



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LIANE SANTARIANO SANT'ANNA

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DA FARMACODINÂMICA DO
EXTRATO AQUOSO DA *Campomanesia xanthocarpa* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR EM RATOS.**

**URUGUAIANA
2017**

LIANE SANTARIANO SANT'ANNA

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DA FARMACODINÂMICA DO
EXTRATO AQUOSO DA *Campomanesia xanthocarpa* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR EM RATOS.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Cleci Menezes Moreira

**URUGUAIANA
2017**

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) .

S231c Sant'Anna, Liane Santariano Sant'Anna

Composição fitoquímica e investigação da farmacodinâmica do
extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* sobre o sistema
cardiovascular em ratos / Liane Santariano Sant'Anna Sant'Anna.
82 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Cleci Menezes Moreira Moreira".

1. hipertensão. 2. sistema cardiovascular. 3. receptor AT1.
4. *Campomanesia xanthocarpa*. 5. composição fitoquímica. I.
Título.

LIANE SANTARIANO SANT'ANNA

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DA FARMACODINÂMICA DO
EXTRATO AQUOSO DA *CAMPOMANESIA XANTHOCARPA* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR EM RATOS.**

Tese de doutorado apresentado ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção molecular

Tese de doutorado defendida e aprovada em: 12 de junho de 2017.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Gustavo Dias Ferreira
(UFPel)

Prof. Dr. Luis Flávio Souza de Oliveira
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Leonardo Magno Rambo
(UNIPAMPA)

Dedico esta tese aos meus pais, Vera Iara Santariano Sant'Anna e João Carlos de Labernarde Sant'Anna, maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão, com quem eu sei que posso e poderei contar em qualquer momento!

AGRADECIMENTO

Não se faz nada sozinho, e esta tese não seria diferente, foram necessárias muitas mãos, muita ajuda, muito apoio para que ela ficasse da maneira que está hoje, não pronta porque sempre há o que fazer e aprender, mas no ponto para que eu siga para uma nova etapa.

Olhando para trás nesse pouco mais de quatro anos que se passaram, eu não sei se conseguiria nomear cada pessoa que me ajudou em algum experimento, no trabalho, na pesquisa, na escrita, na inspiração, com uma palavra amiga ou com um simples gesto de carinho, porque acreditem tudo conta. Por isso meu muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até a defesa desta tese!

Não poderia deixar de agradecer a Deus por cada obstáculo colocado em meu caminho, e não foram poucos, mas para cada um deles Ele me deu força e fé redobrados para superá-los e seguir em frente.

Agradeço aos meus pais infinitamente, palavras nunca serão suficientes para descrever o tamanho do amor e gratidão que tenho por eles. É por eles que nunca desisti, em tantas vezes que fraquejei, foi por eles que segui, pois nunca suportei desapontá-los sabendo de todo o esforço que sempre fizeram e fazem por mim. Mãe e Pai muito obrigada, eu amo vocês!

A pós-graduação me proporcionou muito mais do que uma orientadora, me deu uma amiga que vou levar para a vida inteira. Eu conheci a pessoa incrível que a Cleci é e o enorme coração que ela tem, além de admirá-la como profissional, eu a admiro muito como pessoa. Profe agradeço todo o conhecimento compartilhado comigo, mas muito mais cada palavra de apoio e incentivo, toda a tua compreensão e por nunca medir esforços para fazermos o que era preciso.

Aos professores Gustavo Dias Ferreira, Elton Luis Gasparotto Denardin, Luis Flávio Souza de Oliveira e Leonardo Magno Rambo que aceitaram o convite para participar da banca examinadora e dedicaram algumas horas do seu tempo para contribuir com minha tese, meu muito obrigada!

É preciso muita coragem para desistir de um sonho, mas é preciso muito mais determinação para continuar quando os obstáculos insistem em aparecer. Nunca esqueça que o sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.

(Autor desconhecido)

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil e estão fortemente associadas a distúrbios metabólicos como a síndrome metabólica. A síndrome metabólica é caracterizada pela cocorrência de fatores de risco cardiovasculares como hipertensão, hiperinsulinemia, à glicose, obesidade central e dislipidemia. *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida no Brasil como Guabiroba, tem sido utilizada empiricamente devido ao seu potencial efeito na redução dos níveis de colesterol sanguíneos, e para várias condições, incluindo doenças inflamatórias, renais, digestivas, dislipidemias e outras. O objetivo deste estudo foi analisar a composição química e investigar os efeitos do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* na pressão arterial de ratos normotensos agudamente, bem como seu possível mecanismo de ação, *in vivo* e *in silico*. Além disso, também se avaliou os efeitos do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* sobre a atividade da ATPase miosínica e expressão gênica de marcadores cardíacos em ratos com síndrome metabólica induzida por uma dieta rica em frutose. O extrato foi analisado quanto aos compostos fenólicos totais e ao teor total de flavonoides. Os componentes químicos foram determinados por análise de HPLC. Para a avaliação aguda, a pressão arterial sistólica e diastólica e a frequência cardíaca foram medidas na presença de extrato e com administração de fármacos. Para avaliação dos animais com síndrome metabólica, os animais foram tratados durante 30 dias com extrato aquoso das folhas preparado por infusão. A extração de miosina cardíaca foi realizada com centrifugação de alta força iônica, a medida da atividade da ATPase miosínica foi quantificada pelo fosfato inorgânico liberado através de método colorimétrico e expresso em nmolPi/min/mg de proteína. A expressão gênica de α -MHC, β -MHC, fator natriurético atrial e α -actina esquelética foi avaliada por PCR em tempo real. As folhas de *C. xanthocarpa* apresentaram conteúdo relevante de fenois e flavonoides, e sugerimos a presença de ácido clorogênico, ácido gálico, quercetina e teobromina. A administração aguda de extrato aquoso de *C. xanthocarpa* tem um efeito hipotensor dose-dependente em ratos normotensos, sugerindo que o mecanismo de ação pode ser mediado pelo sistema renina-angiotensina através do bloqueio do receptor AT1 (AT1R) e resposta simpática autonômica. Estudos “docking” mostraram modelos que indicaram uma interação entre ácido clorogênico e quercetina com o sítio de ligação do AT1R. Os achados desses estudos de acoplamento sugerem o potencial dos constituintes de *C. xanthocarpa* para uso como agentes preventivos para a pressão sanguínea. No tratamento de ratos com síndrome metabólica o extrato aumentou a atividade de ATPase miosínica e impediu a reexpressão da isoforma fetal da MHC, auxiliando na prevenção do dano cardíaco.

Palavras-chave: *Campomanesia xanthocarpa*, composição química, hipertensão, sistema cardiovascular, receptor AT1, ácido clorogênico, quercetina, miosina.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Brazil and are strongly associated with metabolic disorders such as the metabolic syndrome. Metabolic syndrome is characterized by the co-occurrence of cardiovascular risk factors such as hypertension, hyperinsulinemia, glucose intolerance, central obesity and dyslipidemia. *Campomanesia xanthocarpa*, known in Brazil as Guabiroba, has been used empirically because of its potential effects on reduce blood cholesterol levels, and for various conditions including inflammatory, renal, digestive, dyslipidemia, and other diseases. The objective of this study was to analyze the chemical composition and to investigate the effects of the aqueous extract of *C. xanthocarpa* on blood pressure of normotensive rats acutely, as well as its possible mechanism of action, using in vivo and in silico procedures. In addition, the effects of *C. xanthocarpa* aqueous extract on myosin ATPase activity and gene expression of cardiac markers in rats with metabolic syndrome induced by a high fructose diet were also evaluated. The extract was evaluated for total phenolic compounds and total flavonoid content. The chemical components were determined by HPLC analysis. For acute evaluation, systolic and diastolic blood pressure and heart rate were measured in the presence of extract and with drug administration. For the evaluation of animals with metabolic syndrome, the animals were treated for 30 days with aqueous extract of the leaves prepared by infusion. Cardiac myosin extraction was performed with high ionic strength centrifugation, the myosin ATPase activity measurement was quantified by the inorganic phosphate released through a colorimetric method and expressed in nmolPi/min/mg of protein. Gene expression of α -MHC, β -MHC, atrial natriuretic factor and skeletal α -actin was evaluated by real-time PCR. *C. xanthocarpa* leaves presented a relevant content of phenols and flavonoids, and we suggest the presence of chlorogenic acid, gallic acid, quercetin and theobromine. Acute administration of *C. xanthocarpa* aqueous extract has a dose-dependent hypotensive effect in normotensive rats, suggesting that the mechanism of action may be mediated by the renin-angiotensin system through AT1 receptor blockade (AT1R) and autonomic sympathetic response. Docking studies showed models that indicated an interaction between chlorogenic acid and quercetin with the active site of the AT1R. The findings of these coupling studies suggest the potential of the *C. xanthocarpa* constituents for use as preventive agents for blood pressure. In the treatment of rats with metabolic syndrome the extract increased the myosin ATPase activity and prevented reexpression of fetal MHC isoform, helping to prevent cardiac damage.

Keys-words: *Campomanesia xanthocarpa*, chemical composition, hypertension, cardiovascular system, AT1 receptor, chlorogenic acid, quercetin, myosin.

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. O uso de plantas medicinais.....	16
2.2. Campomanesia xanthocarpa (Família Myrtaceae).....	19
2.3. Doenças Cardiovasculares.....	22
2.3.1. Hipertensão.....	23
2.3.2. Síndrome Metabólica.....	24
3. OBJETIVO.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Material botânico.....	29
4.2. Análises fitoquímicas.....	29
4.2.1. Determinação de fenólicos totais.....	29
4.2.2. Determinação de flavonoides totais.....	30
4.2.3. Análises cromatográficas.....	30
4.3. Parâmetros hemodinâmicos.....	32
4.3.1. Curva de doses do extrato.....	32
4.3.2. Possíveis mecanismos de ação do extrato.....	32
4.4. Tratamento prolongado.....	33
4.4.1. Animais.....	33
4.4.2. Grupos experimentais.....	33
4.5. Avaliação da atividade específica da ATPase miosínica.....	34
4.5.1. Preparação da fração miosínica.....	34
4.5.2. Medida da ATPase miosínica.....	35
4.6. Expressão gênica de marcadores cardíacos.....	35
4.6.1. Extração de RNA total.....	35

4.6.2. Síntese de cDNA.....	36
4.6.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para expressão do mRNA.....	36
4.7. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. <i>Chemical composition and hypotensive effect of Campomanesia xanthocarpa</i>	38
5.2. <i>Campomanesia xanthocarpa prevents hypertension and improves contractility for maintaining alpha-MHC isoform in rats with metabolic syndrome</i>	49
6. CONCLUSÕES.....	70
7. PERSPECTIVAS.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, no ano de 2016, aproximadamente 340 mil pessoas morreram de doenças cardiovasculares (DCV) no Brasil. As DCV têm sido bastante associadas como agravantes aos distúrbios metabólicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017). Apesar da tendência de redução dos riscos de mortalidade por DCV no País e no mundo, algumas projeções indicam o aumento de sua importância relativa em países de baixa e média renda. A maior longevidade, associada ao possível aumento da incidência das DCV por adoção dos modos de vida com maior exposição a fatores de risco, são consideradas as principais razões deste incremento. Como fatores de risco estão o tabagismo e inatividade física, além de dieta rica em gorduras saturadas, com consequente aumento dos níveis de colesterol e hipertensão (ISHITANI et al., 2006).

A hipertensão é uma condição patológica altamente prevalente que é considerada um dos fatores de risco cardiovascular mais relevante e é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DINH et al., 2001). No Brasil, a hipertensão arterial (HA) atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV. A hipertensão atinge de 23 a 25% da população urbana adulta (com mais de 18 anos), chegando a 55% nos indivíduos mais idosos (MALACHIAS et al., 2016).

A Síndrome Metabólica (SM) é o distúrbio metabólico mais comum associado as DCV, sendo caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/diabetes do tipo 2, obesidade central e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicérides alto e HDL-colesterol baixo) (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004). A mortalidade por complicações cardiovasculares é aumentada dependendo do número de sintomas da SM que o paciente apresenta (ALBERTI; ECKEL; GRUNDY, 2009; HU et al., 2004).

Nesta perspectiva, modelos animais têm sido usados para o estudo de mecanismos envolvidos na SM e potenciais terapêuticos para prevenção e tratamento desta síndrome e doenças associadas. A indução da SM em ratos por frutose é um modelo alvo de extensas investigações. Já é bem elucidado que este modelo experimental de SM induz hipertensão, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina em ratos (SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2007).

Estudos envolvendo os mecanismos e sintomas metabólicos com o efeito de plantas medicinais sobre várias doenças têm aumentado nos últimos anos e são úteis para a descoberta de novas terapêuticas para DCV. As plantas medicinais são fontes ricas para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, já que seus metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides, entre outros, são conhecidos por possuírem propriedades medicinais importantes (JOHN et al., 2014).

A análise fitoquímica do extrato das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida popularmente como guabiroba, indicaram a presença de flavonoides, saponinas, taninos e terpenos, os quais poderiam justificar os usos empíricos desta planta (KLAFKE et al., 2010; MARKMAN et al., 2004). No sul do Brasil, a *C. xanthocarpa* tem sido popularmente usada por seu efeito potencial em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, sendo confirmado por Klafke et al. (2010) em estudo com pacientes hipercolesterolêmicos. Os relatos populares acerca do uso tradicional do chá das folhas de guabiroba revelam ainda sua utilização para diversas doenças, incluindo inflamatórias, renais, digestórias, reumáticas, hepáticas, cistite, redução de peso, entre outras (ALICE et al., 1995; DICKEL et al., 2007).

Outros estudos demonstraram a eficácia da guabiroba contra o diabetes, à úlcera, como antioxidante e anti-inflamatória (MARKMAN et al., 2004; VINAGRE et al., 2010; VIECILI et al., 2014; KLAFKE et al., 2016).

