

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Karolina Torres Santos

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia sulcata* SOBRE A
CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA DE RATOS E A IMUNOTOXICIDADE EM
LINFÓCITOS HUMANOS**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Uruguaiiana

2017

Karolina Torres Santos

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia sulcata* SOBRE A
CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA DE RATOS E A IMUNOTOXICIDADE EM
LINFÓCITOS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOQUÍMICA.

Orientadora: prof^a Dra. Cleci Menezes Moreira

Uruguiana

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) .

S18e Santos, Karolina Torres
EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE Eugenia sulcata
SOBRE A CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA DE RATOS E A IMUNOTOXICIDADE
EM LINFÓCITOS HUMANOS / Karolina Torres Santos.
70 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.
"Orientação: Cleci Menezes Moreira".

1. Óleos essenciais. 2. Eugenia sulcata. 3. Contratilidade
miocárdica. 4. Linfócitos Humanos. 5. imunotoxicidade. I.
Título.

Karolina Torres Santos

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia sulcata* SOBRE A
CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA DE RATOS E A IMUNOTOXICIDADE EM
LINFÓCITOS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOQUÍMICA.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Cleci Menezes Moreira

Orientador

(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin

(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho a Felipe Ferrarini Machado, Leticia Torres Santos, Dinorá Torres Santos e João Carlos de Freitas Santos, por serem meus maiores incentivadores e as razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que em sua infinita bondade acalmou meu coração em todos os momentos de aflição, nos momentos de saudades da família, nas dificuldades da realização deste trabalho, a Ele que está sempre presente em minha vida, agradeço imensamente.

Aos meus pais, João e Dinorá, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando a ser sempre melhor, por serem pais presentes e dedicados, por estarem sempre orando a Deus pela minha vida, amo vocês mais do que tudo.

A minha maravilhosa maninha, Leticia, que além de me apoiar e estar sempre comigo é a irmã mais incrível do universo, te amo muito meu BB.

Ao meu amado, Felipe, que foi participativo em todos os processos desta conquista. Obrigada pela parceria, pela paciência, pela ajuda incondicional e por acreditar sempre no meu potencial, eu te amo mais do que eu saiba descrever meu amor! Obs: Obrigada também pelo nosso filhotinho, Tegu, que é um cãozinho maravilhoso.

Aos meus avós, Raimunda, Suzana e Emilio, por todo carinho e amor dedicados a mim, amo vocês.

À Priscila, pela companhia, principalmente na reta final deste trabalho, obrigada pela parceria, pelos mates e pelas risadas, foi importante sua presença neste momento.

À minha querida orientadora, Profe Cleci, por todo ensinamento, pela amizade e por estar sempre presente em cada etapa deste trabalho, és uma pessoa especial, te admiro muito!

Aos colegas de laboratório que foram maravilhosos desde o começo, um obrigada especial a querida Maquelem, que desde a idealização deste trabalho estava ao meu lado. Também aos amigos Leandro, Rose, Liane, Carlos, Sue Elle e Fabricio por toda a ajuda em todas as etapas deste trabalho. A todos vocês, obrigada pelos cafés, pelas risadas, pela parceria nos finais de semana, por estarem sempre dispostos a ajudar! Vocês foram essenciais!!!

Ao professor Michel Mansur Machado, obrigada pelos protocolos de Imunotoxicidade.

Aos professores que aceitaram fazer parte da banca avaliadora deste trabalho, Elton Luis Gasparotto Denardin, Fávero Reisdorfer Paula e Sandra Elisa Haas.

Ao PPSUS/FAPERGS pelo auxílio financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica, a todos os professores e colegas que fizeram parte deste processo.

A todos que de alguma forma me auxiliaram para a realização deste sonho!!!

Obrigada, obrigada e obrigada!!!

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu." Eclesiastes 3:1.

RESUMO

Eugenia sulcata é uma planta da família Myrtaceae, conhecida como pitanguinha e murtinha. O gênero *Eugenia* é rico em estruturas secretoras de óleo essencial, cuja composição pode apresentar efeitos gastrointestinais, hipoglicemiantes, antirreumáticos, entre outros. Os componentes majoritários do óleo essencial das folhas desta espécie são: o β -cariofileno (24,6%), α -pineno (17,2%), β -pineno (10,9%) e 1,8-cineol (5,6%). Em estudos anteriores descrevemos efeitos hipotensor e anti-hipertensivo deste óleo. Este estudo visou avaliar a contratilidade miocárdica bem como analisar as atividades das enzimas cardíacas, enzima conversora de angiotensina (ECA) e ATPase miosínica. Para isso foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WK) e animais espontaneamente hipertensos (SHR), tratados com o óleo essencial por 30 dias. Além disso, avaliar a imunotoxicidade do óleo essencial em três diferentes concentrações (1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$), em linfócitos humanos. As culturas de linfócitos foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade, o dano ao DNA e a mutagenicidade. Os resultados demonstram que o tratamento não prejudicou a força de contração cardíaca, não alterou o funcionamento do retículo sarcoplasmático (RS) e a extrusão de cálcio de membrana, não modificou os canais de cálcio de membrana e nem a atividade do receptor β adrenérgico. As contrações tetânicas foram potencializadas nos animais SHR. A atividade ATPásica da miosina também foi aumentada nos animais SHR e a atividade da ECA cardíaca apresentou uma redução nas duas cepas animais e a ECA sérica apenas nos SHR. Ainda constatou-se que todas as concentrações do óleo não causaram citotoxicidade e nem mutagenicidade e apresentaram baixo dano ao DNA. Portanto o óleo essencial não prejudica a contratilidade miocárdica e nem apresenta imunotoxicidade relevante. A *Eugenia sulcata* apresenta pouquíssimos dados na literatura, tanto químicos quanto biológicos, tornando-se de extrema valia a comprovação científica dos efeitos atribuídos empiricamente, para ter a segurança de que essas plantas exerçam o efeito para o qual são utilizadas.

Palavras-chaves: contratilidade miocárdica, imunotoxicidade, óleo essencial, *Eugenia sulcata*.

ABSTRACT

Eugenia sulcata is a plant of the family Myrtaceae, known as pitanguinha and murтинha. The *Eugenia* genus is rich in essential oil secreting structures, whose composition may have gastrointestinal, hypoglycemic, antirheumatic and other effects. The major components of the leaves essential oil this species are: β -caryophyllene (24.6%), α -pinene (17.2%), β -pinene (10.9%) and 1,8-cineole (5,6%). In previous studies we have described the hypotensive and antihypertensive effects of this oil. This study aims to evaluate myocardial contractility as well as to analyze the activities of cardiac enzymes, angiotensin converting enzyme (ACE) and myosin ATPase. Wistar Kyoto (WK) and spontaneously hypertensive animals (SHR), treated with the essential oil for 30 days, were used. In addition, we evaluated the immunotoxicity of essential oil at three different concentrations (1, 10 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) in human lymphocytes. Lymphocyte cultures were used to evaluate cytotoxicity, DNA damage, and mutagenicity. The results demonstrate that the treatment did not changes the cardiac contraction force, did not alter the functioning of the sarcoplasmic reticulum (RS) and the extrusion of membrane calcium, did not modify the membrane calcium channels nor the β adrenergic receptor activity. Tetanic contractions were potentiated in the SHR animals. The myosin ATPase activity was also increased in the SHR animals and the cardiac ACE activity showed a reduction in both animal strains and the serum ACE only in SHR. It was still found that all oil concentrations did not cause cytotoxicity or mutagenicity and presented low DNA damage. Therefore the essential oil does not changes myocardial contractility and does not present relevant immunotoxicity. *Eugenia sulcata* presents little data in the literature, both chemical and biological, making the scientific evidence of empirically attributed effects extremely useful, to be sure that these plants will have the effect for which they are used.

