da Fração em Diclorometano das Cascas do

Tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 121-124, 2009b.

BOLIGON, A.A.; PEREIRA, R.P.; FELTRIN, A.C.; MACHADO, M.M.; JANOVIK, V.; ATHAYDE, M.L. HPLC analysis and Phytoconstituents Isolated from Ethyl Acetate Fraction of *Scutia buxifolia* Reiss. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 450-453, 2010.

BOLIGON, A. A.; AGERTT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R. C.; CAMPOS, M. M.A. GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M. L.; DOS SANTOS, A.R.S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, p. 45-52, 2012a.

BOLIGON, A.A.; JANOVIK, V.; FROHLICH, J.K.; SPADER, T.B.; FROEDER, A.L.F.; ALVES, S.H.; ATHAYDE, M.L. Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. **Natural Product Research**, v. 26, p. 939-944, 2012b.

BOLIGON, A.A.; PIANA, M.; BRUM, T.F.; FROEDER, A.L.F.; BELKE, B.V.; SCHWANZ, T.G.; MARIO, D.N.; ALVES, S.H.; ATHAYDE, M.L. *Scutia buxifolia* Reissek essential oil: in vitro antioxidante and antimicrobial activities. **Annals of the Brazilian Academy Sciences**, v. 86, n.3, p.1463-1469, 2014a.

BOLIGON, A.A.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; WACZUK, E.P.; KLIMACZEWSKI, C.V.; ÁVILA, D.S.; ATHAYDE, M.L.; BAUERMAN, L.F. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n.5, p.358-367, 2014b.

BOLIGON, A.A.; PIMENTEL, V.C.; BAGATINI, M.D.; ATHAYDE, M.L. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, p. 46-54, 2015.

BOPDA, O.S.; LONGO, F.; BELLA, T.N.; EDZAH, P.M.; TAIWE, G.S.; BILANDA, D.C.; TOM, E.N.; KAMTCHOUING, P.; DIMO, T. Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153(2), p. 400-407, 2014.

BOTSARIS, A.S.; MACHADO, P.V. **Introdução à fitoterapia: momento terapêutico fitoterápicos**. Rio de Janeiro: Flora Medicinal, p. 8-11, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 218-254, 1976.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; VIANNA, S. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, p. 613-16, 1998.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 408-420, 2006.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, G.R.R.; GOULART, L.O.; MONTE-MOR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 127-134, 2008.

BRASIL. **Primeiro Relatório Nacional para a Conservação sobre Diversidade Biológica: Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal**, Brasília, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n° 48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BREMEL, R.D; WEBER, A. "Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions", **Biochimica et Biophysica Acta**, 376:366-374, 1975.

BRITO, A.R.M.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-89, 2000.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CASTRO, I. **Cardiologia: princípios e práticas**. Porto Alegre: 2ª Ed. Artmed, p. 1280, 1999.

CHAN, K., DELFERT, D., JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, p. 375-380, 1986.

CHEN, R.J.Y.; CHUNG, T.; FENG-YIN, L.; WEI-HUNG, Y.; TZYY-RONG, J.; TZE, J.T.C. Steroid-like compounds in Chinese medicines promote blood circulation via inhibition of Na⁺/K⁺ - ATPase. **Acta Pharmacologica Sinica** v. 31, p. 696–702, 2010.

CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1-6, 1926.

CRACKOWER, M.A.; SARAIO, R.; OUDIT, G.Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S.E.; SANTOS, A.J.O.; COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C.M.; MANOUKIAN, A.S.; CHAMPPELL, M, C.; BACKX, P.H.; YAGILQ, Y.; PENNINGER, J.M. Angiotensin-converting enzyme 2 is na essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 20, p. 822-828, 2002.

CURRAN, J.; TANG, L.; ROOF, S.R.; VELMURUGAN, S.; MILLARD, A.; SHONTS, S.; WANG, H.; SANTIAGO, D.; AHMAD, U.; PERRYMAN, M.; BERS, D.M.; MOHLER, P.J.; ZIOLO, M.T.; SHANNON, T.R. Nitric Oxide-Dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. **Public Library of Science One**, v. 9, n. 2, e 87495, 2014.