Considerando a escassez de estudos sobre a ação da *C. xanthocarpa* em DCV, o presente estudo visa avaliar a composição química desta planta e mecanismos de efeitos potenciais do extrato aquoso no sistema cardiovascular em ratos normotensos e com SM induzida por frutose.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O uso de plantas medicinais

Plantas medicinais são utilizadas pela humanidade desde o começo das civilizações (FRISHMAN et al., 2004) e talvez a constante busca da cura de doenças pela ingestão de ervas tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGA JR et al., 2005). Alguns registros históricos mostram que há mais de 5000 anos os chineses já colecionavam listagens de substâncias de origem vegetal para cura de suas enfermidades (SOUZA et al., 2010). Por muitos anos, o conhecimento popular fez do uso de plantas a principal fonte de recursos para o tratamento de enfermidades que acometiam a população e para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência através da melhoria de sua saúde (ALVIM et al., 2006).

Desde 1980, em virtude de mudanças na política, economia e saúde, algumas práticas populares, como o uso terapêutico de plantas medicinais, começaram a ser resgatados no âmbito científico, não no sentido de oposição à alopatia, mas para complemento das práticas de saúde. Entre os motivos desta retomada, é destacável a falta de sucesso em modelos médicos e biológicos no tratamento de doenças, os efeitos iatrogênicos associados com o alto custo de alguns medicamentos alopáticos, comprovada eficácia cientificamente de algumas plantas juntamente ao respeito e avaliação dos aspectos culturais que estão claramente presentes no contexto destas práticas (ALVIM et al., 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Tem-se conhecimento que 80% da população mundial dependem das fontes naturais no que se refere à atenção primária à saúde e, destes, 85% usa plantas ou preparações com base em vegetais (WHO, 2002). No Brasil, há estimativas que o uso de plantas medicinais seja oriundo da miscigenação do povo brasileiro, principalmente pela influência dos índios, negros e europeus (BARCELOS et al., 2010).

No entanto, as plantas medicinais são consumidas pela população com pouca ou nenhuma comprovação das suas propriedades farmacológicas, sendo muitas vezes indicadas por comerciantes ou usuários para fins diferentes e sem levar em consideração uma possível

toxicidade ou presença de substâncias não identificadas, adulterantes, diluentes, ou simplesmente misturas com outros extratos vegetais, comprometendo a qualidade do produto natural ou fitoterápico, o que vem sendo abordado em publicações científicas (MACIEL et al., 2002; VEIGA JR et al., 2006).

Uma das atitudes desenvolvida pelo governo brasileiro foi a criação, em 2006, através do Ministério da Saúde, da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), direcionada aos pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde, que tem como um dos seus objetivos o incentivo ao uso de plantas medicinais como tratamento, já que “o Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica, como a maior diversidade vegetal do mundo, o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente este conhecimento” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Neste mesmo intuito, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2009) incentiva estudos com plantas medicinais para usos no SUS, seguros, eficazes e de qualidade, bem como reconhece as práticas populares e tradicionais de plantas e remédios caseiros.

No Brasil e no mundo, o uso de plantas medicinais como tratamento alternativo de doenças como as que atingem o sistema cardiovascular cresce significativamente. É uma característica das plantas medicinais sua ampla utilização terapêutica e grande aceitação por parte da população. Em contraste com medicamentos modernos, as plantas medicinais são frequentemente usadas para o tratamento de doenças crônicas (CALIXTO, 2000). Com base nestes dados, diversos vegetais têm sido estudados com objetivos de fornecer bases científicas para tais aplicações e ampliar o arsenal terapêutico de doenças como a hipertensão (BASTOS et al., 2009).

A utilização das plantas medicinais vai muito para além do seu uso popular. O isolamento de determinadas substâncias ativas a partir de fontes naturais revolucionou a história da medicina. A morfina, por exemplo, foi isolada do ópio por Sertürner, no início do século XIX, a partir da planta *Papaver somniferum* L., vulgarmente conhecida como papoula do oriente. Assim como os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis spp* (BARREIRA, 2001). Segundo Brandão et al. (2010), acredita-se que nos últimos 25 anos, 77,8% dos agentes anticancerígenos testados e aprovados são derivados de produtos naturais, havendo um vasto número de substâncias ativas como a vincristina, rutina, emetina ou colchicina que são amplamente utilizadas na prática clínica. Só nos anos 80 a pesquisa científica resultou na

identificação de 212 compostos de origem vegetal provenientes de 95 espécies de plantas (ALVES, 2001).

Dentre as substâncias de origem vegetal mais abundantes podemos citar os compostos fenólicos e alcaloides. Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na Natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas, enquadrando-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Tais classes de compostos podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (SILVA et al., 2010).

Adicionalmente, muitos desses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios, demonstrando seu potencial efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995)

Os alcaloides são um dos grupos mais abundante de metabólitos secundários encontrado em organismos vivos e tem uma grande variedade de tipos estruturais, vias biossintéticas e atividades farmacológicas. Apesar de tradicionalmente serem extraídos de plantas, muitos são também encontrados em animais, insetos, invertebrados marinhos e microorganismos. Os alcaloides têm sido utilizados na medicina por muitos anos e alguns são matérias primas de drogas usadas até hoje (ROBERTS; WINK, 1998). Dentre eles os mais famosos são a atropina (antiespasmódico), morfina (analgésico opioide), cocaína (estimulante e anestésico local), tubocurarina (miorelaxante), colchicina (tratamento da gota), ajmalicina (antiarrítmico) e a vimblastina, utilizada no tratamento do câncer (RANG et al, 2001).

Geralmente, os princípios ativos responsáveis pela ação farmacológica de plantas medicinais são desconhecidos. Uma característica básica de agentes fitoterápicos é o fato de que normalmente não possuem um efeito farmacológico imediato. Por esta razão, não são utilizados para tratamento de emergência e sim para prevenção ou ainda controle de diferentes doenças (CALIXTO, 2000).

A indústria farmacêutica, baseada em dados experimentais, empregou cada vez mais métodos modernos de química medicinal, incluindo a modelagem molecular, como poderosas ferramentas para o estudo das relações estrutura-atividade, com foco no entendimento de complexos biológicos e sistemas químicos. A integração de estratégias computacionais e experimentais tem sido de grande valor na identificação e desenvolvimento de novos compostos promissores. (FERREIRA et al., 2015).

O acoplamento molecular, a blindagem virtual baseada em estrutura (SBVS) e a dinâmica molecular (MD) estão entre as estratégias de desenho de fármacos baseadas na estrutura (SBDD) mais utilizadas devido à sua vasta gama de aplicações na análise de eventos de reconhecimento molecular, interações moleculares e alterações conformacionais induzidas (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2011).

Os métodos de ancoragem molecular exploram as conformações de ligantes adotados nos locais de ligação de alvos macromoleculares. Esta abordagem também estima a energia livre de ligação ligante-receptor, avaliando fenômenos críticos envolvidos no processo de reconhecimento intermolecular. Hoje, como uma variedade de algoritmos de acoplamento estão disponíveis, a compreensão das vantagens e limitações de cada método é de fundamental importância no desenvolvimento de estratégias eficazes e na geração de resultados relevantes (FERREIRA et al., 2015).

As abordagens SBDD têm sido aplicadas como valiosas ferramentas de descoberta de fármacos tanto na academia como na indústria, devido à sua versatilidade e carácter sinérgico. Estas abordagens têm sido empregadas com sucesso em uma série de investigações de dados estruturais, químicos e biológicos (DRWAL; GRIFFITH, 2013). Portanto, o uso destes modelos aliados a experimentos químicos e biológicos aumentam a capacidade de avaliação de compostos com potencial farmacológico.

2.2. *Campomanesia xanthocarpa* (Família Myrtaceae)

A família Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas, compreende cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América. É considerada uma das famílias mais bem representadas no Brasil, com distribuição de suas espécies em todos os biomas, onde são registrados 23 gêneros e aproximadamente 997 espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; SOBRAL et al., 2014).

Essa família apresenta grande potencial econômico, tanto que suas espécies são utilizadas na alimentação, como, as espécies de *Psidium guajava* L. (goiaba), *Eugenia uniflora* L. (pitanga), *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (guabiroba), *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), as quais são consumidas em forma de suco, doces, geleias e sorvetes (LORENZI et al., 2006). Na ornamentação, destacam-se as espécies *Eugenia sprengelii* DC. (murta), *Leptospermum scoparium* (érica) e *Callistemon spp.* (escova-de-garrafa). No campo medicinal destacam-se *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto), empregado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite; *Myrciaria dubia* (Kunth), (camu-camu) que apresenta alto teor de vitamina C, segundo informações etnofarmacológicas; e *Myrcia multiflora* (Lam.) DC (pedra-hume), com ação anti-diabética comprovada (LORENZI; MATOS, 2002). Também apresentam importância ecológica, pois seus frutos suculentos e carnosos são fontes de alimento à fauna silvestre. Muitos animais que se alimentam desses frutos acabam veiculando a dispersão das sementes e favorecendo a sobrevivência e permanência dessas espécies (GRESSLER, 2006; PIZZO, 2003).

A espécie *Campomanesia xanthocarpa* Berg., popularmente conhecida como guabirobeira, guabiroba, guavirova, guabirobeira-do-mato e guabira é uma planta nativa brasileira, rústica, que exige poucos cuidados, podendo atingir 15 metros de altura, encontrada desde o estado de Minas Gerais até o extremo sul do Rio Grande do Sul. Apresenta folhagem verde escura, floresce entre setembro a outubro e frutifica entre novembro e dezembro. Suas flores são esbranquiçadas e os frutos apresentam-se em bagas arredondadas de coloração verde a amarela, quando maduros (LORENZI, 1992).

Figura 1 – Folhas de *Campomanesia xanthocarpa*



Seus frutos têm sabor delicado e levemente doce e são aproveitados na produção de refrescos, sorvetes e licores, além da produção de doces caseiros, o que indica a presença de

substâncias pecticas em teores significativos. As pectinas são utilizadas nas indústrias alimentícia e farmacêutica, devido às suas propriedades geleificantes e estabilizantes. A guabiroba apresenta propriedades nutricionais devido ao seu alto teor de vitamina C, sais minerais e compostos fenólicos, o que permite considerá-la alimento funcional (LORENZI, 1992; SANTOS et al., 2009).

Infusões preparadas com folhas de guabirobeira são utilizadas na medicina popular como depurativo, antidiarreico, antirreumático, anti-inflamatório, doenças do trato urinário, e para baixar os níveis sanguíneos de colesterol e triglicérides (ALICE et al., 1995). Estudos vêm sendo feitos com a planta para comprovar seus efeitos cientificamente. Fernandes e Vargas (2003) demonstraram seu potencial mutagênico que resultaram em efeito comutagênico e protetivo ao material genético. Markman et al. (2004) descreveram a atividade antiulcerígena do extrato alcoólico da *C. xanthocarpa* e testaram uma dose tóxica aguda não verificando mudança de peso corporal e de órgãos como fígado, rins, pulmões e coração. Porém, apenas uma única dose foi testada e nenhum outro parâmetro fisiológico foi verificado neste estudo.

O tratamento crônico da obesidade em ratos, com a infusão de folhas de *C. xanthocarpa*, levou a um decréscimo significativo na massa corpórea, bem como reduziu a glicose em estudo realizado por Biavatti et al. (2004). Dickel et al. (2007) fizeram um levantamento entrevistando herbalistas de Porto Alegre sobre o uso popular de plantas para redução da obesidade na população da capital do RS, no qual a guabiroba foi bem citada, e não só para redução de peso corporal, como antirreumático, antidiarreico, adstringente, regulador do fluxo intestinal e para tratar desordens hepáticas, cistite e uretrite.

Pastori et al. (2013) comprovaram as atividades antiproliferativas e antigenotóxicas do extrato de *C. xanthocarpa* usando testes *in vivo* de células de ponta radicular de *Allium cepa*. Klafke et al. (2012) apontaram atividade antiplaquetária, antitrombótica e fibrinolítica, e que o extrato de guabiroba pode ser eficaz na prevenção da formação de trombos através de várias vias. Ainda outros estudos demonstraram que o extrato de *C. xanthocarpa* é capaz de promover a redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório (Viecili et al., 2014; Klafke et al., 2016).

Klafke et al. (2010) em estudo com humanos hipercolesterolêmicos em tratamento com cápsulas contendo *C. xanthocarpa*, demonstraram redução nos níveis de colesterol total e LDL consideráveis, e relacionaram este efeito com suas propriedades antioxidantes. O grau de

redução do LDL-colesterol demonstrado nesse trabalho foi suficiente para interferir no tamanho da placa aterosclerótica, reduzindo o risco de doenças coronárias.

Os resultados do estudo de Vinagre et al. (2010), sugerem que o tratamento com decocto das folhas de *C. xanthocarpa* pode ser útil para o manejo do *diabetes mellitus*, porém ressaltam que estudos farmacológicos e toxicológicos ainda são necessários. Destacam que muitos medicamentos orais ainda possuem efeitos adversos, e o gerenciamento da hiperglicemia e hiperlipidemia com fármacos para baixar seus níveis é um desafio para o sistema médico público, pois outro problema grave com tais medicamentos são os elevados custos que demandam.

Apesar dos estudos com a *C. xanthocarpa* e de seus potenciais fitoterápicos, há necessidade de estudos mais aprofundados acerca da farmacologia, toxicidade e mecanismos de ação sobre parâmetros tão importantes, como os cardiovasculares, que atingem a saúde da população mundial.

2.3. Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) geralmente provêm de disfunções vasculares, como por exemplo, aterosclerose, trombose ou hipertensão, as quais comprometem o funcionamento de órgãos. Notavelmente, o coração e o cérebro podem ser afetados, como em caso de infarto do miocárdio e mal súbito. Nas últimas décadas, grandes avanços foram feitos no tratamento de alguns tipos de DCV, no entanto, novas opções de tratamento são urgentemente necessárias. Ainda melhorar o diagnóstico é crucial, porque ao detectar a doença em estágios iniciais, o foco da terapia pode passar do tratamento para a prevenção (GIELEN; LANDMESSER, 2014).

As DCV são a principal causa de morbidade e mortalidade de milhões de pessoas no mundo, o que inclui uma variedade de doenças como doença vascular periférica, doença arterial coronária, insuficiência cardíaca, dislipidemias, hipertensão, e até SM pela associação de vários sintomas (LIM; KO; KIM, 2013).