Key words: myocardial contractility, immunotoxicity, essential oil, *Eugenia sulcata*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração de Cardiomiócito - Acoplamento excitação-contração cardíaca.....	27
Figura 2 - Registro típico de contração estabilizada de músculo papilar de rato	31
Figura 3 - Registro típico de potenciações pós-pausas de músculo papilar de rato.....	31
Figura 4 - Registro típico de diferentes estimulações elétricas em músculo papilar de rato...	31
Figura 5 - Registro típico de contrações de músculo papilar de rato submetido à crescentes concentrações de cálcio	32
Figura 6 - Registro típico de resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5} M) em músculo papilar de rato	32
Figura 7 - Registro típico de contrações tetânicas de músculo papilar de rato.....	33
Figura 8 - Força isométrica desenvolvida por músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE) de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	37
Figura 9 - Potenciação relativa das contrações após pausas de estimulação elétrica (PPP) de 15, 30 e 60 segundos nos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	39
Figura 10 - Força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica (0,1 a 1 HZ) nos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	40
Figura 11 - Força desenvolvida em diferentes concentrações de cálcio, nos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	41
Figura 12 - Força desenvolvida pelos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i> na presença de isoproterenol (10^{-5} M).....	42
Figura 13 - Força desenvolvida pelas contrações tetânicas dos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	44
Tabela 1. Peso corporal dos diferentes grupos tratados com óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i> por 30 dias.	45
Figura 14 - Índice de hipertrofia cardíaca avaliado nos músculos papilares do VE de ratos tratados com o óleo essencial das folhas de <i>Eugenia sulcata</i>	46
Figura 15 - Atividade da ATPase miosínica medida em preparações de miosina do VE.....	47
Figura 16 - Atividade da enzima de conversão da angiotensina. (A) Atividade da enzima em homogenato de VE. (B) Atividade da enzima no soro dos animais	48

Figura 17 - Avaliação da viabilidade celular em culturas de linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>E. sulcata</i> (ES), Controle negativo (CN), Controle positivo (CP).....	49
Figura 18 - Avaliação do índice de dano de DNA pelo ensaio cometa em culturas de linfócitos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>E. sulcata</i> (ES), Controle negativo (CN,) Controle positivo (CP).....	51
Figura 19 - Avaliação da frequência de micronúcleo em culturas de linfócitos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>E. sulcata</i> (ES), Controle negativo (CP), Controle positivo (CP).....	52

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivo geral.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. Revisão bibliográfica.....	18
3.1. Plantas Medicinais.....	18
3.2. Família Myrtaceae.....	19
3.3. <i>Eugenia sulcata</i> Spring ex Mart.....	20
3.4. Óleo essencial.....	21
3.5. Modelo experimental e Hipertensão Arterial Sistêmica.....	23
3.6. Contratilidade miocárdica	25
3.7. Parâmetros imunotoxicológicos	27
4. Metodologia	29
4.1. Material vegetal.....	29
4.2. Animais experimentais.....	29
4.2.1. Ratos Wistar Kyoto e SHR.....	29
4.2.2. Grupos experimentais.....	30
4.3. Avaliação da contratilidade miocárdica	30
4.3.1. Força Isométrica.....	30
4.3.2. Potenciações relativas após pausas (PPP)	31
4.3.3. Frequência de estimulação elétrica.....	31
4.3.4. Resposta inotrópica ao Cálcio	32
4.3.5. Resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5} M) em músculo papilar de rato. 32	
4.3.6. Contrações tetânicas	32
4.4. Análises Bioquímicas.....	33
4.4.1. Avaliação da atividade específica da ATPase miosínica	33
4.4.1.1 Preparação da fração miosínica.....	33
4.4.1.2. Medida da ATPase miosínica.....	33
4.4.2. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina	34
4.5. Índice de hipertrofia do coração.....	34
4.6. Avaliação imunotoxicológica.....	34
4.6.1. Preparação da cultura celular de linfócitos.....	35

4.6.2.	Tratamentos das culturas	35
4.6.3.	Análise da citotoxicidade	35
4.6.4.	Análise da genotoxicidade.....	35
4.6.5.	Análise da mutagenicidade.....	36
4.7.	Análise estatística.....	36
5.	Resultados e Discussão	37
5.1.	Contratibilidade miocárdica	37
5.1.1	Análise da força isométrica	37
5.1.2.	Análise das potenciações pós pausa (PPP).....	38
5.1.3.	Análise dos músculos papilares frente às mudanças de frequência de estímulo	39
5.1.4.	Efeito inotrópico ao cálcio	40
5.1.5.	Avaliação dos receptores β -adrenérgicos.....	41
5.1.6.	Avaliação das contrações tetânicas	42
5.2.	Índice de hipertrofia cardíaca	43
5.3.	Análises Bioquímicas.....	44
5.3.1	Atividade da ATPase Miosínica.....	44
5.3.2.	Atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e cardíaca	44
5.4.	Análise imunotoxicológica.....	45
5.1.1.	Viabilidade celular	45
5.1.2.	Índice de dano de DNA.....	46
5.1.3.	Análise de mutagenicidade.....	46
6.	Conclusões	48
7.	Referências.....	49

1. Introdução

A família Myrtaceae está entre uma das mais importantes do Brasil (LANDRUM & KAWASAKI, 1997; SOBRAL et al., 2015). Uma das características mais relevantes desta família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais, diversas espécies brasileiras de distintos gêneros desta família vêm sendo estudadas pelo fato de serem grandes produtoras destes óleos (APEL et al., 2006; NAKAMURA et al., 2010; WANNES et al., 2009, LIMA et al., 2012a).

Aproximadamente um terço dessas espécies pertence ao gênero *Eugenia*, que apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde o México até a Argentina (MCVAUGH, 1968; JOHNSON & BRIGGS, 1984). Este gênero encontra-se bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (KLEIN, 1984; PEIXOTO & GENTRY, 1990; CHAGAS E SILVA et al., 1995; RODRIGUES & NAVE, 2000; ARANTES & MONTEIRO, 2002). Muitas dessas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, e são frequentemente utilizadas na medicina popular (PIO CORRÊA, 1984; NEVES & DONATO, 1989; LUNARDI et al., 2001), para o tratamento de diversas doenças, entre as quais estão as doenças cardiovasculares (BARCELOS et al., 2010).

As doenças cardiovasculares (DCV), incluindo a hipertensão arterial sistêmica (HAS), são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (PANCHAL & BROWN, 2013). No Brasil a incidência de HAS está presente em 20-30% da população adulta, tornando-se um problema de suma importância em saúde pública (BEEVERS & MCGREGOR, 2000). A hipertensão arterial é o fator principal ou coadjuvante em mais de 200.000 mortes ao ano (FREITAS et al., 2001). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é considerado um dos mais importantes sistemas reguladores para a homeostase cardiovascular. A influência desse sistema sobre as funções cardiovasculares e renais é extremamente ampla e complexa, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelulares variados (CRACKOWER et al., 2002; FERRARIO et al., 2014; FERRARIO et al., 2016). Uma forma de avaliar esta via é a determinação da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina circulante (ECA), responsável pela transformação de angiotensina I (ANG I) em angiotensina II (ANG II), sendo este metabólito responsável por

diversas ações, incluindo vasoconstrição, liberação de aldosterona e efeitos no miocárdio e na vasculatura (WEBER, 1999; RUILOPE et al., 2010).

Um dos órgãos mais afetados pela HAS é o coração. Vários eventos cardíacos patológicos, advindos tanto de sobrecarga de volume quanto de sobrecarga de pressão ou alterações metabólicas, desencadeiam alterações em proteínas envolvidas na contratilidade miocárdica. As principais moléculas envolvidas no ciclo de contração-relaxamento são as duas proteínas contráteis principais, o segmento fino, actina, e o segmento grosso, miosina. São os íons cálcio que iniciam o ciclo de contração interagindo com a troponina C e aliviando a inibição exercida sem sua presença pela troponina I. O ciclo da contração em termos moleculares se dá através da hidrólise do adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) pela atividade de ATPase da cabeça miosínica, flexionando-a. Quando o ATP é hidrolisado, a cabeça miosínica liga-se a uma unidade actínica adjacente. O Pi é então liberado da cabeça havendo uma ligação forte da cabeça miosínica à actina. Em seguida, a cabeça estende-se, isto é, organiza-se (LIBBY, 2010).