DAMIANI, C.E.; MOREIRA, C.M.; ZHANG, H.T.; CRAZZO, T.L.; VASSALLO, D.V. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 44(6), p. 688-695, 2004.

DA SILVA, R.C.M.V.A.F.; CRESTANI, S.; SOUZA, P.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SANTOS, A.R.S.; MARQUES, M.C.A.; KASSUYA, C.A.L.; SILVA-SANTOS, J.E. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 997-1004, 2012.

DA SILVA, R.C.M.V.A,F.; DE SOUZA, P.; CRESTANI, S.; GASPAROTTO, J.A.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Hypotensive and diuretic effect of the butanolic soluble fraction of the hydroethanolic extract of bark of *Scutia buxifolia* Reissek in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 172-395, 2015.

DIMO, T.; NGUELEFACK, T.B.; TAN, P.V.; YEWAH, M.P.; DONGO, E.; RAKOTONIRINA, S.V.; KAMANVI, A.; BOPELET, M. Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. leaves on the cardiovascular system of anaesthetized rats. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 1135-1139, 2003.

DUARTE, J.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; OCETE, M.A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 133, p. 117-124, 2001.

FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. . **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 381-391; 2005.

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

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FOX, S I. **Fisiologia Humana**. 7ª Ed. Manole, Barueri, p. 726, 2007

FREITAS, R.B.; ROVANI, B.T.; BOLIGON, A.A.; BRUM, T.F.; PIANA, M.; JESUS, R.S.; VELOSO, C.F.; KOBER, H.; MORESCO, R.N.; ARALDI, I.C.C.; BAUERMANN, L.F.;ATHAYDE, M.L. Hepatotoxicity Evaluation of Aqueous Extract from *Scutia buxifolia*. **Molecules**, n 18, p. 7570-7583, 2013.

FRIEDLAND, J.; SILVERSTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **American Journal of Clinical Pathology**, 66: 416-424, 1976.

GIACOMELLI, S.R. **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Goiania ulmifolia***. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

GONZALEZ, M.S.; MASCARETTI, O. A.; MERKUZA, V. M. Peptide alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemical**, v. 13, p. 2865-2860, 1974.

GROSSMAN, W. Diastolic dysfunction and congestive heart failure. **Circulation**, v. 81, p. III1–III7, 1990.

GUPTA, M.P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. **Journal Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, n. 4, p. 388-403, 2007.

GURIB-FAKIN, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

LEITE, CM; VASSALLO, D.V; MILL, J.G. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 24, p. 843-846,1991.

LEITE, CM; VASSALLO, D.V; MILL, J.G. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, n. 73, p. 638-643, 1995.

LIBBY, P. **Tratado de medicina cardiovascular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, S.; NAVARRETE-VÁSQUEZ, G.; ESTRADA-SOTO, S.; LEÓN-RIVERA, I.; RIOS, M.Y. Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Proradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). **Natural Products Research**, v. 27(2), p. 130-136, 2013.

MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobiana**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MALDANER, G.; MARANGON, P.; ILHA, V.; DALCOL, I.I.; MOREL, A.F.; ADOLPHO, L.; SEIXAS, N. Inibidores naturais da acetilcolinesterase isolados de *Scutia buxifolia*. **32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2009.

MALDANER, G.; MARANGON, P.; ILHA, V.; CARO, M.S.B.; BURROW, R.A.; DALCOL, I.I.; MOREL, A.F. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss. **Phytochemistry**, n. 72, p.804-809, 2011.

MAQUIAVELI, C.C.; SILVA, E. R.; FRANCESCATO, H.D.C; COSTA, R.S.; SILVA, C.G.A; CASARINI, D.E.; RONCHI, F.A.; COIMBRA, T.M. Brazilian embauba (*Cecropia pachystachya*) extract reduces renal lesions in 5/6 nephrectomized rats. **Journal of the Renin-Angiotensin Aldosterone System**, vol. 15(4), p. 430–439, 2014.