2.3.1. Hipertensão

A hipertensão arterial é considerada um dos fatores de risco mais relevantes na etiologia das DCV, e aproximadamente 90 a 95% dos casos de hipertensão ocorrem por causa desconhecida, portanto, nomeada hipertensão arterial essencial (CHOBANIAN et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Diversos mecanismos têm sido implicados na patogênese da hipertensão arterial, dentre eles, o aumento da atividade do sistema nervoso simpático, a superativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, a disfunção endotelial vascular, o remodelamento cardíaco e vascular, e a alteração do processo de angiogênese (NADAR et al., 2006). Em estágios iniciais da hipertensão, a atividade simpática e o débito cardíaco estão aumentados, contribuindo para a elevação da pressão arterial. Entretanto, com o estabelecimento da patologia, o aumento da resistência periférica parece ser a razão física para a manutenção da pressão arterial elevada (MULVANY, 2012).

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 justaglomerulares renais, cliva o angiotensinogênio (substrato da renina, produzido no fígado) em angiotensina I (AI), que é convertida pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) em angiotensina II (AII). A ECA é mais abundante nos pulmões, mas também está presente em outros tecidos como no coração e na vasculatura sistêmica (ECA tecidual). 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. Esses 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).

Os efeitos cardiovasculares podem ser estudados dando enfoque à avaliação da contratilidade através da quantificação da miosina, a qual é uma proteína envolvida na contração miocárdica, que pode sofrer alterações em patologias como hipertensão, diabetes e outras (MERCADIER et al., 1981; RUNDELL et al., 2004). A subunidade da cadeia pesada da miosina (MHC), que contém o sítio para a atividade ATPase, existe em duas formas: uma forma rápida, o homodímero $\alpha\alpha$ (ou V1) e uma lenta, $\beta\beta$ (ou V3). A ATPase miosínica é a

enzima responsável pela hidrólise do ATP, com liberação da energia requerida para a contração muscular.

Algumas patologias cardíacas ou sistêmicas (LOMPRÉ et al, 1979) podem levar à mudança na expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) de alfa-MHC para beta-MHC, na tentativa de consumir menos ATP para geração do trabalho cardíaco. A mudança das isoformas da miosina pode ser inferida pela determinação da atividade da ATPase miosínica (DECAYRE; SWYNGHEDAUW, 1975) ou diretamente pela quantificação da expressão proteica de suas isoformas (LEMON et al., 2011; TALMADGE; ROY, 1993; ZHANG et al., 2003).

A reprogramação da expressão gênica da miosina parece ocorrer numa tentativa aparente de poupar substratos de alta energia e melhorar o desempenho mecânico do músculo ventricular frente a maior demanda de trabalho ao qual está submetido (RUNDELL et al., 2004). A melhoria da função ventricular em humanos com cardiopatia dilatada foi diretamente relacionada ao aumento da expressão de alfa-MHC. Pequeno aumento na expressão de alfa-MHC em corações insuficientes pode ser benéfico para melhorar a contratilidade miocárdica e o débito cardíaco, o qual pode ter impacto funcional significativo (ABRAHAM et al., 2002).

A hipertensão essencial é uma condição patológica altamente prevalente que é considerada um dos fatores de risco cardiovascular mais relevantes e é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DINH et al., 2001). Os estudos acerca dessa doença são muito relevantes, bem como de compostos de origem vegetal que tenham potencial terapêutico, pois medicamentos para hipertensão à base de plantas ainda permanecem uma escolha popular (ALAMGEER et al., 2014).

2.3.2. Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) foi descrita primeiramente em 1988 por Reaven para denominar uma combinação de fatores de risco prevalentes para doenças cardiovasculares (DCV) (REAVEN, 1988). É caracterizada pelo agrupamento de riscos metabólicos encontrados em uma mesma pessoa, tais como, obesidade, resistência à insulina, intolerância a glicose, dislipidemia e hipertensão. O primeiro acordo unificado sobre a definição da SM foi feito durante um encontro organizado pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) em 2005 (WILSON et al., 2005).

A fisiopatologia da SM é bem complexa e ainda bastante estudada. A maioria dos pacientes é de obesos, idosos, sedentários e possui resistência a insulina. Os fatores determinantes já identificados são peso, genética, envelhecimento, estilo de vida e consumo calórico em excesso (KATZMARYK et al., 2003).

A definição de SM mais usada para diagnóstico é a proposta pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NECP-ATPIII), a qual descreve que pacientes com SM possuem pelo menos três das seguintes alterações: obesidade visceral (circunferência abdominal > 102 cm para homens e > 88 cm para mulheres), pressão arterial elevada (> 130/85 mmHg), disglucemia (glicose plasmática > 100 mg/dL), concentrações de triglicérides elevada (> 150 mg/dL) e baixos níveis de colesterol HDL (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres) (GRUNDY et al., 2005).

Mesmo que não esteja claro se o diagnóstico da SM possa ajudar na prática clínica, é reconhecido que esta síndrome representa uma combinação fisiopatológica importante para estudar o metabolismo de humanos e modelos animais (BORCH-JOHNSEN; WAREHAM, 2010). Pois a presença da SM leva a um aumento do risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus do tipo 2 e DCV na forma de aterosclerose coronária ou periférica e insuficiência cardíaca. Ainda, a SM está associada com outras complicações sistêmicas que afetam diferentes órgãos, tais como a doença hepática, respiratória, osteoarticular e câncer (ZAMBON et al., 2009).

Embora seja bem aceito que o principal mecanismo patogênico envolvido nas alterações metabólicas de primeiro nível em pacientes com SM seja a resistência à insulina, uma gama de evidências demonstram uma forte ligação entre a SM, um estado crônico de baixa inflamação e estresse oxidativo, como segundo nível de alterações (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). De fato, o estresse oxidativo tem um importante papel na patogênese de alterações vasculares, ativando ou exacerbando os processos bioquímicos acompanhados da SM (STOCKER; KEANEY, 2004).

Em geral, a SM já é caracterizada por um *status* pró-oxidante/pró-inflamatório que predispõe pacientes a maiores eventos cardiovasculares (GALASSETTI, 2012). Estudos apontam que a hiperuricemia e dislipidemia aterogênica contribuem do aumento da pressão arterial a resistência à insulina (BRUNZELL; AYYOBI, 2003; HEINIG; JOHNSON, 2006; ROBINS et al., 2003).

Dados epidemiológicos existentes quanto à prevalência da SM, apontam sua ocorrência em diferentes grupos étnicos e populações de diversos países. Pesquisas indicam

que a prevalência da SM é estimada entre 20 a 25% da população geral, com comportamento crescente nas últimas décadas (DUNSTAN et al., 2002). Entre populações há uma variação de prevalência de 12,4% a 28,5% em homens e 10,7 a 40,5% em mulheres, dependendo do critério utilizado e da característica populacional (AGUILAR-SALINAS et al., 2004; FORD; GILES; DIETZ, 2002; MOHAN et al., 2001). Esta prevalência é ainda maior entre homens e mulheres com idades avançadas, chegando a 42% entre indivíduos com idade superior a 60 anos (FORD; GILES; DIETZ, 2002).

Entretanto, investigações constataram que a prevalência da SM se elevou na população mais jovem há uma década, o que deve ser objeto de preocupação social, pois indica agravamento das epidemias de diabetes, hipertensão arterial e eventos cardiovasculares fatais e não fatais nos anos atuais e futuros (SALAROLI et al., 2007).

A SM pode ser estudada em modelos experimentais animais. Há diferentes modelos em ratos, tanto de ocorrência natural como mutação genética para obesidade e outras alterações metabólicas relacionadas à SM humana. Deve-se tomar cuidado na escolha do modelo a ser utilizado para o estudo da SM, analisando o grau com que o animal desenvolve obesidade, hiperlipidemia, resistência à insulina e hipertensão. Embora não exista modelo animal perfeito para doenças humanas, cada um tem atributos específicos que os tornam usuais para estudar os mecanismos da SM, bem como terapias potenciais (ARION et al., 2010).

A SM pode ser induzida por frutose experimentalmente em ratos pela alimentação com alta concentração de frutose na dieta (60%) (HWANG et al., 1987; NAKAGAWA et al., 2006) ou adicionando a frutose na água de beber (10 – 20%) (DAI; MCNEILL, 1995). Diferentes vias de administração podem induzir um consumo variável de frutose e, por sua vez, resultar em manifestações variáveis de componentes da SM. No entanto, ambas as administrações são capazes de induzir hipertensão sistêmica, hiperuricemia e hipertrigliceridemia, sendo modelos muito úteis na pesquisa dos mecanismos da SM e potenciais farmacológicos de compostos (SÁNCHEZ-LOZADA et al., 2007).

Considerando que o ambiente socioeconômico de supernutrição e sedentarismo continuarão a existir, as consequências à saúde são substanciais e podem afetar o bem-estar da espécie humana moderna (FRIEDMAN, 2009). Neste contexto a descrição de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e patológicos que liguem a SM com o estilo de vida e melhorias cotidianas é muito importante.

Dessa forma, tendo em vista o exposto até aqui, este trabalho objetiva avaliar o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida como guabiroba, quanto a sua fitoquímica, e ainda seus efeitos sobre o sistema cardiovascular de rato, já que a mesma é popularmente utilizada no combate e tratamento de diferentes enfermidades.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Analisar a composição fitoquímica e investigar a farmacodinâmica do extrato aquoso das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e ratos com síndrome metabólica induzida por frutose.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a composição de fenólicos totais e flavonoides do extrato aquoso;
- Identificar componentes presentes no extrato aquoso;
- Avaliar parâmetros hemodinâmicos de ratos normotensos com administração aguda de extrato;
- Investigar o mecanismo de ação do possível efeito hipotensor do extrato em ratos normotensos;
- Avaliar a interação entre o AT1R e constituintes do extrato;
- Determinar a atividade específica da ATPase miosínica cardíaca em ratos com síndrome metabólica induzida por frutose e tratados com o extrato;
- Quantificar a expressão de genes marcadores cardíacos em ratos com síndrome metabólica induzida por frutose e tratados com o extrato.

4. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estão 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) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Unipampa, CEUA 017/2014.

4.1. Material botânico

As coletas das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* foram feitas no município de Uruguaiana/RS, latitude -29.7495, longitude -57.0882, 29°44'58" sul 57°5'18" oeste, em Julho e Outubro de 2014. O material foi identificado e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel.

Para preparação do extrato as folhas ainda frescas foram submetidas a uma lavagem com solução de hipoclorito a 0,4% por 1 hora, logo após nova lavagem em água corrente por 15 minutos, secas em estufa a 37°C por aproximadamente 72 horas, até atingir peso constante, mantendo umidade inferior a 10% (KLAFKE et al., 2010). Depois de trituradas em moinho de facas, transformando em pó, o extrato aquoso foi preparado através de infusão por 10 minutos, e posteriormente resfriado, filtrado e liofilizado (VINAGRE et al., 2010).

4.2. Análises fitoquímicas

4.2.1. Determinação de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais no extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* foi determinado através de método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL das amostras, misturados a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e acrescentados 6 mL de água, agitando-se e deixando-se em repouso por 1 min. Após, foram adicionados 500 µL de carbonato de sódio a 15% e o restante de volume (10

mL) completado com água. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Então, foram realizadas as leituras em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 Perkin Elmer® (Norwalk, CT, USA) no comprimento de onda de 750 nm.

Para a determinação dos resultados foi construída uma curva padrão de ácido gálico, na qual foram utilizadas as concentrações de 2, 4, 6 e 8 µg/mL. Aliquotas de 50 µL dessas soluções foram submetidas ao protocolo descrito acima e os resultados foram expressos em mgEAG/mL de extrato, utilizando a média de três determinações.

4.2.2. Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando o protocolo descrito por Chang et al. (2002) que baseia-se em metodologia colorimétrica. Em balão volumétrico de 25 mL foram transferidos 500 µL da amostra e completado o volume com água (solvente correspondente). Na sequência, adicionou-se 500 µL do reagente de cloreto de alumínio 0,5%. As amostras foram então deixadas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada leitura em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 Perkin Elmer® (Norwalk, CT, USA) em comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos em mg/g de droga vegetal seca, para equivalentes de rutina.

4.2.3. Análises cromatográficas

A composição química do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* foi avaliada em ensaios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento Cromatógrafo Líquido Prominence Shimadzu® (Kioto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C18, de fase reversa, Hypersil C18 Thermo-Scientific (250 x 4,0 mm, 5 µm). Diferentes sistemas cromatográficos foram testados verificando a melhor separação dos constituintes químicos na amostra, conforme tabela a seguir.

Tabela 1 – Sistemas cromatográficos testados para análise cromatográfica

Modo de eluição	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteccção (nm)	Referência
Gradiente	Metanol + Água + Acetonitrila	1,0	50	280 e 340	KATAOKA; CARDOSO (2013)
Gradiente	Acetonitrila + Ácido fórmico 1%	1,0	20	280 e 340	BORGES et al. (2010)
Gradiente	Metanol + Ácido acético 85% e acetonitrila 15%	1,5	20	280 e 340	YESIL-CELIK TAS et al. (2007)
Gradiente	Acetonitrila e água (4:1) + ácido fórmico	1,0	20	280 e 340	YANG et al. (2012)
Gradiente	Acetronitrile 5% + Acetonitrila 50% e ácido fosfórico 0,5%	1,0	10	280 e 340	YANG et al. (2007)
Gradiente	Acetonitrila 5% + Acetonitrila 50% e ácido fosfórico 0,5%	1,0	40	280 e 340	YANG et al. (2007) adaptado

O método escolhido foi adaptado de Yang et al. (2007), programando o gradiente da seguinte forma: solvente A 90% e solvente B 10% durante os primeiros 14 minutos, solvente B aumentando linearmente para 15% até os 20 minutos, e esta condição foi mantida por 4 minutos. Solvente B aumentando linearmente até 70% dos 24 aos 40 minutos e esta condição foi mantida por mais 4 minutos.

Para identificar e sugerir a presença de componentes no extrato de folha de *C. xanthocarpa* os tempos de retenção de pico foram estudados e foi feita uma comparação completa entre amostras e referências padrão. Os compostos padrão utilizados foram: ácido

gálico (200 µg / mL), ácido clorogênico (200 µg / mL), quercetina (200 µg / mL), luteolina (100 µg / mL), isoquercetina (100 µg / mL), quercitrina (100 Mg / mL), teobromina (35 µg / mL), ácido cafeico (35 µg / mL) e cafeína (35 µg / mL), preparado com etanol a 50% (v / v). Exemplos de amostras e referências foram analisados em triplicado.