O óleo essencial de *Eugenia sulcata* foi descrito como hipotensor e anti-hipertensivo (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014) e ainda não há relatos de seus efeitos na contratilidade cardíaca. Neste contexto, ressalta-se a importância de estudos científicos que venham comprovar ou não estas informações, bem como determinar os possíveis efeitos tóxicos (como genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade) a fim de proporcionar maior eficácia e segurança à população usuária (BRASIL, 1998; SILVA et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006).

2. Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo essencial das folhas de *Eugenia sulcata* na função cardíaca de ratos bem como avaliar imunotoxicidade do óleo em linfócitos humanos.

2.1. Objetivos específicos

Função cardíaca:

- Avaliar a força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares;
- Determinar a atividade da ATPase miosínica;
- Determinar a atividade da Enzima Conversora de Angiotensina;

Imunotoxicidade:

- Avaliar a citotoxicidade, o dano ao DNA e a mutagenicidade.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais, com a finalidade de tratamento e cura de doenças e sintomas, se dá desde o início da civilização (RODRIGUES & AMARAL, 2012), em que o homem despertou e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (DI STASI, 1996). Os registros de utilização de plantas como remédio datam da era paleolítica, pela identificação de pólen de plantas medicinais em sítios arqueológicos (SAAD, et al., 2009). Desde os tempos imemoriais, o homem busca, na natureza, recursos que melhorem sua condição de vida para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde (VIEGAS Jr & BOLZANI, 2006). Assim, pode-se observar que o relato de uso terapêutico de plantas pelos povos antigos ainda hoje constitui importante fonte de informação para a descoberta de novos fármacos (LEITE, 2009).

Inúmeras tradições terapêuticas contribuíram para a formação da medicina popular no Brasil. Diferentes fatores representaram papel importante para este acontecimento, no qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque, dentre eles pode-se ressaltar os conhecimentos indígenas e as colaborações trazidas pelos escravos e imigrantes (BALDAUF, et al., 2009).

Ao final da década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou o Programa de Medicina Tradicional que recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração (OMS, 1978).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes

naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO et al., 2001).

Vários comunicados e resoluções da OMS expressam a posição desta a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos, no âmbito sanitário. É sabido que 80% da população mundial dependem das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária à saúde, e 85% dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais. Ressalte-se que 67% das espécies vegetais medicinais do mundo são originadas dos países em desenvolvimento (ALONSO, 2004).

É importante salientar o crescente papel que a pesquisa acadêmica vem exercendo na busca de novos conhecimentos sobre as plantas, suas propriedades terapêuticas e toxicológicas. O uso clínico para tratamento de doenças cardiovasculares com a utilização de plantas medicinais e seus derivados representam mais de 50 % do total de substâncias. Doenças estas como, a hipertensão, aterosclerose e a diabetes (GURIB-FAKIN, 2006; VORA & MANSOOR, 2005). No entanto, poucas dessas plantas têm sua segurança, efetividade e mecanismo de ação confirmada cientificamente.

3.2. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é constituída por cerca de 144 gêneros e 4.630 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (JUDD et al., 2009). Esta família é uma das mais importantes do Brasil com 23 gêneros e 1026 espécies (SOBRAL et al., 2015). Os maiores gêneros de Myrtaceae são *Eucalyptus* (500 espécies) e *Malaleuca* (100 espécies), *Eugenia* (600 espécies), *Myrcia* (300 espécies), *Sygygium* (200 espécies) e *Psidium* (100 espécies) (CRONQUIST, 1981).

Esta família é citada com diversas propriedades medicinais como antirreumática, diurética, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana (DONATO & MORRETES, 2007; DE RAMOS et al., 2010; APEL et al., 2004; ARAÚJO et al., 1998; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). *Eugenia* constitui o maior gênero desta família, espalhados por todo o país, em diferentes *habitats*. No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, encontra-se a espécie *Eugenia sulcata* Spring ex Mart., planta com poucos registros de estudos na literatura avaliando seu potencial químico e/ou biológico.

Cruz e Kaplan (2004) indicaram que cerca de 70% das plantas pertencentes a essa família têm potencial terapêutico, sendo bastante utilizadas na medicina tradicional em

distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos. Além disso, demonstraram o perfil químico da família Myrtaceae que se caracteriza pela presença de taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenóides, derivados do floriglucinol, cromenos, estilbenóides e outros.

Várias espécies de plantas da família Myrtaceae são utilizados na medicina popular para o tratamento de hipertensão, incluindo *Pimenta dioica* (L.) Merr (SUÁREZ; ULATE; CICCIO, 2000), *Psidium guajava* L. (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008) e *Eugenia uniflora* L. (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999). Além disso, óleos essenciais de várias espécies de outras famílias também foram descritas por apresentar efeito anti-hipertensivo (INTERAMINENSEA et al., 2013; INTERAMINENSEA et al., 2011; BARCELOS et al., 2010; TALPUR et al., 2005) e atividade hipotensora; (DE SIQUEIRA et al., 2010; LIMA et al., 2012b.; MENEZES et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; BARBOSA-FILHO et al., 2007).

3.3. *Eugenia sulcata* Spring ex Mart

A espécie *Eugenia sulcata* Spring ex Mart, possui a sinonímia botânica *Stenocalyx sulcatus* (Spring ex Mart) O. Berg. e é popularmente conhecida como murtinha ou pitanguinha, sendo amplamente distribuída pelo sudeste, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo e na região Sul, Paraná e Santa Catarina (LEGRAND & KLEIN, 1969; SOBRAL et al., 2014). *E. sulcata* corresponde a uma árvoreta, apresentando um porte de aproximadamente três metros de altura. Apresenta flores de setembro a novembro e possui frutos subglobosos, 15-30 mm diâmetro, multicostados, pilosos, alaranjados quando maduros (ROMAGNOLLO & SOUZA, 2006).

Muitas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, e são comumente utilizadas na medicina popular como antirreumático, adstringente, diurético, hipoglicemiante, cicatrizante, antipirético, entre outros. São, também, fornecedoras de frutos comestíveis, podendo-se citar *E. involucrata* DC. (cereja-do-mato), *E. pyriformis* Cambess (uvaia), *E. neosilvestres* (grumixama) e *E. uniflora* L. (pitanga), (ROMAGNOLLO & SOUZA, 2006; CRUZ & KAPLAN, 2004).

Na composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia sulcata*, coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, pode-se observar que foram descritos 22 constituintes, dentre eles os majoritários estão o β cariofileno (24,6%), α Pineno (17,2%), β Pineno (10,9%) e 1,8 cineol (5,6%) (LIMA, 2012a).



Foto da espécie *Eugenia sulcata* situada no PNRJ. Fonte próprio autor.

São poucos os estudos químicos e biológicos encontrados na literatura sobre *Eugenia sulcata*. Lima et al, 2012a, demonstraram a atividade anticolinesterásica do óleo essencial. Foram observados os efeitos do óleo de *E. sulcata* sobre *Disdescus peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus* onde indicaram que seus componentes químicos são candidatos promissores para estudos de atividade inseticida e para controle ecológico de populações de pragas de insetos na agricultura (GONZALEZ et al., 2014). Em estudo anterior nosso grupo demonstrou a atividade hipotensora (SANTOS et al., 2013) e anti-hipertensiva do óleo essencial das folhas de *Eugenia* (SANTOS et al., 2014).

3.4. Óleo essencial

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e isolados a partir de processos físicos, de uma planta inteira ou parte desta, com origem taxonômica conhecida (MARTINS et al., 2011).