MARIZ, S.R.; CERQUEIRA, G.S.; ARAÚJO, W.C.; DUARTE, J.C.; MELO, A.F.M.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 372-378, 2006.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. **Food and Function**, v. 3, p. 350-361, 2012.

MARZOCCA, A.; MARTHI, C. E. M. **Las plantas cultivadas em la República Argentina. Buenos Aires: Ministerio de Asuntos Agrarios y Ganadería**, v. 7, n. 120, p. 48, 1951.

MATTIAZZI, A.; BASSANI, R.A.; ESCOBAR, A.L.; PALOMEQUE, J.; VALVERDE, C.A.; PETROFF, M.V.; BERS, D.M. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. **American Journal Physiology – Heart Circulation Physiology**, v. 308, p. 1177-1191, 2015.

MENEZES, A.C.S. **Alcalóides Ciclopeptídicos isolados da *Scutia buxifolia* Reiss.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 1996.

MENEZES A.S. Scutianine-j a cyclopeptidic alkaloid isolated from *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n.3, p. 783-786, 1996.

MILL, J.G., STEFANON, I., LEITE, C.M., VASSALLO, D.V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovascular Research**, v. 24, p. 748-753, 1990.

MILL, J.G; VASSALLO, D.V; LEITE, C.M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 399-408, 1992.

MILL, J.G; VASSALLO, D.V; LEITE, C.M.; CAMPAGNARO, P. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1455-1465, 1994.

MISSAU, F.C. **Estudo fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de alcaloides ciclopeptídicos isolados de *Scutia buxifolia* Reiss**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

MONTELLANO, O.B. Empirical aztec medicine. **Science**, v. 188, p. 215, 1975.

MOREIRA, C.M.; MEIRA, E.F.; VESTENA, L.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V.; PADILHA, A.S. Tension cost correlates mechanical and biochemical parameters in different myocardial contractility conditions. **Clinics**, v. 67, n 5, p. 489-496, 2012.

MOREIRA, C.M.; OLIVEIRA, E.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F.; VASSALLO, D.V. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 269-275, 2003.

MOREL, A.F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2571-2576, 2005.

NAYLER, W.G.; DUNNET, J. A possible explanation for the peculiar contractile behavior displayed by rat heart muscle. **Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism**, v. 5, p. 171-175, 1975.

NEGRONI, J.A.; MOROTTI, S.; LASCANO, E.C.; GOMES, A.V.; GRANDI, E.; PUGLISI, J.L.; BERS, D.M. β -adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 81, p. 162-175, 2015.

NOBRE, F.; LIMA, N.K.C; MOURA JR, L.A. **Hipertensão arterial essencial**. In: Porto, CC. Doenças do coração: prevenção e tratamento. 7ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

NOUMI, E.; HOUNGUE, F.; LONTSI, D. Traditional medicines in primary health care. **Fitoterapia**, v. 70, p. 134-139, 1999.

OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, R. A. S.; KRIEGER, J. E. Standardization of a fluorometric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 33, p.755-764, 2000.

PINTO, Y.M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**, v. 39, p. 77-88, 1998.

SANT'ANNA, L. S. **Efeitos do extrato da *Campomanesia xanthocarpa* sobre parâmetros cardiovasculares em ratos tratados com frutose**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, UNIPAMPA, Uruguaiana, 2012.

SANTOS, S. R. **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies Sul-Rio-Grandenses da Família Rhamnaceae.** Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, 2008.

SIKORA, J.; BRONCEL, M.; MKICIUK-OLASIK, E. *Aronia melanocarpa* Elliot Reduces the Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme - In Vitro and Ex Vivo Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 7, 2014.

SILVA JR., A.A.S.; VIZZOTTO, V.J. **Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras.** Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v. 9, n.1, p.5-8, 1996.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 7º Ed. Ver. Ampl. Porto Alegre: UFRGS. 1102 p., 2007.