4.3. Parâmetros hemodinâmicos

Para a realização desses protocolos, ratos Wistar machos foram anestesiados com uretana (1,4 g/kg, i.p.) e submetidos à cirurgia de cateterização da artéria carótida para medidas hemodinâmicas; e da veia jugular, para administração do extrato e fármacos. Para a cateterização foi utilizado um catéter de polietileno (PE 10 – Clay-Adams) preenchido com heparina U/L. O cateter da artéria carótida foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um conversor analógico-digital (Biopac Systems MP150, Inc.; CA).

4.3.1. Curva de doses do extrato

Após 30 minutos de estabilização no equipamento, para avaliar o efeito do extrato sobre os parâmetros hemodinâmicos, uma curva de doses do extrato foi realizada. Foram administradas as doses de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg/kg do extrato em um volume de 0,2 mL de salina (n = 8) com intervalos de 15 minutos. As medidas de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram registradas constantemente enquanto os animais estavam no equipamento e foram gravadas em software Biopac para análise off-line.

4.3.2. Possíveis mecanismos de ação do extrato

Para investigar os mecanismos envolvidos no possível efeito hipotensor do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* alguns fármacos foram administrados após 30 minutos de estabilização, são elas:

- N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), um inibidor da síntese de óxido nítrico, na dose de 30 mg/kg, n = 8 (CHASWAL et al., 2011);
- Losartana, antagonista do receptor AT1 da angiotensina II, na dose de 10 mg/kg, n = 8 (COLLISTER; HORNFELDT; OSBORN, 1996);
- Hexametônio, um bloqueador ganglionar, na dose de 20 mg/kg, n = 8 (BIANCARDI et al., 2007);

Após administração dos fármacos, uma nova estabilização foi realizada e o extrato foi administrado nas doses de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 e 100 mg/kg utilizando 0,2 mL de salina como veículo em intervalos de 15 minutos, com exceção do protocolo do L-NAME, para o qual foram usadas doses de 5 a 25 mg/kg, pois 50mg/kg do extrato após a administração da droga causava uma rápida queda na pressão arterial induzindo a morte de alguns animais. As medidas de PAS, PAD e FC foram registradas constantemente e gravadas em software específico.

4.4. Tratamento prolongado

4.4.1. Animais

Os ratos Wistar (*Rattus norvegicus*; Classe Mammalia) com 60 dias de idade foram adquiridos do biotério da Universidade Federal de Santa Maria, e mantidos em gaiolas apropriadas em ambiente controlado, com temperatura entre 20 e 22°C e luz 12 horas diárias, com água (quando não em tratamento específico) e ração à vontade. Foram utilizados 40 ratos machos, para não ter interferências da oscilação hormonal existente em fêmeas, com peso médio de 200 g.

4.4.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos com 10 ratos cada, tratados por 30 dias, sendo esses:

- Grupo Controle: receberam gavagem diária de 0,8mL de água;

- Grupo Frutose: receberam frutose 30% na água de beber e gavagem diária de 0,8mL água;
- Grupo Extrato: receberam extrato diariamente por gavagem na concentração de 500 mg/Kg diluído em 0,8mL de água;
- Grupo Extrato+Frutose: receberam frutose 30% na água e extrato diariamente por gavagem.

A dose do extrato escolhida para este experimento foi baseada em avaliações prévias em que foram testadas doses de 100 a 5000 mg/Kg e nenhum efeito toxicológico foi observado, sendo assim, optou-se por utilizar 10% da maior dosagem testada. Além disso, existe um estudo com *C. xanthocarpa* que utiliza a dose de 500 mg/Kg em cápsulas para pacientes hipercolesterolêmicos que obteve bons resultados (KLAFKE et al. 2010).

Após o tratamento os ratos foram anestesiados com xilazina (0,65 mg/Kg) e cetamina (1,3 mg/Kg) e submetidos ao procedimento de toracotomia para retirada do coração e separação das porções dos ventrículos esquerdos que seriam usadas para os protocolos de avaliação da atividade da ATPase e expressão gênica.

4.5. Avaliação da atividade específica da ATPase miosínica

4.5.1. 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 0,6 M 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, aliquotado e estocado a -80 °C até o ensaio da atividade.

4.5.2. 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 CaCl₂; 0,6 M KCl; 1 mM de ATP em um volume final de 200 µL (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%. Aliquotas de 100 µL foram retiradas, diluídas em água (volume final 400 µL) para a determinação do fosfato liberado. O produto final medido na reação foi o fosfato inorgânico (Pi), pelo método de Chan; Delfert; Junger, (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 Pi/min/mg). A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976) usando albumina bovina (1mg/mL) como padrão.

4.6. Expressão gênica de marcadores cardíacos

A expressão gênica relativa de α -MHC, β -MHC, α -actina esquelética e fator natriurético atrial (ANF) no ventrículo esquerdo (VE) foi analisada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) como marcadores cardíacos.

4.6.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total 0,1g de VE foi homogeneizado em 1mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e a extração seguida conforme instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em

água tratada com dicarbonato de etila (DEPC). A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA).

A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 mVolts por aproximadamente 20 minutos. A quantidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas.

4.6.2. Síntese de cDNA

cDNA foi sintetizado utilizando 2 mg de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42°C com 0.5 µg/mL de oligo dT (12-18 bp) e a 65°C por 5 minutos para obter a primeira banda de cDNA.

4.6.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para expressão do mRNA

A transcriptase reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20µL contendo 3U de RNAsin (Promega, USA), 10mM dNTP, 0.1M DTT, 1X tampão da enzima, e 2.5U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies, USA) por um período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras colocadas rapidamente no gelo. As reações de *real-time* PCR foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento *ABI 7700* (*Applied-Biosystems, USA*) e com o composto fluorescente *SYBR-Green I*, conforme instruções do fabricante.

Os *primers* foram desenhados usando o programa de software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), conforme segue:

α-MHC

sense: 5'-CgA gTC CCA ggT CAA CAA g-3',

antisense: 3'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC C-5';

β -MHC

sense: 5'-CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3',

antisense: 3'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-5';

ANF

sense: 5'- CTT Cgg ggg TAg gAT TgA C-3',

antisense: 3'-CTT ggg ATC TTT TgC gAT CT-5';

α -actina esquelética

sense: 5'-ACC ACA ggC ATT gTT CTg gA-3',

antisense: 3'-TAA ggT AgT CAg TgA ggT CC-5';

A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da ciclofilina (DCT). A expressão gênica foi calculada usando as diferenças em valores de DCT entre as amostras (DDCT) e a equação 2-DDCT.

4.7. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para comparar os valores dos grupos e teste *post hoc* de Tukey foi aplicado para avaliar as diferenças. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão no formato de artigos, sendo que o primeiro já foi publicado na revista Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine e o segundo trata-se de um manuscrito em vias de publicação.

5.1. Chemical composition and hypotensive effect of Campomanesia xanthocarpa (anexado à tese conforme publicação)

5.2. Campomanesia xanthocarpa prevents hypertension and improves contractility for maintaining alpha-MHC isoform in rats with metabolic syndrome

OBS: O artigo nominado acima possui dados produzidos tanto no doutorado quanto no mestrado da autora, fazem parte desta tese os resultados de ATPase miosínica e as expressões gênicas.

A formatação do artigo está de acordo com o Manual de Normalização para Artigos Científicos da Unipampa 2016.

***Campomanesia xanthocarpa* prevents hypertension and improves contractility for maintaining alpha-MHC isoform in rats with metabolic syndrome**

Liane Santariano Sant'Anna¹; Karolina Torres Santos¹; Patrícia Adriana Carvalho Bressa¹; Luis Armando Candido Tietbohl²; Dalton Valentin Vassalo³; Tiago Fernandes⁴; Edilamar Menezes de Olivera⁴; Cleci Menezes Moreira^{1*}.

¹*Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585, Uruguaiana, RS, Brazil.*

²*Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Mario Viana, 523, CEP 24241-000, Niterói, RJ, Brazil.*

³*Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo Vitória, Av. Fernando Ferrari, 514 CEP 29075-910, Vitória, ES, Brazil.*

⁴*Laboratório de Bioquímica, Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano, Escola de Educação Física da USP, São Paulo, SP, Brazil.*

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Brazil, and are strongly associated with metabolic disorders such as metabolic syndrome. Metabolic syndrome is characterised by the co-occurrence of cardiovascular risk factors such as hypertension, hyperinsulinaemia, glucose intolerance, central obesity and dyslipidaemia. *Campomanesia xanthocarpa* has been used empirically as tea because of its potential benefits in reducing blood cholesterol levels, and in several conditions including inflammatory, renal, and digestive diseases. We evaluated the effects of *C. xanthocarpa* on hemodynamics, cardiac contractility and gene expression of indicators of cardiac injury in rats with metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet. Animals were treated for 30 days with an infusion of aqueous extract of the leaves. Blood pressure was assessed by direct measurement of carotid artery and contractility was assayed by measurement of isometric force generation of left ventricle papillary muscles. Gene expression of α -MHC, β -MHC, atrial natriuretic factor and skeletal α -actin was evaluated by real-time PCR. Blood levels of glucose, cholesterol, triglycerides, AST, ALT, urea and creatinine were also assessed using commercial kits. The extract was able to prevent the hypertension and tachycardia caused by fructose and produced positive inotropism. It also decreased the levels of triglycerides and increased HDL-cholesterol, without causing any toxicity or renal or hepatic impairment. The coadministration of fructose and extract increased the myosin ATPase activity and maintained the expression of all genes studied similar to control, preventing the reexpression of fetal genes as it happens in the fructose administration. So the administration of *Campomanesia xanthocarpa* extract in individuals with metabolic syndrome can bring health benefits especially on cardiac function.

Keywords: *Campomanesia xanthocarpa*. metabolic syndrome. Hypertension. alfa-myosin. beta-myosin.

INTRODUCTION

According to the Brazilian Society of Cardiology, in 2016 approximately 340.000 persons died of cardiovascular diseases in Brazil. Cardiovascular disease, including hypertension, remains a major cause of morbidity and mortality around the world (Panchal; Brown, 2013). Current evidence suggests that metabolic disorders are strongly associated with cardiovascular diseases as aggravating factors. Metabolic syndrome (MS) is described as the association of hypertension, dyslipidaemia and hyperinsulinemia with hypertriglyceridemia, whose common characteristic is the resistance to insulin action (Timar et al., 2000). Its worldwide prevalence is uncertain, but it is estimated that about 20% to 25% of the general population have this metabolic disorder (Ford et al., 2002).

Dietary nutrients are linked to metabolic syndrome. It has been suggested that the consumption of fructose in the diet is an environmental factor that contributes to the development of obesity and the abnormalities associated with metabolic syndrome. It is known that high consumption of fructose leads to hypertension, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and insulin resistance in rats. Fructose is able to produce these effects because it is more lipogenic than glucose and usually causes severe elevations of triglyceride in skeletal muscle, resulting in insulin resistance (Elliot et al., 2002).

Campomanesia xanthocarpa, popularly known as guabiroba, is a medicinal plant and native food, found in Rio Grande do Sul, Brazil. It has been empirically used to reduce blood cholesterol levels (confirmed by Klafke et al., 2010; in a study with hypercholesterolemic patients) but also for diseases of the urinary tract, and as an anti-diarrheal and anti-inflammatory (Alice et al., 1995). Other scientific reports have shown the effect of guabiroba in weight loss, its antiplatelet activity, its effectiveness against diabetes and ulcer (Dickel et al., 2007; Klafke et al., 2012; Vinagre et al., 2010; Markman et al., 2004). We also showed the hypotensive effect of the aqueous extract, suggesting that the mechanism may be mediated through the renin-angiotensin system by the AT1 receptor blockade and sympathetic autonomic response (Sant'Anna et al., 2017).

We previously reported the presence of chlorogenic acid, gallic acid, quercetin and theobromine in the aqueous extract of *C. xanthocarpa*, compounds known to have many pharmacological activities, including for treatment of cardiovascular diseases that can be related to its many uses (Sant'Anna et al., 2017). Although there are many popular usage of *C. xanthocarpa*, there is very little scientific information available about the plant. Since its

consumption is reported in the prevention of diseases that may trigger cardiovascular alterations as high cholesterol levels, obesity, diabetes, among others, this study evaluated the possible effects of *C. xanthocarpa* on the cardiovascular system, assessing hemodynamics parameters, cardiac contractility and gene expression of indicators of cardiac injury.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) 60 days old were purchased at the animal house of the Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brazil) and kept in appropriate cages in a controlled environment with a temperature between 20 and 22 °C and light for 12 hours per day with water (when not in treatment) and feed *ad libitum*. All procedures performed in this study were in agreement with the International Principles for Research involving Animals (Geneva), and Brazilian Law No. 11.794/2008 (Procedures for scientific use of animals) and Decree 24.645/34 (Animal Rights) approved by the Ethics Committee on Animal Use of Universidade Federal do Pampa, under No. 017/2014.

Botanical material: Leaves of *Campomanesia xanthocarpa* were collected in Uruguaiana/RS, in October 2014. The botanical identification was performed at the UNIPAMPA, Campus São Gabriel, and a specimen was deposited in its herbarium.

For preparation of the extract, fresh leaves were washed under running water for 15 minutes, then washed with hypochlorite solution at 0.4% for 1 h, and dried at 37 °C for approximately 72 h at a humidity below 10%, until constant weight was achieved (Klafke et al., 2010). After trituration of the leaves to make a powder, the aqueous extract was prepared by infusion for 10 minutes then cooled, filtered and dried at 40 °C (Vinagre et al., 2010).

C. xanthocarpa leaves present a relevant content of phenols and flavonoids, and we suggested the presence of chlorogenic acid, gallic acid, quercetin and theobromine, compounds that can contribute to its pharmacological effects (Sant'Anna et al., 2017).

Experimental groups: Animals were treated for 30 days and divided into groups of eight rats each:

Control group — received food and water freely;

Extract group — received the extract daily by gavage (500 mg/Kg);

Fructose group — received 30% fructose in drinking water;

Extract+Fructose (E+F) group — received fructose and extract.

Hemodynamics: To evaluate blood pressure changes, animals were first anaesthetised with ketamine (80 mg/kg *ip*) and xylazine (10 mg/kg *ip*), the right carotid artery was catheterised,

the catheter (PE 10) connected to a pressure transducer (MP150 Biopac Systems, Inc., CA), systolic and diastolic blood pressure, and heart rate were measured.