Óleos voláteis são metabólitos vegetais secundários produzidos pelas plantas por outras necessidades que não a de nutrição, por exemplo, para a atração e repelência de insetos e ação alelopática. A sua produção está integrada à fisiologia de toda a planta, por isso sua

composição e quantidade dependem das enzimas específicas que catalisam a produção de compostos voláteis em um órgão, do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos, como a salinidade do solo, a umidade e a temperatura (SANGWAN et al., 2001).

Os óleos voláteis não apresentam distribuição muito ampla no reino vegetal, sendo encontrados em aproximadamente 50 famílias, dentre elas, Myrtaceae, Lamiaceae, Poaceae, Lauraceae, Rosaceae e Asteraceae (CANE, 1990). Diversas partes do material vegetal são matérias-primas para a produção de óleos essenciais, como óleos de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja. São bastante utilizados na perfumaria, cosmética, alimentos, como coadjuvantes em medicamentos e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais são extraídos das plantas, principalmente por hidrodestilação e arraste a vapor. São formados por mistura de monoterpenos, sesquiterpenos ou fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas. Após a obtenção, eles são geralmente analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e seus constituintes são identificados através da comparação dos índices de retenção (RI) e espectro de massas com dados publicados, através do uso de banco de dados (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011; ADAMS, 2007).

Autores que trabalham com a família Myrtaceae, utilizam o óleo essencial extraído de diversas espécies para testes biológicos distintos, atividade vasorrelaxante (LAHLOU et al., 2002; BARCELOS et al., 2010, LIMA et al., 2012b) hipotensora (LAHLOU et al., 2002; BARBOSA-FILHO et al., 2007; DE SIQUEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2013) e antihipertensiva (BARCELOS et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Vários estudos relataram a eficácia dos óleos essenciais e seus constituintes como bioinseticidas (ROMAN, 2005; KUMAR et al., 2012; ZANDI-SOHANI; MHOJJATI; CARBONELL-BARRACHINA, 2013) e antibacteriano (DE RAMOS et al., 2010).

Moreno et al., 2007, analisaram o óleo essencial das folhas de outra espécie de Myrtaceae, a *Eugenia brasiliensis* Lam., onde demonstraram o α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol, como constituintes majoritários. O óleo das folhas de *Eupatorium polystachyum* (família Asteraceae) tem como constituintes majoritários o β -pineno que possui ação antisséptica (PETRAKIS et al., 2005) e ensaios farmacológicos demonstraram ação anestésica para o β -cariofileno (GHELARDINI et al., 2001).

Foi analisado o óleo essencial de *Eupatorium polystachyum*, onde encontraram como constituintes majoritários o β -cariofileno e β -pineno, demonstrando o efeito antioxidante deste óleo (SOUZA et al., 2007). O β -cariofileno também foi encontrado como um dos majoritários no óleo essencial de *Rhaphiodon echinus*, onde demonstram atividade antifúngica e antibacteriana (DUARTE et al., 2016).

Barbosa-Filho et al., 2007, demonstraram o efeito hipotensor do óleo essencial das folhas de *Ocotea duckei*, onde o constituinte majoritário encontrado foi o trans-cariofileno. O óleo essencial das folhas de *Blepharocalix salicifolius*, também pertencente a esta família, foi analisado onde foi encontrado como constituinte majoritário o *Estapulenol*, a autora descreveu o óleo como sendo capaz de reduzir a pressão arterial de ratos SHR, tendo ação anti-hipertensiva (FERNANDES, 2016). Os óleos essenciais obtidos das folhas de *Lippia thymoides*, coletadas nas quatro estações, apresentou o β cariofileno como constituinte majoritário. Ensaios in vitro mostraram que estes óleos essenciais relaxam a aorta isolada de ratos e o útero isolado de ratas (SILVA et al., 2015).

Diante de tantos potenciais e necessidades de estudos mais aprofundados acerca da farmacologia e mecanismos de ação de plantas popularmente utilizadas, este trabalho propõe-se estudar os efeitos do óleo essencial sobre parâmetros cardíacos uma vez que as doenças cardiovasculares são as que mais atingem a saúde da população mundial (AYRES, 1991; BEEVERS & MCGREGOR, 2000; FREITAS et al., 2001; SBC, 2010).

3.5. Modelo experimental e Hipertensão Arterial Sistêmica

Desde o desenvolvimento do SHR (do inglês, Spontaneously Hypertensive Rat), que são os animais espontaneamente hipertensos, por Okamoto & Aoki em 1963, esta cepa, é um dos modelos mais estudados na literatura. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial do homem.

Os SHRs começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7^a e a 15^a semana, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (YAMORI, 1984). Entretanto, fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro, afetam o desenvolvimento da hipertensão. Com relação à frequência cardíaca, esta se encontra mais elevada que nos ratos Wistar Kyoto (WKY) já na 3^a

semana de vida e se correlaciona, positivamente, com os níveis de pressão atingidos até a 6ª semana de vida (DICKOUT & LEE, 1998).

A HAS é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DCV e renais, sendo a principal responsável por acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e casos de insuficiência renal terminal (Ministério da Saúde, 2016).

A ideia mais aceita é que a hipertensão seja causada por uma interação entre fatores, do tipo genéticos-metabólicos e/ou patogênicos-ambientais. Um dos grandes problemas para alcançar o sucesso do controle dos níveis pressóricos durante períodos longos é a adesão do paciente ao tratamento. Esta adesão pode ser aumentada se for ofertado o Produto Natural ou Plantas Medicinais, que consegue reunir um enorme grupo de simpatizantes que acreditam na ação benéfica da planta e, desta forma, pode beneficiar o paciente reduzindo significativamente a morbidade e mortalidade. Além disto, as descobertas de novas substâncias com ação inédita irão aumentar a probabilidade quimiocombinatória, beneficiando maior número de pacientes (YUNES et al., 2001).

O SRAA, é uma via de regulação importante da pressão arterial, através da regulamentação do volume extracelular de líquido, está diretamente envolvido no controle de sódio do organismo. A ativação crônica deste sistema pode causar um aumento na resistência vascular periférica e, conseqüentemente da pressão, devido ao efeito vasoconstritor direto da Ang II. A ECA é responsável por transformar a Ang I em Ang II. O aumento da concentração de Ang II eleva a pressão por vários mecanismos, tais como: estímulo à biossíntese de aldosterona e sua liberação nos túbulos renais onde determina aumento na reabsorção de sódio e água e aumento da excreção de potássio; ligação a receptores AT1 do músculo liso vascular, auxiliando na abertura dos canais de cálcio de membrana, induzindo uma vasoconstrição; aumento da liberação de noradrenalina nos terminais adrenérgicos, contribuindo para potencializar o efeito vasoconstritor numa situação de estresse onde a atividade simpática está aumentada. No coração a Ang II pode induzir a hipertrofia dos miócitos e aumento do conteúdo de colágeno depositado na matriz extracelular cardíaca (CURI & PROCOPIO 2009). A determinação da atividade da ECA é uma forma de avaliar este sistema (WEBER, 1999; RUILOPE et al., 2010).

Associada a hipertrofia dos cardiomiócitos pode haver a mudança da expressão das isoformas da miosina refletindo na geração da força de contração. A miosina é uma das proteínas contráteis que muda a expressão de suas isoformas da cadeia pesada (alfa para beta-MHC) com uma sobrecarga pressórica, na tentativa de manter a geração de força, onde ocorre

um aumento do débito cardíaco com a finalidade de impedir que o miocárdio entre em insuficiência. A isoforma alfa-MHC tem uma velocidade de hidrólise de ATP maior que a isoforma beta-MHC. Esta alteração pode ser avaliada pela determinação da atividade da ATPase da miosina (BARANY, 1967). Poucos óleos essenciais tem a atividade ATPásica miosínica cardíaca avaliada, como o eugenol e o eucaliptol (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005).