SOARES, M.C.M.S.; DAMIANI, C.E.N.; MOREIRA, C.M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v 38, p. 453-461, 2005.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC)/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.** Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v. 95(1 supl.1), p. 1-51, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 640 p., 2005.

STEFANON, I.; CADE Jr.; FERNANDES A.A. et al. Ventricular performance and Na⁺,K⁺-ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 902-911, 2009.

TARDIFF, J.C.; CARRIER, L.; BERS, D.M.; POGGESI, C.; FERRANTINI, C.; COPPINI, R.; MAIER, L.S.; ASHRAFIAN, H.; HUKE, S.; VAN DER VELDEN, J. Targets for therapy in sarcomeric cardiomyopathies. **Cardiovascular Research**, v. 105, p. 457-470, 2015

TORTOSA, R. D. **El género Discaria (Rhamnaceae)**. Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica, v. 22, n. 1/4, p. 331-335, 1983

TSCHESCHE, R.; WELTERS, R.; FELHABER, H. W. Scutianin, ein cyclisches peptid-alkaloid aus *Scutia buxifolia* Reiss. **Chemische Berichte**, v. 100, p. 323-334, 1967.

TSCHESCHE, R.; WILHELM, H.; AMMERMANN, E.; ECKHARDT, G. Hysodricanin-A, Mauritin-H, Scutianin-F und Aralionin-C, vier weitere cyclopeptid alkaloide aus Ziziphus, *Scutia* und *Araliorhamnus*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1025-1028, 1977.

TSCHESCHE, R.; HILLEBRAND, D. Scutianin-G, ein weiteres cyclopeptid alkaloid aus *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1817-1818, 1977.

UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 1-18, 1995.

VASSALLO, D.V.; OLIVEIRA, E.M.; STEFANON, I. **Contratilidade Miocárdica**. In: Aires, MM; Fisiologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008; p. 435-469.

VEIGA-JUNIOR V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VILLIGER, A.; SALA, F.; SUTER, A.; BUTTERWECK, V. In vitro inhibitory potential of *Cynara scolymus*, *Silybum marianum*, *Taraxacum officinale* and *Peumus boldus* on key enzymes relevant to metabolic syndrome. **Phytomedicine**, v. 22(1), p. 138-144, 2015.

VORA, C. K.; MANSOOR, G. A. Herbs and alternative therapies: Relevance to hypertension and cardiovascular diseases. **Current Hypertension Reports**, v. 7, n. 4, p. 275-280, 2005.

YUNES, R. A.; KURSHIMA, K. N. C.; SOUZA, M. M.; DELLE, M. F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Z. Naturforsch C**, v. 56, n. 9-10, p. 703-706, 2001.

YUSUF, S.; REDDY, S.; OUNPUU, S.; ANAND, S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. **Circulation**, v. 104, p. 2746–2753, 2001.

WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, R. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* ReisseK. **PlantaMedica**, v. 12, p. 13-25, 1964.

WUSSLING, M.; SZYMANSKI, G. What information contains a rest contraction curve? A theoretical study with experimental results from the rabbit papillary muscle. **Acta Biologica et Medica Germanica**, v. 39, p. 871-879, 1980.

WUSSLING, M; SZYMANSKI, G. Simulation by two calcium store models of myocardial dynamic properties: potentiation, staircase, and biphasic tension development. **General Physiology and Biophysics**,v. 5, p. 135-152, 1986.

ZAINUDIN, M.M.; ZAKARIA, Z.; MOHD, N.A.M.N. The use of *Piper sarmentosum* leaves aqueous extract (Kadukmy™) as antihypertensive agent in spontaneous hypertensive rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 54, 2015

ZAPATA-SUDO, G.; SILVA, J. S.; PEREIRA, S.L.; SOUZA, P.J.C.; MOURA, R.S.; SUDO, R.T. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 227, 2014.