Biochemistry: After hemodynamic evaluation, blood was collected for determination of serum glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL, creatinine, urea, AST (aspartate aminotransaminase) and ALT (alanine aminotransaminase) using spectrophotometric methods for enzymatic assays included in the Labtest kit®. The HDL-cholesterol was separated by precipitation of other fractions.

Myocardial contractility: The hearts were quickly removed and perfused via the aortic stump to allow a proper selection and dissection of the left ventricular papillary muscles. The preparations were mounted in a plexiglass chamber with a volume of 20 mL, containing Krebs-Henseleit solution, comprising 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂.6H₂O, 1.25 mM CaCl₂.2H₂O, 2 mM NaH₂PO₄.H₂O, 1.2 mM Na₂SO₄, 27mM NaHCO₃ and 11 mM glucose. To avoid the possibility of hypoxia, the experiments were performed at low temperature (29 ± 1 °C) as previously described (Vassallo et al., 1994) and continually gassed with a carbogenic mixture containing 95% O₂ and 5% CO₂, keeping the pH stable at 7.4.

The papillary muscles were stretched to L_{max} (the length of muscle at which the active tension is at a maximum) and stimulated with rectangular pulses (10 to 15 V, 12 ms duration) through a pair of platinum electrodes positioned along the entire muscle length with a standard stimulation frequency of 0.5 Hz (steady-state). The preparations were maintained for a stabilisation period of 60 minutes. The force developed was normalised by muscle weight (g/mg of muscle) and measured by an isometric force transducer (TSD125-Biopac Systems, Inc., CA) coupled to an amplifier (DA100C Biopac Systems, Inc., CA) and recorded by a data acquisition system (MP100 Biopac Systems, Inc., CA) connected to a microcomputer.

We analysed the following parameters: isometric force peak; activation time; relaxation time; relative potentiation (PPP) obtained after pauses of 15, 30 and 60 s; inotropic effect to Ca²⁺ (0.62, 1.25, 2.5 and 3.75 mM CaCl₂); rest contractions after pauses of 10 min (PRC) and tetanic contractions stimulated at 10 Hz.

Myosin ATPase activity: Myosin extraction of the heart was performed with high ionic strength centrifugation according to Bremel; Weber (1975) described in Moreira et al. (2003) and the myosin ATPase activity measurement was quantified by the inorganic phosphate released through a colorimetric method and expressed in nmolPi/min/mg of protein (Chan; Delfert; Junger, 1986).

Gene expression: relative gene expression to α -MHC, β -MHC, α -actin skeletal and atrial natriuretic factor (ANF) on left ventricle were analysed by polymerase chain reaction in real time (real-time PCR). Total RNA was extracted in 1 mL of trizol (Invitrogen Life Technologies, USA) as manufacturer instructions. The integrity of the sample was verified by gel electrophoresis 1% agarose containing 0.5 mg/mL of ethidium bromide for 40 min at 100 mV and evaluated by intensity of the ribosomal RNA bands 28S and 18S. After cDNA synthesis was performed with 2 mg of total RNA. The samples were incubated for one hour at 42°C with 0.5 μ g/mL oligo dT (12-18 bp) and at 65°C for 5 minutes to obtain the first cDNA strand. Reverse transcription of the samples was performed in a total volume of 20 μ L containing 3U RNAsin (Promega, USA), 10mM dNTP, 0.1M DTT, 1X enzyme buffer, and 2.5 U of SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, USA) for a period of 1 h at 42°C; subsequently the temperature was raised to 95°C for 5 min and the samples placed on ice rapidly. The real-time PCR reactions were performed by specific product detection system amplified ABI 7700 equipment (Applied-Biosystems, USA) and with SYBR-Green I compound fluorescent, as manufacture instructions (Hashimoto et al., 2011).

The primers were design using the program Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), as followed:

α -MHC

sense: 5'-CgA gTC CCA ggT CAA CAA g-3',

antisense: 3'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC C-5';

β -MHC

sense: 5'-CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3',

antisense: 3'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-5';

ANF

sense: 5'- CTT Cgg ggg TAg gAT TgA C-3',

antisense: 3'-CTT ggg ATC TTT TgC gAT CT-5';

α -actin skeletal

sense: 5'-ACC ACA ggC ATT gTT CTg gA-3',

antisense: 3'-TAA ggT AgT CAg TgA ggT CC-5';

The relative expression of the genes studied was normalized by the expression of cyclophilin gene (DCT). Gene expression was calculated using the DCT differences in values between the samples (DDCT) and 2-DDCT equation.

Statistical analysis: Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Two-way ANOVA was used to compare relative potentiation, Ca²⁺ inotropic effects and tetanic contractions, and one-way ANOVA were used for other protocols, with Tukey's post-hoc test to compare means when ANOVA was significant. P values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Biochemical parameters were evaluated to demonstrate the effectiveness of the model for the induction of metabolic syndrome by fructose intake and to evaluate the effects of the aqueous extract of *C. xanthocarpa* on lipid profiles, glycolytic enzymes and liver and kidney metabolites.

Serum glucose and triglyceride levels were significantly increased in the fructose group, while HDL-cholesterol and urea were reduced. The extract group had reduced triglyceride levels compared to the control group. The group that ingested both extract and fructose (extract+fructose) maintained the increased serum glucose caused by fructose intake but the triglycerides remained at values close to controls (Table 1).

Blood pressure measurements showed that the treatment with fructose increased both systolic and diastolic pressures by 20 and 30 mmHg, respectively. The treatment with the aqueous extract of *C. xanthocarpa* administered simultaneously with fructose was able to prevent this increase (Table 2). Regarding the heart rate, the administration of the extract of *C. xanthocarpa* associated with fructose was able to prevent the tachycardia induced by the administration of fructose alone (Table 2).

Treatment with fructose caused a reduction in the isometric force produced by the papillary muscles, while the E + F group presented a double force development compared to the fructose treated group suggesting a potential cardiotoxic effect of the extract in animals with metabolic syndrome (Figure 1-A).

Regarding the contraction kinetics, the rats treated with extract, fructose and E+F all presented activation and relaxation times larger than the control group (Figure 1-B).

The protocol for post-pause potentiation was used to assess a possible effect of the treatment on the function of the sarcoplasmic reticulum. No significant changes were observed, the values obtained at pauses of 15, 30 and 60 seconds were similar among all groups (Figure 1-C).

The post-rest contraction protocol is used to evaluate the permeability of the plasma membrane to Ca^{2+} . No differences in developed force were observed among groups (Figure 1-D).

The Calcium protocol shows that there is an increasing dose-dependent force produced by the papillary muscles, as expected, but the group that received extract and fructose presented a greater force development compared to those who drank only fructose (Figure 1-E).

The effect of the extract on the β -adrenergic responsiveness in cardiac muscle was assessed with isoproterenol (10^{-5} M), a β -adrenergic agonist and there were no significant differences among groups (Figure 1-F).

The effect of treatment with *C. xanthocarpa* on cardiac contractile proteins was assessed indirectly by measuring tetanic contractions induced by an increased frequency of stimulation in the presence of caffeine. A tetanic tension time course shows an increase in strength reaching a peak, followed by a fall towards a plateau. Figure 1-G shows that the contractile strength in the E+F group was doubled relative to control, both at the peak and the plateau of tetanic contraction.

For the biochemical evaluation of the heart's ability to generate contractile force, myosin ATPase activity was determined. The coadministration of fructose and extract increased the myosin ATPase activity (figure 2A).

In order to evaluate the possible injury in the heart caused by the fructose and the effect of the extract on it, the expression of alpha and beta MHC, atrial natriuretic factor (ANF) and alpha-actin skeletal genes were measured. Treatment with fructose caused a decrease in α -MHC levels and increased levels of β -MHC and ANF. On the other hand coadministration of fructose and extract maintained the expression of all genes studied similar to control. Alpha-actin levels had no significant difference among the groups (Figure 2).

DISCUSSION

The results presented here suggest that treatment with the extract of *C. xanthocarpa* could counteract high blood pressure, normalise heart rate, cause positive inotropism, increase myosin ATPase activity and prevent reexpression of fetal MHC isoform in rats with metabolic syndrome. It also decreased serum triglycerides and increased HDL-cholesterol levels. All these results suggest that the extract of *C. xanthocarpa* can be helpful to prevent heart damage.

Fructose consumption has been identified as a risk factor for insulin resistance and heart disease independent of body mass index (Stanhope et al., 2009). Experimental models have shown that a diet high in fructose causes disturbances in metabolic homeostasis and induces systemic insulin resistance, among other symptoms of metabolic syndrome in rodents (Barone et al., 2009; Lee et al., 1994; Mellor et al., 2010; Mellor et al., 2011).

Barros et al. (2007) administered 10% and 20% fructose in water to hamsters for 2 months and obtained an increase of approximately 40% in glucose concentration at both dosages. In animal models, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and insulin resistance have been reported with a diet enriched with fructose (Oron-Herman et al., 2008). In the present work there are some differences regarding those studies. For example the cholesterol levels were not altered although the glucose and triglycerides were increased after 30 days to a greater degree than other authors have found, possibly due to the effect of the higher concentration of fructose on the diet consumed.

Levels of ALT, AST, urea and creatinine were measured to evaluate possible liver and kidney toxicity caused by the extract and damage from the administration of fructose. It can be observed that treatment with fructose only reduced urea values (Table 1). According to Pedersen et al. (2004), in a study on the effect of fructose on the synthesis of urea, 1 mmol/L of fructose in human blood was able to reduce the capacity for synthesis of urea by 3.6 μmol , an effect that was related to the non-insulin dependence of fructose metabolism.

Results of the rat treatment with aqueous extract of *C. xanthocarpa* also showed an anti-hypertensive potential. In 30 days the extract was able to reduce hypertension induced by fructose consumption by 20 mmHg (Table 2). We already shown that the aqueous extract of *C. xanthocarpa* presented a hypotensive action on normotensive rats administered acutely (Sant'Anna et al., 2017). Dimo et al. (2001), studying methanolic and aqueous extracts of *Bidens pilosa* in rats with fructose-induced hypertension, also achieved a normalization of blood pressure values, although in a 6-week treatment. This specie presents a great quantity of flavonoids and a common component of our extract, the chlorogenic acid (Wang et al., 1997; Santos, 2015; Njume et al., 2016). Ayele et al. (2010) working with a model of hypertension in rats with a clipped renal artery, examined the hypotensive effect of extract of *Syzygium guineense*, obtaining a reduction in blood pressure up to 40 mmHg in a single dose. This specie belong to the same family and has high content of flavonoids and phenols as *C. xanthocarpa* (Pieme et al., 2014; Nguyeu et al., 2016).

The evaluation of myocardial contractility can be performed by measuring the isometric force developed by the papillary muscle of the left ventricle of the heart. The amplitude of contraction reflects the amount of force developed by the muscle and the temporal parameters provide information about the kinetics of activation and relaxation of muscle contraction (Vassallo et al., 2008). When myocardial contractility was evaluated in rats that received fructose and aqueous extract of *C. xanthocarpa* the contractile force was significantly increased (Figure 1-A), which may demonstrate a benefit for these animals with fructose-induced metabolic syndrome.

Activation time measures the kinetic processes which increase the amount of the activator Ca^{2+} or affect the myofilament sensitivity to it. Relaxation time measures the kinetic processes that remove Ca^{2+} ions from the myoplasm. In general relaxation time depends on the ability of the sarcoplasmic reticulum (SR) to uptake Ca^{2+} , mainly in rats, in which the SR is responsible for removing approximately 90% of cytoplasmic Ca^{2+} during relaxation (Bers, 2002). Thus, since the extract and fructose treatment may increase activation and relaxation time parameters and tetanic tension (Figure 1-B,G), results suggest that these compounds are affecting myofilament sensitivity and the activity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. However, our results showed no changes in the contraction potentiation for all pauses, suggesting the absence of changes in SR activity (Figure 1-C).

Mellor et al. (2012) evaluated the effect of fructose on Ca^{2+} transients in isolated cardiomyocytes from mice, and they found that the Ca^{2+} transient was lower in cells of the fructose groups than in controls, although the contractile cycle and shortening capacity of these cells were not different, which the authors attributed to a possible compensatory mechanism.

The PCR protocol, caffeine treatment to block the SR activity and exposure to calcium-free solution was used to assess indirectly the influx of Ca^{2+} ions through the sarcolemma. In rat cardiac muscle the reduction of intracellular Ca^{2+} during relaxation is dependent on the transport of Ca^{2+} into intracellular stores and extrusion through the sarcolemma. Caffeine depletes intracellular Ca^{2+} by binding to the ryanodine receptor (Bassani et al., 1992; Bassani et al., 1994; Leite et al., 1995) and exposure to calcium-free solution facilitates Ca^{2+} extrusion through the sarcolemma (Vassallo et al., 2008). Exposure to *C. xanthocarpa* extract and/or fructose caused no decrease in trans-sarcolemmal Ca^{2+} influx measured indirectly by PCR (Figure 1-D).

Ca^{2+} ions play a pivotal role in regulating the phases of contraction and relaxation of cardiac muscle. The increase in the concentration of cytosolic Ca^{2+} ions causes the interaction

of Ca^{2+} with troponin C that also increases and triggers the contractile process. In other words, the greater the quantity of available Ca^{2+} the greater the force of contraction (Libby et al., 2010). It is well known that increases in extracellular Ca^{2+} result in enhanced Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels triggering further Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores within the SR. This in turn leads to a rise of intracellular free Ca^{2+} culminating in myofilament shortening and cell contraction (Bers; Perez-Reyes, 1999). The inotropic response to changes in extracellular Ca^{2+} concentration was measured at Ca^{2+} concentrations varying from 0.62 to 3.75 mM. As expected, increases in extracellular Ca^{2+} resulted in a positive inotropic response in all experimental groups, however the coadministration of fructose and extract caused an increase in force compare with the fructose group (Figure 1-E).

One of the effects produced by myocyte β -adrenergic activation is the phosphorylation of sarcolemmal calcium channels (Bers 2002). Phosphorylation allows the entry of Ca^{2+} ions through these channels and results in the positive inotropic effect clearly seen in the presence of a β -agonist. The papillary muscle force increased in response to the β -agonist, although there was no difference between the groups (Figure 1-F).