Em pacientes hipertensos, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é um poderoso fator preditivo independente de morbidade e mortalidade, predispondo à insuficiência cardíaca, taquiarritmia ventricular, fibrilação atrial e acidente vascular cerebral embólico. Tem havido muitos avanços na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na hipertrofia dos cardiomiócitos por sobrecarga de pressão. Em modelos animais, a AII, a aldosterona, a noradrenalina e a pró-renina aceleram a hipertrofia dos cardiomiócitos por sobrecarga de pressão e promovem fibrose cardíaca, que é o marco principal da HVE patológica (LIBBY, 2010).

3.6. Contratilidade miocárdica

A HAS sustentada pode acarretar em mudanças morfofuncionais da contratilidade miocárdica. As proteínas que realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, sendo denominadas proteínas contráteis, enquanto que a tropomiosina e a troponina são proteínas moduladoras da contração (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008).

A contração celular ocorre a partir da hidrólise do ATP em ADP + Pi, através da atividade ATPásica da cabeça da miosina, flexionando-a, tornando possível sua ligação com o filamento de actina. O Pi é liberado e ocorre uma forte ligação entre actina e miosina (o segmento fino, actina, e o segmento grosso, miosina), posteriormente a cabeça organiza-se (LIBBY, 2010).

Durante o potencial de ação cardíaco, o cálcio entra na célula via canais ativado por despolarização, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. O influxo de cálcio promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares, sendo essa liberação denominada liberação de cálcio induzida por cálcio. A $[Ca^{2+}]_i$ resulta da combinação do influxo de cálcio pelo sarcolema e a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (RS), (o principal reservatório intracelular de cálcio) e é o íon que, por ligação direta aos

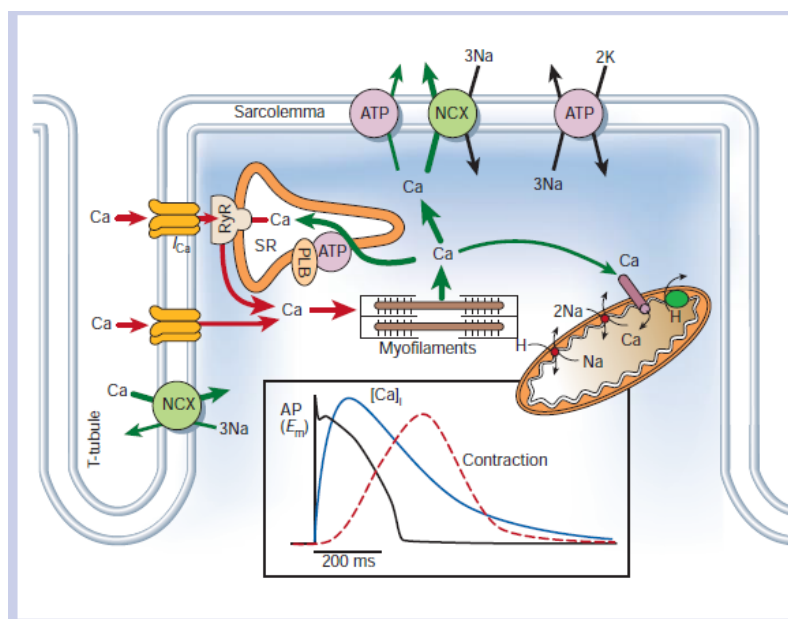
miofilamentos, será o responsável pela gênese da força e encurtamento muscular (BERS, 2002).

A seguir, ocorre o relaxamento do cardiomiócito em que uma série de fenômenos, que ocorrem praticamente ao mesmo tempo, decorrentes da dissociação da ligação Ca^{2+} /troponina C, tendem a reduzir os níveis de Ca^{2+} no citosol, através de alguns mecanismos, envolvendo: o início do processo de recaptura do cálcio através do RS (via SERCA ou Ca^{2+} -ATPase do RS), pela extrusão do cálcio através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) do sarcolema, pela bomba de cálcio sarcolemal (Ca^{2+} /ATPase); e o uniporte de cálcio na mitocôndria, dessa forma diminui a concentração de Ca^{2+} intracelular e o músculo relaxa (Figura 1). A quantidade de cálcio expulsa da célula durante o relaxamento deve ser a mesma durante a contração muscular, caso contrário prejudica o funcionamento constante da maquinaria contrátil (BERS, 2002).

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

Conforme Aires (2012), importante fase do relaxamento muscular ocorre quando o Ca^{2+} é sequestrado pelo RS através da (SERCA) Ca^{2+} ATPase de sua membrana. Com a redução da concentração de cálcio no mioplasma, a tropomiosina retorna a sua posição de repouso, bloqueando o local de ligação para a miosina na actina, e a contração não pode ocorrer. Esta bomba tem sua atividade reduzida por um polipeptídeo chamado (PLB) fosfolambam, que se associa fisicamente à bomba quando desfosforilado (Figura 1).

Figura 1. Ilustração de Cardiomiócito - Acoplamento excitação-contracção cardíaca (BERS, 2002).



Diversos autores têm relatado a ação de óleos essenciais sobre a contratilidade miocárdica de cobaias. Como o óleo das folhas de *Blepharocalix salicifolius* (FERNANDES, 2016) e o óleo de cravo (SENSCH et al., 2000), também pertencentes a família Myrtaceae. E de outras famílias, como *Alpinia speciosa*, família Zingiberaceae, (SANTOS et al., 2011), *Schinus areira*, família Anacardiaceae (BIGLIANI et al., 2012), *Costus spirali*, família Costaceae (BRITTO et al., 2011).

Apesar dos inúmeros efeitos benéficos com a utilização de óleos essenciais, temos que levar em consideração que estes podem apresentar efeitos toxicológicos e, portanto merecem ser investigados.

3.7. Parâmetros imunotoxicológicos

O Sistema imune é altamente adaptável, sendo ele o grande responsável por defesas frente a diversos antígenos (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Assim, quando o organismo é exposto a determinados agentes estranhos, promove uma série de eventos com o propósito de eliminar esses agentes, caracterizando dessa forma uma resposta imune (VAZ; TAKEI; BUENO, 2010) e diferentemente de outros sistemas, as células que o compõe são móveis, propriedade que facilita a identificação de moléculas, microrganismos estranhos e

eventuais alterações em células próprias, uma vez que, essas se encontram circulantes pelo organismo (BALESTIERI, 2006).

Vaz, Takei, Bueno, 2010, descreveram que a presença de xenobióticos (como compostos tóxicos de plantas) proporciona a quebra da homeostasia do organismo, desencadeando assim uma resposta imunológica, podendo resultar em uma imunoestimulação ou em uma imunossupressão. Nesse contexto, a imunotoxicologia demonstra-se indispensável para a avaliação do potencial toxicológico de determinadas plantas, a fim de evitar quadros graves de intoxicação. Apesar das plantas medicinais apresentarem amplo emprego na medicina popular, não existem muitos estudos na literatura que relatem os seus possíveis efeitos tóxicos.

São inúmeros os testes imunotoxicológicos que podem ser utilizados para avaliar a possível toxicidade de plantas medicinais, dentre eles destacam-se os ensaios de citotoxicidade (avaliação da viabilidade celular), mutagenicidade (avaliação de mutação celular) e genotóxico (avaliação de danos no material genético) em cultura (Da FONSECA & PEREIRA, 2004), sendo esses eficientes na investigação do perfil toxicológico das plantas usadas pela população.

4. Metodologia

4.1. Material vegetal

As folhas de *Eugenia sulcata* Spring ex Mart foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, (22 ° 12'57.7 "S 41 ° 34'58.5" W), datado de Julho de 2013. Esta espécie foi identificada pelo botânico Dr. Marcelo Guerra Santos. Um espécime foi depositado no Herbário da Faculdade de Formação de Professores (Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil), sob o número de registro RFFP 13,788. A extração do óleo e a identificação dos componentes foi realizada por Lima et al., (2012a). A mesma análise foi realizada no ano de 2013, onde os constituintes encontrados foram semelhantes.

4.2. Animais experimentais

4.2.1. Ratos Wistar Kyoto e SHR

Foram utilizados ratos machos Wistar Kyoto (WK) pesando entre 280-300 g e Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) pesando entre 240-280 g, ambos com 3 meses de idade, provenientes do Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (23°C ± 2°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, na sala 4 de experimentação do Biotério da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana (RS).

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estavam em concordância com os Princípios Internacionais para a Pesquisa envolvendo Animais (Genebra), e com a legislação brasileira disposta na Lei nº 11.794/2008 (Procedimentos para uso científico de animais) e no Decreto 24.645/34 (Dos Direitos dos Animais). Este projeto foi registrado no SIPPEE e aprovando pela CEUA da UNIPAMPA sob protocolo nº 034/2015.

4.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, as concentrações utilizadas foram descritas por Barcelos et al., 2010.

Grupos (N=8/grupo)	WK	SHR
Controle	Água e ração à vontade. Injeção diária, i.p. de veículo (DMSO 0,5% em salina 0,9% - 200 µL).	Água e ração à vontade. Injeção diária, i.p. de veículo (DMSO 0,5% em salina 0,9% - 200 µL).
<i>Eugenia sulcata</i>	Água e ração à vontade. Óleo essencial diluído no veículo (10 mg.Kg ⁻¹).	Água e ração à vontade. Óleo essencial diluído no veículo (10 mg.Kg ⁻¹).

4.3. Avaliação da contratilidade miocárdica

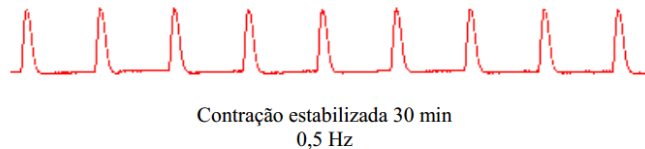
O tórax dos ratos foi aberto para a extração do coração e os músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE) foram dissecados e colocados em uma solução nutritora (20 mL) de Krebs-Henseleit, pH 7.4, aerada com CO₂ 5% e O₂ 95%, a 29° C. Os músculos foram fixados por argolas, e então presos em uma extremidade fixa e outra ligada a um transdutor de força. A estimulação elétrica dos músculos papilares se deu através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo (pulsos retangulares com duração de 12 ms e voltagem um e meio vezes o limiar). A frequência de estimulação foi de 0,5 Hz. Os músculos foram estirados até L_{max} (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais:

4.3.1. Força Isométrica

A força desenvolvida (Figura 2) foi normalizada pelo peso do músculo (g/mg de músculo) e medida por meio de transdutor de força isométrica (TSD125- Biopac Systems,

Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Biopac Systems, Inc; CA) e registrada por um sistema de aquisição de dados (MP100 Biopac Systems, Inc; CA) conectado a um microcomputador. Para a aquisição dos dados foi utilizado registro de amostragem de 500 amostras/segundo (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008).

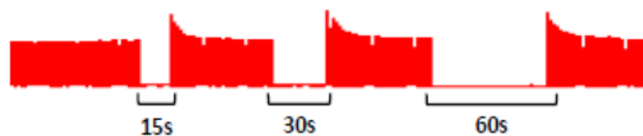
Figura 2. Registro típico de contração estabilizada de músculo papilar de rato.



4.3.2. Potenciações relativas após pausas (PPP)

A potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos (Figura 3) foi obtida com o objetivo de avaliar, de forma indireta a contribuição do retículo sarcoplasmático (RS) na contração. Foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração anterior à pausa (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008).

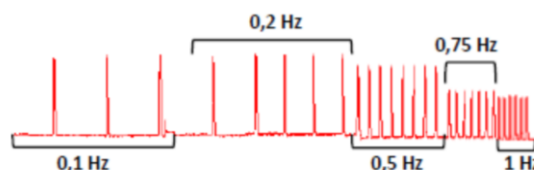
Figura 3. Registro típico de potenciações pós-pausas de músculo papilar de rato.



4.3.3. Frequência de estimulação elétrica

Os músculos papilares foram submetidos às crescentes frequências de estimulação elétrica: 0,1, 0,2, 0,5, 0,75 e 1 Hz (Figura 4) (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008).

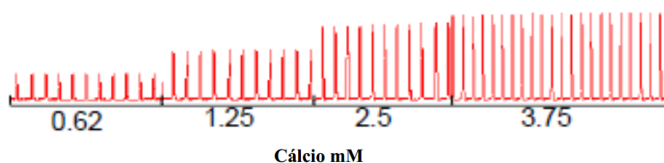
Figura 4. Registro típico de diferentes estimulações elétricas em músculo papilar de rato.



4.3.4. Resposta inotrópica ao Cálcio

Curva dose-resposta inotrópica ao cálcio nas concentrações crescentes de CaCl_2 (0,62; 1,25; 2,50 e 3,75 mM) – Resposta ao cálcio (g/mg) (Figura 5) (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008).

Figura 5. Registro típico de contrações de músculo papilar de rato submetido à crescentes concentrações de cálcio.



4.3.5. Resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5}M) em músculo papilar de rato.

A resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5}M) (Figura 6), avalia a interferência do tratamento na resposta β -adrenérgica no músculo cardíaco. Foi normalizada como a razão entre a amplitude máxima na força de contração na presença do isoproterenol e a amplitude da contração estabilizada anterior ao isoproterenol (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995).

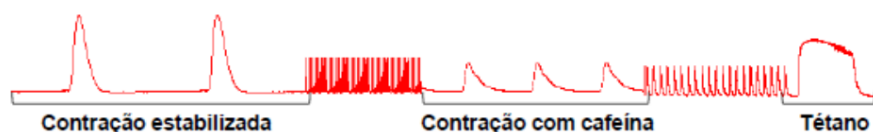
Figura 6. Registro típico de resposta inotrópica β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-5}M) em músculo papilar de rato.



4.3.6. Contrações tetânicas

A avaliação dos efeitos do extrato nas contrações tetânicas (Figura 7), foi obtida após 30 minutos de tratamento com 5 mM de cafeína, em uma frequência de 10 Hz, e duração de 15 segundos, como previamente descrita (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008; MOREIRA et al., 2012).

Figura 7. Registro típico de contrações tetânicas de músculo papilar de rato.



4.4. Análises Bioquímicas

4.4.1. Avaliação da atividade específica da ATPase miosínica

4.4.1.1 Preparação da fração miosínica

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

4.4.1.2. Medida da ATPase miosínica

Para a avaliação bioquímica da capacidade do coração de gerar força contrátil, a atividade ATPásica da miosina foi determinada usando um meio tampão (pH 7,0) contendo 50 mM HEPES; 5mM de CaCl_2 ; 0,6 M KCl; 1 mM de ATP em um volume final de 200 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 (P_i), 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.

4.4.2. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina

O efeito do óleo na atividade da ECA sérica foi determinado como previamente descrito por Friedland & Silverstein (1976) e Oliveira; Santos; Krieger (2000). O sangue dos animais foi coletado via artéria aorta abdominal. Amostras de soro (5 μ L), foram incubadas em 40 μ L de tampão (borato de sódio 0,4 M, NaCl 0,9M, pH 8,3), 125 μ L do substrato (5mM Hip-His-Leu) Hipuril-histidina-leucina, por 20 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de NaOH 0,34M. O produto His-Leu foi medido fluorimetricamente a 365 nm de excitação e 495 nm de emissão após a adição de 25 μ L de o-phthaldialdehyde (2%) em metanol. Para corrigir a fluorescência intrínseca do soro, brancos foram incluídos pela adição de Hipo-His-Leu e o-phthaldialdehyde.

Para determinação da ECA cardíaca, parte do VE dos animais foram homogeneizados em tampão borato (100 mg de tecido/mL de tampão). Amostras (10 μ L) foram incubadas da maneira supracitada para a ECA sérica. A curva de calibração com o produto (His-leu) foi incluída em cada experimento.