The heart muscle has a long action potential (AP). This prevents myocytes undergoing re-stimulation and tetanization. Therefore, tetanus cannot be achieved under normal conditions because the fusion of contractions is impossible. For this reason we used caffeine, which depletes Ca^{2+} ions from RS by binding to the ryanodine receptors (Bassani et al., 1992; Bassani et al., 1994), and increased the frequency of stimulation (10 Hz) to produce maximal activation of the contractile machinery of the papillary muscles (Leite et al., 1995).

In the rat myocardium, tetanic contractions obtained after treatment with caffeine are smaller than contractions in stabilised conditions. This suggests that the activation of the contractile machinery in tetanic contractions is dependent on sarcolemma Ca^{2+} entry and maintenance of contraction is dependent on the sensitivity of contractile proteins to Ca^{2+} (Leite et al. 1995). Only tetanic contractions obtained in preparations of isolated muscles from rats fed for 30 days with *C. xanthocarpa* extract and fructose showed an increase in peak and plateau tension (Figure 1-G).

One of the contractile proteins involved in myocardial contractility is myosin which can be assessed by its ATPase activity and/or expression of its heavy chain isoforms. The role of myosin as an enzyme that converts chemical energy in the form of ATP into mechanical work of muscle contraction is well established and the tension cost correlates with mechanical and biochemical activity (Moreira et al., 2012). In the cardiac ventricles there are three

myosin isozymes (V1, V2 and V3), however, these are composed of only two distinct types of MHCs. The ability of contractile force generation is given largely by MHC isoforms. The α -MHC, which confers the high Ca^{2+} -ATPase activity to the cardiac myosin V1, is associated with increased shortening velocity of the cardiac fibers. In contrast, the β -MHC, which confers the low Ca^{2+} -ATPase activity to the cardiac myosin V3, is associated with hypocontractile states (Lompré et al, 1984).

The myosin composition of the myocardium is of physiological significance since the relative distribution of the two major ventricular Myosin High Chains (MHC), α and β , is in direct correlation with the contractile performance of the heart (Lompré et al., 1984). Besides physiological these genes have pathological importance since during heart diseases changes in its expression might occur, which may be accompanied by reexpression of reprogramming of fetal genes such as alpha-actin skeletal and atrial natriuretic factor (ANF) (Chien et al., 1991).

In small mammals (rabbits and rats) the α -MHC increases immediately before birth and corresponds to the dominant isoform throughout adult life. Therefore, from the molecular point of view there is a downregulation of expression of ventricular β -MHC gene and an upregulation of the α -MHC gene (Oliveira; Krieger, 2002).

Treatment with fructose caused a decrease in α -MHC levels and increased levels of β -MHC and ANF, so it can be suggested from molecular point of view an initial cardiac injury. Already coadministration of fructose and extract maintained the expression of all genes studied similar to control, preventing the reexpression of fetal genes as it happens in the fructose administration. Therefore the administration of *Campomanesia xanthocarpa* extract in metabolic syndrome individuals can bring health benefits especially on cardiac function.

CONCLUSION

The extract of *C. xanthocarpa* was able to prevent high blood pressure, normalise heart rate and cause positive inotropism, probably by increasing the transmembrane Ca^{2+} influx, promoting better interactions between contractile proteins, increasing myosin ATPase activity and for preventing the shift of the MHC isoforms in animals with metabolic syndrome. Biochemical parameters indicate that the extract was also able to normalise the serum levels of triglycerides and increase HDL-cholesterol in rats with metabolic syndrome induced by fructose. In normotensive animals the extract does not alter hemodynamic and cardiac parameters. The aqueous extract of *C. xanthocarpa* was shown to have anti-

hypertensive and cardiogenic activity and may become an alternative herbal treatment for individuals with metabolic syndrome.

REFERENCES

- 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, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- Ayele, Y.; Urga, K.; Engidawork, E. **Evaluation of *in vivo* antihypertensive and *in vitro* vasodepressor activities of the leaf extract of *Syzygium guineense* (Willd) D.C.** Phytotherapy Research, v. 24, p. 1457-1462, 2010.
- Barone, S.; Fussell, S. L.; Singh, A. K.; Lucas, F.; Xu, J.; Kim, C.; Wu, X.; Yu, Y.; Amlal, H.; Seidler, U.; Zuo, J.; Soleimani, M. **Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension.** Journal of Biological Chemistry, v. 284, p.5056-5066, 2009.
- Barreiros, R. C.; Bossolan, G.; Trindade, C. R. P. **Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados.** Revista de Nutrição, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.
- Barros, C. M. M. R.; Lessa, R. Q.; Grechi, M. P.; Mouço, T. L. M.; Souza, M. G. C.; Wiernsperger, N.; Bouskela, E. **Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters.** Clinics, v. 62, n. 3, p. 327-334, 2007.
- 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, n. 6868, p. 198-205, 2002.

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, n. 2, p. 339-360, 1999.

Biavatti, M. W.; Farias, C.; Curtius, F.; Brasil, L. M.; Hort, S.; Schuster, L.; Leite, S. N.; Prado, S. R. T. **Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters.** Journal of Ethnopharmacology, v. 93, n. 2, p. 385-389, 2004.

Bremel, R. D.; Weber, A. **Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 376, p. 366-374, 1975.

Chan, K.; Delfert, D.; Junger, K. D. **A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity.** Analytical Biochemistry, v. 157, p. 375-380, 1986.

Chien, K. R.; Knowlton, K. U.; Zhu, H.; Chien, S. **Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response.** The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB Journal), v. 5, n. 15, p. 3037-46, 1991.

Consolini, A. E.; Sarubbio, M. G. **Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart.** Journal of Ethnopharmacology, v. 81, p. 57-63, 2002.

Dickel, M. L.; Rates, S. M. K.; Ritter, M. R. **Plants popularly used for losing weight purposes in POA, South Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 60-71, 2007.

Dimo, T.; Azay, J.; Tan, P. V.; Pellecier, J.; Cros, G.; Bopelet, M.; Serrano, J. J. **Effects of the aqueous and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* leaf on fructose-hypertensive rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 76, n. 3, p. 215-221, 2001.

Elliot, S. S.; Keim, N. L.; Stern, J. S.; Teff, K.; Havel, P. J. **Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome.** American Journal of Clinical Nutrition, v. 76, p. 911-922, 2002.

Ford, E. S.; Giles, W. H.; Dietz, W. H. **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.** Journal of American Medical Association, v. 287, n. 3, p. 356-359, 2002.

Klafke, J. Z.; Silva, M. A.; Panigas, T. F.; Belli, K. C.; Oliveira, M. F.; Barichello, M. M.; Rigo, F. K.; Rossato, M. F.; Santos, A. R. S.; Pizzolatti, M. G.; Ferreira, J.; Viécili, P. R. N. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 299-305, 2010.

Klafke, J. Z.; Arnoldi da Silva, M. F.; Rossato, M.; Trevisan, G.; Banderó, W. C. I.; Martins, L. C. A.; Olschowsky, B. D.; Chitolina, S. M. R.; Noal, M. R.; Medeiros, F. D. M. M.; Soares Dos Santos, A. R.; Nazário, V. P. R.; Ferreira, J. **Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*.** *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, v. 2012, 8 pages, 2012.

Lee, M. K.; Miles, P. D.; Khoursheed, M.; Gao, K. M.; Moossa, A. R.; Olefsky, J. M.; **Metabolic effects of troglitazone on fructose-induced insulin resistance in the rat.** *Diabetes*, v. 43, p. 1435-1439, 1994.

Leite, C. M.; Vassallo, D. V.; Mill, J. G. **Characteristics of titanic contractions in caffeine-treated rat myocardium.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 73, p. 638-643, 1995.

Libby, P.; Bonow, P. O.; Mann, D. L.; Zipes, D. P. **Tratado de doenças cardiovasculares.** Elsevier, RJ, 8^a ed., 2v, 2010.

Lompré, A.; Nadal-Ginaarndd, B.; Mahdavit, V. **Expression of the Cardiac Ventricular CY- and Myosin Heavy Chain Genes Is Developmentally and Hormonally Regulated.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n. 10, p. 6437-6446, 1984.

Majewska-Wierzbicka, M.; Czczot, H. **Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases.** *Polski Merkurusz Lekarski*, v. 32, n. 187, p. 50-54, 2012.

Markman, B. E. O.; Bacchi, E. M.; Kato, E. T. M. **Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 55-57, 2004.

Mellor, K. M.; Ritchie, R. H.; Davidoff, A. J.; Delbridge, L. M. D. **Elevated dietary sugar and the heart: experimental models and myocardial remodeling.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 88, p. 525-540, 2010.

Mellor, K. M.; Bell, J. R.; Young, M. J.; Ritchie, R. H.; Delbridge, L. M. **Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance**

in fructose-fed mice. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, v. 50, p. 1035-1043, 2011.

Mellor, K. M.; Wendt, I. R.; Ritchie, R. H.; Delbridge, L. M. D. **Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca²⁺ handling and myofilament responsiveness.** American Journal of Physiology – Heart and Circulatory physiology, v. 302, p. 964-972, 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 - Molecular & Integrative Physiology, v. 135, p. 269-275, 2003.

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.

Moura, R. F.; Ribeiro, C.; Oliveira, J. A.; Stevanato, E.; Mello, M. A. R. **Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high fructose ingestion protocols.** British Journal of Nutrition, v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.

Nguyen, T. L.; Rusten, A.; Bugge, M. S.; Malterud, K. E.; Diallo, D.; Paulsen, B. S.; Wangensteen, H. **Flavonoids, gallotannins and ellagitannins in *Syzygium guineense* and the traditional use among Malian healers.** Journal of Ethnopharmacology, v. 4, n. 192, p. 450-458, 2016.

Nie, P.; Zhang, L.; Zhang, W.; Rong, W.; Zhi, J. **The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function.** Journal of Ethnopharmacology, v. 139, p. 746-750, 2012.

Njume, C.; Gqaza, B. M.; Rozani, C.; Goduka, N. I. **Studies on bioactivity and secondary metabolites of crude extracts of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): A medicinal plant used in the Transkei region of South Africa.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Science, v. 29, n. 3, p. 877-85, 2016.

Oliveira, E. M.; Krieger, J. E. **Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: aspectos moleculares,** Hipertensão, v. 5, n. 2, 2002.

Oron-Herman, M.; Kamari, Y.; Grossman, E.; Yeger, G.; Peleg, E.; Shabtay, Z.; Shamiss, A.; Sharabi, Y. **Metabolic Syndrome: Comparison of the two commonly used animal models.** American Journal of Hypertension, v. 21, n. 9, p. 1018-1022, 2008.

Panchal, S. K.; Brown, L. **Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats.** European Journal of Nutrition, v. 52, p. 397-408, 2013.

Pedersen, J. H.; Alnor, D.; Vilstrup, H.; Hansen, B. A. **Effect of fructose on the capacity of urea-N synthesis in rats.** Clinical Nutrition, v. 13, n. 4, p. 243-246, 2004.

Pieme, A.; Ngoupayo, J.; Nkoulou, C. H. K.; Moukette, B. M.; Nono, B. L. N.; Moor, V. J. A.; Minkande, J. Z.; Ngogang, J. Y. ***Syzygium guineense* extracts show antioxidant activities and beneficial activities on oxidative stress induced by ferric chloride in the liver homogenate constant.** Antioxidants, v. 3, p. 618-635, 2014.

Sant'Anna, L. S.; Merlugo, L.; Ehle, C. S.; Limberger, J.; Fernandes, M. B.; Santos, M. C.; Mendez, A. S. L.; Paula, F. R.; Moreira, C. M. **Chemical Composition and Hypotensive effect of *Campomanesia xanthocarpa*.** Evidence-based complementary and alternative medicine, v. 2017, 11 pages, 2017.

Santos, D. D. dos. **Controle de qualidade, análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Bidens pilosa* Linnaeus (Asteraceae).** 98 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2015.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Available in <<http://www.cardiometro.com.br/calculo.asp>>; accessed on 27/04/2017 at 14:45, 2017.

Stanhope, K. L.; Schwarz, J. M.; Keim, N. L.; Griffen, S. C.; Bremer, A. A.; Graham, J. L.; Hatcher, B.; Cox, C. L.; Dyachenko, A.; Zhang, W.; McGahan, J. P.; Seibert, A.; Krauss, R. M.; Chiu, S.; Schaefer, E. J.; Ai, M.; Otokozawa, S.; Nakajima, K.; Nakano, T.; Beysen, C.; Hellerstein, M. K.; Berglund, L.; Havel, P. J. **Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans.** Journal of Clinical Investigation, v. 119, p. 1322-1334, 2009.

Tabassum, N.; Ahmad, F. **Role of natural herbs in the treatment of hypertension.** Pharmacognosy Reviews, v. 5, n. 9, p. 30-40, 2011.

Timar, O.; Sestier, F.; Levy, E. **Metabolic syndrome X: a review.** Canadian Journal of Cardiology, v. 25, n. 5, p. 829-834, 2000.

Vassallo, D. V.; Lima, E. Q.; Campagnaro, P.; Stefanon, I.; Leite, C. M.; Mill, J. G. **Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat rates in various calcium concentrations.** *Pharmacology Research*, v. 29, p. 251-260, 1994.

Vassallo, D. V.; Oliveira, E. M.; Stefanon, I. **Contratilidade Miocárdica.** In: Aires, MM (Ed.), *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 435-469, 2008.

Vinagre, A. S.; Rönnau, A. D. R. O.; Pereira, S. F.; Silveira, L. U.; Wiiland, E. de F.; Suyenaga, E. S. **Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

Wang, J.; Yang, H.; Lin, Z. W.; Sun, H. D. **Flavonoids from *Bidens pilosa* var. *radiata*.** *Phytochemistry*, v. 46, n.7, p.1275-1278, 1997.

TABLE 1. Biochemical parameters analysed after 30 days of treatment.