4.5. Índice de hipertrofia do coração

Após a retirada do papilar do VE, o ventrículo direito foi separado do ventrículo esquerdo (VE) e o septo interventricular foi considerado parte do VE. A razão do peso ventricular pelo peso corporal (VE/PC) foi usada como índice para a estimativa da hipertrofia cardíaca como descrito por Andrade et al., 2007; Barauna et al., 2007; Piratello et al., 2010; Campos, et al., 2015.

4.6. Avaliação imunotoxicológica

4.6.1. Preparação da cultura celular de linfócitos

As culturas de linfócitos foram preparadas utilizando 0,5 mL de sangue venoso (coletado por venopunção de voluntário) e imediatamente transferidas para o meio de cultura contendo 10mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina, conforme descrito anteriormente (DOS SANTOS-MONTAGNER et al., 2010) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pampa (nº 27045614.0.0000.5323). As células foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ até o momento do uso. A cada 72 horas foi realizada a troca do meio por outro preparado da mesma forma. As células foram mantidas desta maneira até o momento do uso.

4.6.2. Tratamentos das culturas

Todas as culturas receberam a adição do composto teste em um volume final de 100µL. Os grupos a serem testados foram: controle negativo (CN) com tampão fosfato pH 7.4, controle positivo genotóxico (CP) com peróxido de hidrogênio (10 µM) e o óleo essencial de *Eugenia sulcata* (ES) que foi testado em 3 concentrações (100, 10 e 1 µg/mL).

4.6.3. Análise da citotoxicidade

O parâmetro analisado para avaliação da citotoxicidade foi a viabilidade celular, através da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripan (BUROW et al., 1998). Para isso, foi utilizada uma alíquota da amostra e colocada em contato com o corante Azul de Tripan, o qual cora as células inviáveis de azul. A análise foi realizada através da visualização em microscópio em aumento de 400x. Foram contadas 100 células por lâmina.

4.6.4. Análise da genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada através do Teste Cometa, como descrito por Singh (1995). Para tanto, preparou-se as lâminas previamente cobertas com agarose de alto ponto de fusão, com uma tomada de amostra homogeneizada com agarose de baixo ponto de fusão. As mesmas, após secagem, foram dispostas em uma cuba contendo solução de Lise por uma semana. Depois desse processo, as lâminas foram submetidas à corrida eletroforética – 20min, 300mA, 25V; em tampão NaOH 300mM e pH >13. Realizada a eletroforese, as lâminas

foram neutralizadas e secas em temperatura ambiente. Posteriormente a secagem, as lâminas foram fixadas, secadas novamente, reidratadas e coradas com solução de nitrato de prata, e secas a temperatura ambiente. Os danos ao DNA foram classificados de acordo com o índice de dano, avaliado a partir da migração das proteínas do DNA, que pode variar de 0 (não há dano), até 4 (há o máximo de dano). Os danos de DNA foram avaliados como índice de dano ao DNA (ID). O dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos; o índice de dano varia de 0 (100 células x 0 quando não ocorreu dano) a 4 (100 células x 4, quando ocorreu o máximo de dano).

4.6.5. Análise da mutagenicidade

O teste de formação de Micronúcleos foi o parâmetro empregado para avaliação de mutagenicidade. Para isso, foram utilizadas as culturas descritas anteriormente e o método foi realizado segundo a técnica descrita por Schmid (1975) e apresentada na forma de índice como descrito por Fenech (2000).

4.7. Análise estatística

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

5. Resultados e Discussão

5.1. Contratilidade miocárdica

5.1.1 Análise da força isométrica

A força isométrica do músculo papilar foi utilizada para avaliar a contratilidade miocárdica dos animais tratados por 30 dias com o óleo essencial da *E. sulcata*. A força exercida pelo músculo papilar do ventrículo esquerdo é mostrada na Figura 8. Segundo Moreira et al., (2012), a força dos músculos papilares dos animais WK e SHR aos 3 meses de idade são semelhantes.

Notamos que o tratamento com o óleo essencial das folhas de *Eugenia sulcata* na concentração de 10 mg/kg, não modificou a força tanto em animais WK como em SHR, demonstrando que não houve prejuízo na contratilidade miocárdica na concentração utilizada e no período avaliado.

O óleo essencial das folhas de *Blepharocalix salicifolius* (10 mg/kg) também foi testado em animais SHR e demonstrou que o tratamento não alterou a capacidade de geração de força contrátil, tanto nos animais WK quanto nos SHR, corroborando com nossos achados (FERNANDES, 2016).

Ao contrário, em átrio esquerdo de ratos, eletricamente estimulado, o óleo essencial das folhas de *Alpinia speciosa* (0,1 e 1 mg/mL) que apresenta como constituinte majoritário o 4 terpineol (37%), demonstrou uma diminuição da força contrátil, mostrando que o óleo apresenta efeito cardiodepressor (SANTOS et al., 2011). O óleo de cravo possui o óxido de β -cariofileno e eugenol em sua composição, ao ser analisada a força de contração cardíaca de ratos, foi observada uma diminuição significativa nos animais tratados (SENSCH et al., 2000).

O eugenol e o eucaliptol, em diferentes concentrações, apresentaram diminuição da força de contração cardíaca, mostrando efeito inotrópico negativo no músculo papilar de ratos Wistar (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005). Em pesquisa com administração de estragol, também em ratos normotensos, houve uma redução na produção de força muscular isométrica de maneira concentração-dependente (TREVISAN, 2015).

Em corações de camundongos, foi observado um efeito inotrópico negativo com a administração do óleo essencial das folhas de *Schinus areira L* (300 mg/kg). Neste óleo foram

identificados como principais constituintes o, β cariofileno e o α pineno (BIGLIANI et al., 2012). O extrato aquoso de *Costus spiralis* (Jacq.) (150 mg/mL) também reduz a contratilidade, em átrios de porquinhos da Índia (BRITTO et al., 2011). Da mesma maneira o extrato bruto das folhas de *Citrus sinensis* (L.) (2000 mg/kg) e de *Psidium guajava* L. demonstraram efeito inotrópico negativo em átrios de porquinhos da Índia (Oliveira et al., 2005; Garcia et al., 2003).

Por outro lado, Schneider, 2015 avaliou o extrato aquoso da casca de *Scutia buxifolia* Reissek (100mg/kg) também em animais hipertensos, demonstrando que o tratamento foi capaz de aumentar a força de contração cardíaca em SHR. Bem como Dimo et al., (2003), ao analisar os efeitos de *Bidens pilosa* L. sobre o sistema cardiovascular de ratos anestesiados, verificou um inotropismo positivo. Da mesma forma o tratamento com extrato aquoso de *Campomanesia xantocarpa* (500 mg/kg) apresentou efeito inotrópico positivo em ratos com síndrome metabólica induzida pela frutose (SANT'ANNA, 2012). Os extratos aquosos de *Annona muricata* e *Bixa orellana* e de *Erythrina velutina* (fração de acetato de etila) demonstraram inotropismo positivo em átrios de porquinhos da Índia (BIPAT et al., 2016; PASSOS et al., 2013).

Como podemos observar existem alguns estudos onde as plantas medicinais apresentam os constituintes majoritários semelhantes aos da *Eugenia sulcata*. Nosso estudo demonstrou que o óleo não prejudica a força de contração cardíaca, como observado em outros óleos com os mesmos constituintes. Logo, *E. sulcata* apresenta efeito anti-hipertensivo (SANTOS et al., 2014) sem quaisquer alterações na contratilidade miocárdica, podendo vir a tornar-se uma alternativa benéfica para o uso no tratamento de indivíduos hipertensos.

5.1.2. Análise das potenciações pós pausa (PPP)

A PPP foi realizada para determinar se o óleo essencial pode interferir na função do retículo sarcoplasmático (RS), uma organela importante na geração de força contrátil. Sabe-se que em músculos cardíacos de mamíferos a primeira contração após curto período de pausa é potencializada (VASSALLO; OLIVEIRA; STEFANON, 2008; LEITE; VASSALLO; MILL, 1991; MILL; VASSALLO; LEITE, 1992).