Parameters	Groups			
	Control	Extract	Fructose	Extract+Fructose
Glucose (mg/dL)	129.2±18.31	147.6±6.43	275.3±57.86*§	221.7±30.89*§
Total Cholesterol (mg/dL)	84.6±10.56	101.4±24.79	91.9±24.17	88.9±9.41
HDL-Cholesterol (mg/dL)	33.5±3.88	47.9±9.99*	27.3±4.88§	41.0±4.91#
Triglycerides (mg/dL)	44.6±29.37	23.0±4.23	335.2±163.39*§	68.6±25.19#
AST (U/L)	127.1±37.7	161.3±2.72	136.9±61.79	132.3±27.83
ALT (U/L)	67.5±36.67	79.2±21.65	70.9±27.58	99.0±22.76
Urea (mg/dL)	74.3±10.76	73.6±16.59	46.4±6.26*	68.8±15.52
Creatinine (mg/dL)	1.36±1.32	1.02±0.07	0.48±0.17	0.73±0.06

Results are expressed as mean ± SD. *p<0.05 vs Control; §p<0.05 vs Extract and #p<0.05 vs Fructose. N = 4.

TABLE 2. Blood pressure and heart rate of rats analysed after 30 days of treatment.

Parameters	Groups			
	Control	Extract	Fructose	Extract+Fructose
Systolic blood pressure (mmHg)	111.96±6.56	110.91±7.22	141.21±6.77*§	100.55±10.84#
Diastolic blood pressure (mmHg)	75.61±8.05	77.47±9.14	103.03±20.66*§	68.46±11.12#
Heart rate (bpm)	355.95±24.34	342.42±45.25	400.89±60.26§	361.2±28.83

Results are expressed as mean ± SD. *p<0.05 vs Control; §p<0.05 vs Extract and #p<0.05 vs Fructose. N = 8.

Figure 1. Myocardial contractility parameters of rat papillary muscles after 30 days of treatment. A) Isometric force; B) Activation and relaxation time; C) Potentiation pos-pause; D) Post-rest contraction; E) Calcium concentration curve; F) β -adrenergic protocol; G) Tetanic contractions. Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs Control; $\S p < 0.05$ vs Extract and # $p < 0.05$ vs Fructose. N = 8.

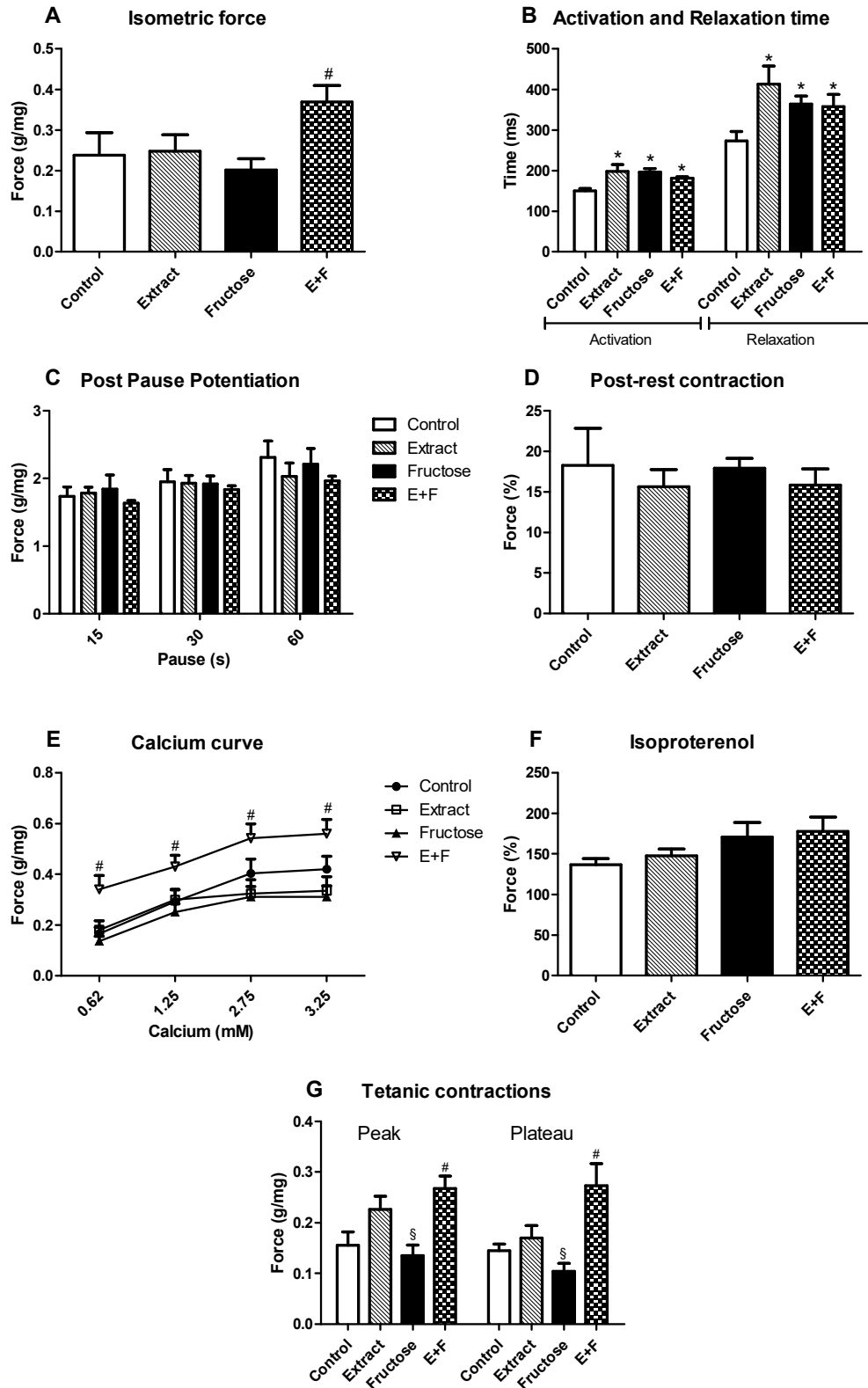
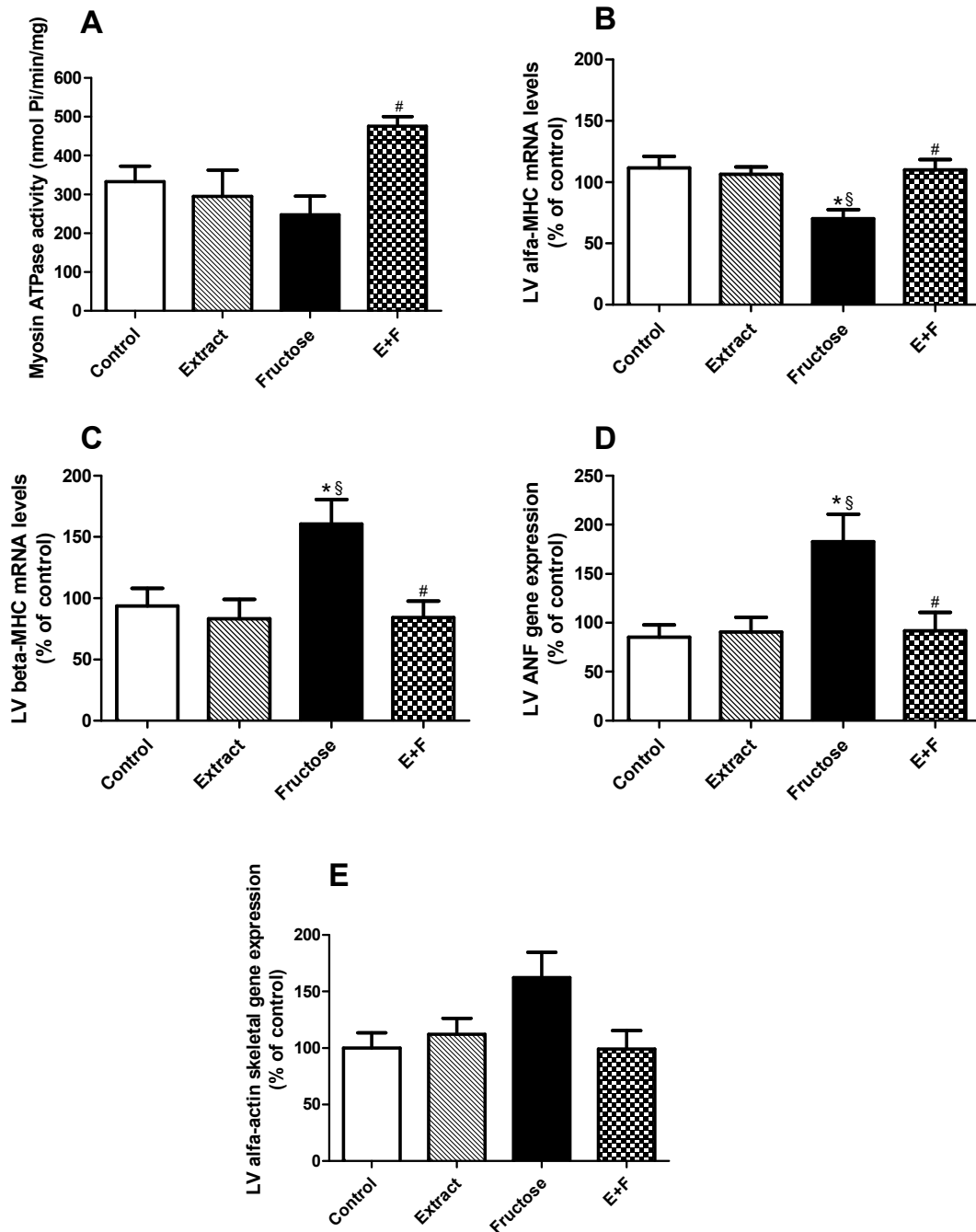


Figure 2. Indicators of pathologic cardiac injury. A) Myosin ATPase activity; Gene expression of B) α -MHC; C) β -MHC; D) ANF; E) α -actin skeletal, evaluated by real-time PCR. Results are expressed as mean \pm SD. * p <0.05 vs Control; $\S p$ <0.05 vs Extract and # p <0.05 vs Fructose. N = 8.



6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados podemos concluir que o extrato aquoso de *C. xanthocarpa* apresenta conteúdo expressivo de compostos fenólicos e flavonóides totais. Também podemos sugerir a presença de ácido gálico, ácido clorogênico, teobromina e quercetina no extrato, sendo a quercetina em maiores concentrações. Estas substâncias já possuem potenciais clínicos descritos que podem ajudar na investigação das propriedades farmacológicas desta planta. Além disso, a administração aguda do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* tem efeito hipotensor dose-dependente em ratos normotensos, e ainda podemos sugerir que essa ação pode ser mediada através do sistema renina-angiotensina pelo bloqueio do receptor AT1 e resposta autônoma simpática. O estudo de modelagem molecular demonstrou interação entre os sítios de ligação do ácido clorogênico e quercetina com AT1R, o que pode relacionar a presença destes compostos à ação hipotensora do mesmo. O tratamento com frutose diminuiu a percentagem de RNAm α -MHC e aumentou a expressão de β -MHC e ANF, fato que pode sugerir, do ponto de vista molecular, uma lesão cardíaca inicial. Já a co-administração de frutose e extrato aumentou a atividade da ATPase miosínica e impediu a reexpressão da isoforma fetal da MHC, auxiliando na prevenção do dano cardíaco.

7. PERSPECTIVAS

Acreditamos que o extrato de *Campomanesia xanthocarpa* é muito promissor e que seu estudo ainda deve ser muito explorado. Para futuros projetos pode-se explorar melhor a fitoquímica desta planta, numa tentativa de entender melhor quais os compostos que atuam em suas diferentes ações, com a utilização de HPLC, GC-MS, entre outras, técnicas que possam quantificar e identificar os componentes. Além disso, pode-se utilizar a inversão dos fármacos utilizados para análise do mecanismo de ação do extrato no protocolo agudo para confirmação da via, e ainda utilização dessas e de outros medicamentos no tratamento prolongado para comparação dos efeitos benéficos do extrato na síndrome metabólica. Entende-se ainda que devido aos resultados obtidos a via da PKC possa estar envolvida, talvez inibida, desta forma, é uma alternativa de possíveis estudos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. T.; GILBERT, E. M.; LOWES, B. D.; MINOBE, W. A.; LARRABEE, P.; RODEN, R. L.; DUTCHER, D.; SEDERBERG, J.; LINDENFELD, J. A.; WOLFEL, E. E.; SHAKAR, S. F.; FERGUSON, D.; VOLKMAN, K.; LINSEMAN, J. V.; QUAIFFE, R. A.; ROBERTSON, A. D.; BRISTOW, M. R. **Coordinate changes in myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype.** *Molecular Medicine*, v. 8, p. 750-760, 2002.

AGUILAR-SALINAS, C. A.; ROJAS, R.; GÓMEZ-PERZ, F. J.; VALLES, V.; RIOS-TORRES, J. M.; FRANCO, A.; OLAIZ, G.; RULL, J. A.; SEPÚLVEDA, J.; GARCIA LÓPEZ, L. L. **High prevalence of metabolic syndrome in Mexico.** *Archives of Medical Research*, v. 35, p. 76-81, 2004.

ALAMGEER, A. M. S.; JABEEN, Q.; KHAN, H. U.; MAHEEN, S.; HAROON-UR-RASHID, S.; KARIM, S.; RASOOLMALIK, M. N. H.; KHAN, K.; MUSHTAQ, M. N.; LATIF, F.; TABASSUM, N.; KHAN, A. Q.; AHSAN, H.; KHAN, W. **Pharmacological evaluation of antihypertensive effect of aerial parts of *Thymus linearis* Benth.** *Acta Polonicae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 71, n. 4, p. 677-682, 2014.

ALBERTI, K. G. M. M.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M. **Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.** *Circulation*, v. 120, n. 16, p. 1640–1645, 2009.

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; BRASIL E SILVA, G. A. A.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**, Ed. Ulbra, Canoas, p. 211, 1995.

ALVES, H. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos.** *Cadernos temáticos de química nova na escola*, v. 3, p. 10-15, 2001.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIRA F. L. **The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the Professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice.** *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 14, n. 3, p. 316-323, 2006.

ARION, J. K.; ELLACOTT, K. L. J.; KING, V. L.; HASTY, A. H. **Mouse models of the metabolic syndrome.** *Disease Models & Mechanisms*, v. 3, n 3-4, p. 156-166, 2010.

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

BARREIRA, E. J. **Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos.** Cadernos temáticos de química nova na escola, v. 3, 2001.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. **Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BIAVATTI, M. V.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. **Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters.** Journal of Ethnopharmacology, v. 93, p. 385-389, 2004.

BIANCARDI, V. C.; BERGAMASCHI, C. T.; LOPES, O. U.; CAMPOS, R. R. **Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.40, p.40–408, 2007.

BORCH-JOHNSEN, K.; WAREHAM, N. **The rise and fall of the metabolic syndrome.** Diabetologia, v. 53, p. 597–599, 2010.

BORGES, G.; DEGENEVE, A.; MULLEN, W.; CROZIER, A. **Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, p. 3901–3909, 2010.

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.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C.; SCALON, V.; SANTOS, A.; SALIMENHA, M.; MONTE-MOR, R. **Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais.** Cedeplar – UFMG, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** v. 1/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 546p., 2010.

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

BRUNZELL, J. D.; AYYOBI, A. F. **Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus.** *American Journal of Medicine*, v. 115, p. 24S–28S, 2003.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-89, 2000.

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

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHASWAL, M.; DAS, S.; PRASAD, J.; KATYAL, A.; FAHIM, M. **Cardiac autonomic function in acutely nitric oxide deficient hypertensive rats: role of the sympathetic nervous system and oxidative stress.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 24, 2011.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; et al. **Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** *Hypertension*, v. 42, p. 1206-52, 2003.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. **Exercícios físicos e Síndrome Metabólica**. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 10, n. 4, p. 319-324, 2004.

COLLISTER, J. P.; HORNFELODT, B. J.; OSBORN, J. W. **Hypotensive Response to Losartan in Normal Rats: Role of Ang II and the Area Postrema**. Hypertension, v. 27, p.598-606. 1996.

DAI, S.; MCNEILL, J. H. **Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent**. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 33, p. 101–107, 1995.

DECAYRE, C.; SWYNGHEDAUW, B. **A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species**. Pffuegers Archives, v. 355, p. 39-47, 1975.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. **Plants popularly used for losing weight purposes in POA, South Brazil**. Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 60-71, 2007.

DINH, D. T.; FRAUMAN, A. G.; JOHNSTON, C. I.; FABIANI, M. E. **Angiotensin receptors: distribution, signalling and function**. Clinical Science (Lond), v. 100, p. 481–492, 2001.

DRWAL, M. N.; GRIFFITH, R. **Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening**. Drug Discovery Today Technologies, v. 10, p. 395–401, 2013.

DUNSTAN, D. W.; ZIMMET, P. Z.; WELBORN, T. A.; COURTEN, M. P.; CAMERON, A. J.; SICREE, R. A.; DWYER, T.; COLAGIURI, S.; JOLLEY, D.; KNUIMAN, M.; ATKINS, R.; SHAW, J. E. **The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. The Australian diabetes, obesity and lifestyle study**. Diabetes Care, v. 25, p. 829-834, 2002.

FERNANDES, J. B. F.; VARGAS, V. M. F. **Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa***. Phytotherapy research, v. 17, p. 269-273, 2003.

FERREIRA, L. G.; SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies**. Molecules, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

- FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults; findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *Jama*, v. 287, p. 356-359, 2002.
- FRIEDMAN, J. M. **Obesity: Causes and control of excess body fat.** *Nature*, v. 459, p.340–2, 2009.
- FRISHMAN, W. H.; SINATRA, S. T.; MOIZUDDIN, M. **The use of herbs for treating cardiovascular disease.** *Seminars in Integrative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 23-35, 2004.
- GALASSETTI, P. **Inflammation and oxidative stress in obesity, metabolic syndrome, and diabetes.** *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- GIELEN, S.; LANDMESSER, U. **The Year in Cardiology 2013: cardiovascular disease prevention.** *European Heart Journal*, v. 35, p. 307-12, 2014.
- GRESSLER, E. **Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil.** *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.
- GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE, P. J.; SMITH, J. R.; SPERTUS, J. A.; COSTA, F. **American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement.** *Circulation*, v. 112, p. 2735–2752, 2005.
- HEINIG, M.; JOHNSON, R. J. **Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome.** *Cleveland Clinical Journal of Medicine*, v. 73, p. 1059–1064, 2006.
- HU, G.; QIAO, Q.; TUOMILEHTO, J.; BALKAU, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; PYORALA, K. **Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women.** *Archives of Internal Medicine*, v. 164, n. 10, p. 1066–1076, 2004.
- HWANG, I. S.; HO, H.; HOFFMAN, B. B.; REAVEN, G. M. **Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats.** *Hypertension*, v. 10, p. 512– 516, 1987.

ISHITANI, L. H.; FRANCO, G. C.; PERPETUO, I. H. O.; FRANÇA, E. **Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil.** Ver Saúde Pública, v. 40, n. 4, p. 684-691, 2006.

JOHN, K. M. M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S.; SURESH, M.; ENKHTAIVAN, G.; KIM, D. H. **Metabolic Variations, Antioxidant Potential, and Antiviral Activity of Different Extracts of *Eugenia singampattiana* (an Endangered Medicinal Plant Used by Kani Tribals, Tamil Nadu, India) Leaf.** BioMed Research International, p. 1-11, 2014.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. **Structure-based drug design to augment hit discovery.** Drug Discovery Today Technologies, v. 16, p. 831–839, 2011.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. **Avaliação do perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg L.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 121-129, 2013.

KATZMARYK, P. T.; LEON, A. S.; WILMORE, J. H.; SKINNER, J. S.; RAO, D. C.; RANKINEN, T.; et al. **Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the heritage family study.** Medicine Science Sports Exercise, v. 35, n. 10, p. 1703–9, 2003.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients.** Journal of Ethnopharmacology, v. 127, p. 299-305, 2010.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, A. M.; ROSSATO, M. F.; TREVISAN, G.; WALKER, C. I. B.; LEAL, C. A. M.; BORGES, D. O.; SCHETINGER, M. R. C.; MORESCO, R. N.; DUARTE, M. M. M. F.; DOS SANTOS, A. R. S., VIECILI, P. R. N.; FERREIRA, J. **Antiplateled, antithrombotic and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 8, 2012.

KLAFKE, J. Z.; PEREIRA, R. L. D.; HIRSCH, G. E.; PARISI, M. M.; PORTO, F. G.; ALMEIDA, A. S.; RUBIN, F. H.; SCHMIDT, A.; BEUTLER, H.; NASCIMENTO, S.; TREVISAN, G.; BRUSCO, I.; OLIVEIRA, S. M.; DUARTE, M. M. M. F.; DUARTE, T.; VIECILI, P. R. N. **Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr- KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid.** Phytomedicine, v. 23, p. 1227–1234, 2016.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. **The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrate synoptic treatment and identification keys.** Brittonia, New York, v. 49, n. 4, p. 508- 536, 1997.

LEMON, D. D.; PAPST, P. J.; JOLY, K.; PLATO, C. F.; MCKINSEY, T. A. **A high-performance liquid chromatography assay for quantification of cardiac myosin heavy chain isoform protein expression.** Anal Biochemistry, v. 408, n. 1, p. 132-5, 2011.

LIBBY, P.; BONOW, R. O.; MANN, D. L.; ZIPES, D. P. **Tratado de doenças cardiovasculares**, 8ª ed. Saunders Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.

LIM, K. H.; KO, D.; KIM, J. H. **Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats.** Journal of Ginseng Research, v. 37, p. 273-82, 2013.

LOMPRÉ, A. M.; SCHWARTZ, K.; D'ALBIS, A.; LACOMBE, G.; VAN THEIM, N.; SWYNGHEDAUW, B. **Myosin isoenzymes redistribution in chronic heart overloading.** Nature, v. 282, p. 105-107, 1979.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, p. 368, 1992.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas.** Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, p. 1120, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALACHIAS, M. V. B.; SOUZA, W. K. S. B.; PLAVNIK, F. L.; RODRIGUES, C. I. S.; BRANDÃO, A. A.; NEVES, M. F. T.; et al. **7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.107, (3Supl.3), p.1-83, 2016.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. **Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*.** Journal of Ethnopharmacology, v. 94, p. 55-57, 2004.

MERCADIER, J. J.; LOMPRÉ, A. M.; WISNEWSKY, C.; SAMUEL, J. L.; BERCOVICI, J.; SWYNGHEDAUW, B.; SCHWARTZ, K. **Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy.** *Circulation Research*, v. 49, p. 525-532, 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Portaria no. 971, de 3 de maio de 2006.* Aprova a **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)** no SUS. Diário Oficial da União, 2006.

MOHAN, V.; SHANTHIRANI, S.; DEEPA, R.; PREMALATHA, G.; SASTRY, N. G.; SAROJA, R. **Intra-urban differences in the prevalence of the metabolic syndrome in southern India – the Chennai Urban Population Study (CUPS No 4).** *Diabetic Medicine*, v. 18, p. 280-287, 2001.

MOREIRA, C. M. et al. **Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135, p. 269-275, 2003.

MULVANY, M. J. **Small artery remodelling in hypertension.** *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, v. 110, p. 49-55, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extractions and analysis of phenolics in food.** *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1-2, p. 95- 111, 2004.

NADAR, S. K.; TAYEBJEE, M. H.; MESSERLI, F.; et al. **Target organ damage in hypertension: pathophysiology and implications for drug therapy.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, n. 13, p. 1581-92, 2006.

NAKAGAWA, T.; HU, H.; ZHARIKOV, S.; TUTTLE, K. R.; SHORT, R. A.; GLUSHAKOVA, O.; OUYANG, X.; FEIG, D. I.; BLOCK, E. R.; HERRERA-ACOSTA, J.; PATEL, J. M.; JOHNSON, R. J. **A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome.** *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 290, p. F625–F631, 2006.

NETO-NEVES, E. M.; MONTENEGRO, M. F.; DIAS-JUNIOR, C. A.; SPILLER, F.; KANASHIRO, A.; TANUS-SANTOS, J. E. **Chronic Treatment with Quercetin does not Inhibit Angiotensin Converting Enzyme *In Vivo* or *In Vitro*.** *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 107, p. 825–829, 2010.

PASTORI, T.; FLORES, F. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, C. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S.B. **Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system.** *Pharmaceutical Biology*, v. 51, n. 10, p.1249-1255, 2013.

PEREIRA, M.; LUNET, N.; AZEVEDO, A.; et al. **Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries.** *J Hypertension*, v. 27, p. 963-75, 2009.

PIZZO, M. A. **Padrão de deposição de sementes e sobrevivência de sementes e plântulas de duas espécies de Myrtaceae na Mata Atlântica.** *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 371-377, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**, 4ed RJ: Guanabara-Koogan, p. 532-541, 2001.

REAVEN, G. M. **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** *Diabetes*, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

ROBERTS, M. F.; WINK, M. **Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications.** Plenum Press, p. 1-7, 1998.

ROBINS, S. J.; RUBINS, H. B.; FAAS, F. H.; SCHAEFER, E. J.; ELAM, M. B.; et al. **Insulin resistance and cardiovascular events with low HDL cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT).** *Diabetes Care*, v. 26, p. 1513–1517, 2003.

RUNDELL, V. L. M.; GEENEN, D. L.; BUTTRICK, P. M.; TOMBE, P. P. **Depressed cardiac tension cost in experimental diabetes is due to altered myosin heavy chain isoform expression.** *American Journal of Physiology*, v. 287, p. H408-H413, 2004.

SALAROLI, L. B.; BARBOSA, G. L.; MILL, J. G.; MOLINA, M. G. B. **Prevalência de Síndrome Metabólica em estudos de base populacional, Vitória, ES – Brasil.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 51, p. 1143-1152, 2007.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; TAPIA, E.; JIMÉNEZ, A.; BAUTISTA, P.; CRISTÓBAL, M.; NEPOMUCENO, T.; SOTO, V.; ÁVILA-CASADO, C.; NAKAGAWA, T.; JOHNSON, R. J.; HERRERA-ACOSTA, J.; FRANCO, M. **Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats.** *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 292, p. F423–F429, 2007.

SANTOS, M. S.; CARNEIRO, P. I. B.; WOSIACKI, G.; PETKOWICZ, C. L. O.; CARNEIRO, E. B. B. **Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia xanthocarpa* B. (Gabirola)**. Ciências Agrárias, v. 30, n. 1, p. 101-106, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. “Myrtaceae” in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Disponível in <http://www.cardiometro.com.br/calculo.asp>; acessado em <27/04/2017 às 14:45> 2017.

SOUZA, A. D. Z.; VARAS, N. R. C.; CEOLIN, T.; HECK, R. M.; HAEFFNER, R.; VIEGAS, C. R. S. **A enfermagem diante da utilização de plantas medicinais no tratamento complementar da hipertensão arterial e das dislipidemias**. Revista Mineira de Enfermagem, v. 14, n. 4, p. 474-478, 2010.

STOCKER, R.; KEANEY, J. R. **Role of oxidative modifications in atherosclerosis**. Physiological Reviews, v. 84, p.1381– 478, 2004.

TALMADGE, R. J.; ROY, R. R. **Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms**. Journal of Applied Physiology, v. 75, p. 2337-2340, 1993.

VEIGA, J. R.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?**. Química Nova, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIECILI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECILI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals**. Atherosclerosis, v. 234, p.85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RÖNNAU, A. D. R. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U. DA; WIILAND, E. DE F.; SUYENAGA, E. S. **Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation, stress, and diabetes.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p.1111–9, 2005.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; PARISE, H.; SULLIVAN, L.; MEIGS, J. B. **Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus.** *Circulation*, v. 112, p. 3066–72, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005.** Geneva: World Health Organization. 2002. 74p.

YANG, B.; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; SALMINEN, J. **Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 60, p. 8672–8683, 2012.

YANG, X. R.; XING, C. Y., XU, J. K.; JIANG, Y. M. **Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC.** *Food Chemistry*, v. 100, p. 1132–113, 2007.

YESIL-CELIK TAS, O.; GIRGIN, G.; ORHAN, H.; WICHERS, H. J.; BEDIR, E.; VARDAR-SUKAN, F. **Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times.** *European Food Research and Technology*, v. 224, p. 443–451, 2007.

ZAMBON, S.; ZANONI, S.; ROMANATO, G.; CORTI, M. C.; NOALE, M.; SARTORI, L.; et al. **Metabolic syndrome and all cause and cardiovascular mortality in an Italian elderly population: the Progetto Veneto Anziani (Pro.V.A.) study.** *Diabetes Care*, v. 32, p.153–159, 2009.

ZHANG, Y.; CARRERAS, D.; BOLD, A. J. **Discoordinate re-expression of cardiac fetal genes in N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertension.** *Cardiovascular Research*, v. 57, p. 158-167, 2003.