As contrações obtidas após pausas têm maior dependência da liberação de cálcio pelos seus estoques intracelulares do que pelo influxo de cálcio pelo sarcolema. Desta forma, as

mensurações das PPP visam avaliar a atividade do RS, tanto a magnitude de liberação de cálcio ativador quanto, a capacidade de recaptar cálcio (WUSSLING & SZYMANSKI, 1980; WUSSLING & SZYMANSKI, 1986; LEITE; VASSALLO; MILL, 1988; LEITE; VASSALLO; MILL et al., 1991; MILL; VASSALLO; LEITE, 1992; MILL et al., 1994).

Foi observado que o óleo de *E. sulcata* não modificou a função do RS, visto que em todos os tempos testados, 15, 30 e 60 segundos, não houve diferenças significativas na força desenvolvida pelos animais tratados (Figura 9).

O tratamento com o extrato aquoso de *Scutia buxifolia* Reissek, realizado em animais espontaneamente hipertensos, e de *C. xanthocarpa* em ratos com síndrome metabólica, também não apresentaram alteração na função do RS (SCHNEIDER, 2015; SANT'ANNA, 2012). Da mesma forma o óleo essencial de *B. salicifolius* mostrou que o tratamento não influenciou neste funcionamento (FERNANDES, 2016).

Em contra ponto, o PPP dos músculos papilares foi potencializado na presença de eugenol, eucaliptol, e estragol (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005; TREVISAN, 2015) em virtude do aumento dos estoques de cálcio no interior da célula, provenientes do retículo sarcoplasmático.

5.1.3. Análise dos músculos papilares frente às mudanças de frequência de estímulo

A força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica tem como objetivo avaliar em músculos papilares do VE se os mecanismos de extrusão de cálcio são preservados. Não foi observada alteração no desenvolvimento de força com a variação da frequência de estimulação elétrica nos músculos dos animais em ambos os grupos experimentais (Figura 10), então podemos sugerir que os miócitos destes animais possuem os mecanismos de extrusão de cálcio inalterados.

A frequência de estimulação elétrica foi potencializada em ratos SHR tratados com o extrato de *S. buxifolia* Reissek, sugerindo que em alguns dos mecanismos do trânsito de cálcio o extrato esteja agindo (SCHNEIDER, 2015).

5.1.4. Efeito inotrópico ao cálcio

No miocárdio, o influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular do RS, com subsequente aumento transiente da concentração intracelular de Ca^{2+} , que resulta na ativação dos miofilamentos, produzindo a contração muscular (AIRES, 2012).

O cálcio desempenha um papel crucial na regulação da fase de contração e relaxamento do músculo cardíaco. O aumento da concentração de cálcio citosólico faz com que a interação deste com a troponina C também aumente e assim ative o processo contrátil, ou seja, quanto maior a quantidade de cálcio disponível maior a força gerada (LIBBY, 2010; BERS, 2002). O tratamento com o óleo essencial de folhas de *Eugenia sulcata* não modificou o efeito inotrópico ao cálcio, sugerindo que este óleo essencial, não interferiu nos canais de cálcio da membrana, não prejudicando a força de contração (Figura 11).

Com o aumento da concentração de cálcio extracelular, ocorre um aumento na capacidade de geração de força muscular, porém o óleo essencial *B. salicifolius* também não alterou a força de contração cardíaca nos animais tratados (FERNANDES, 2016).

Já, os animais SHR tratados com o extrato aquoso de *Scutia buxifolia* demonstraram uma potencialização deste efeito, sugerindo que o extrato possa ativar os canais de cálcio de membrana (SCHNEIDER, 2015). Da mesma forma o extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* apresenta efeito inotrópico ao cálcio potencializado em ratos com Síndrome Metabólica (SANT'ANNA, 2012).

O extrato de *Erythrina velutina* mostrou um inotropismo positivo ao cálcio, em átrios de porquinhos da Índia. O extrato possivelmente leva a uma liberação aumentada de cálcio a partir das reservas intracelulares, aumentando a concentração citoplasmática de cálcio, elevando assim a força de contração cardíaca quando comparada a seu controle (PASSOS et al., 2013).

Em contraste, o tratamento com *eugenol* levou a um efeito inotrópico negativo ao cálcio, sugerindo a inibição dos canais de cálcio da membrana, confirmado por experimentos com corrente de cálcio (DAMIANI et al., 2004). Soares et al., 2005 também demonstraram que o óleo essencial de eucaliptol tem efeito inotrópico negativo ao cálcio.

5.1.5. Avaliação dos receptores β -adrenérgicos

O isoproterenol diminui o tempo de ativação da contração cardíaca atingindo o pico máximo de contração mais rápido, resulta também em um aumento da força gerada, a estimulação β -adrenérgica aumenta o influxo de Ca^{2+} transmembrana e produz uma rápida recaptação do cálcio pelo RS. Para este protocolo utiliza-se 0,62 mM de cálcio para não haver um *overload* de cálcio, o que pode levar a uma diminuição de força (SOARES et al., 2005). A ativação beta-adrenérgica do músculo cardíaco culmina com a fosforilação dos canais de cálcio de membrana e dos canais de rianodina, levando a um aumento de cálcio intracelular (NEGRONI et al., 2015).

A avaliação dos receptores β -adrenérgicos dos músculos papilares foi realizada através da administração de isoproterenol. Como apresentado na figura 12, o tratamento com o óleo essencial de *Eugenia sulcata* não mostrou alteração neste parâmetro, sugerindo que o óleo essencial parece não interferir nos receptores β -adrenérgicos destes músculos.

Igualmente, o tratamento com o óleo essencial das folhas de *B. salicifolius*, em ratos SHR e WK, não demonstrou nenhuma alteração quando foi administrado o isoproterenol (FERNANDES, 2016).

Trevisan, (2015) utilizou este protocolo para avaliar se o efeito inotrópico negativo gerado pelo estragol seria revertido com a administração do isoproterenol. Notaram que com a adição do isoproterenol houve aumento na força de contração muscular, em relação à gerada no controle, em virtude de sua atividade beta-adrenérgica. Os músculos papilares foram novamente estabilizados em solução normal e então foi administrado o estragol, onde mostrou uma diminuição na força de contração cardíaca, por último, foi adicionado novamente o isoproterenol e os parâmetros de força foram os mesmos obtidos com o uso do estragol. Demonstrando, desta forma, que o isoproterenol não apresentou capacidade de reverter o efeito inotrópico negativo causado pelo estragol.

Da mesma maneira o isoproterenol não conseguiu reverter o decréscimo de força causado pelo extrato aquoso de *Costus spiralis* (Jacq.) (BRITTO et al., 2011). Os efeitos sobre os músculos tratados com *S. buxifolia*, de forma crônica, mostraram um decréscimo significativo da força de contração muscular quando administrado isoproterenol, possivelmente para evitar um *overload* de cálcio, pois apresenta um efeito inotrópico positivo ao cálcio (SCHNEIDER, 2015).

Em contra ponto o efeito inotrópico negativo que foi encontrado com o *eugenol* e com o *eucaliptol* foi revertido com isoproterenol (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005). No nosso estudo, o tratamento com o óleo essencial de *E. sulcata* parece não ativar e nem inibir os receptores β -adrenérgicos.

5.1.6. Avaliação das contrações tetânicas

O potencial de ação do músculo cardíaco é longo, isso impede que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização, portanto, o tétano cardíaco não pode ser alcançado em condições normais, então, é utilizada a cafeína, que depleta o cálcio RS e mantém os canais de rianodina abertos (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994). Além disso, submetemos o músculo a uma frequência de estimulação de 10 Hz para permitir a ativação máxima da maquinaria contrátil dos músculos papilares (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995).

Em miocárdio de ratos, as contrações tetânicas obtidas após tratamento com cafeína são menores que as contrações em condição estabilizada. Isto sugere que a ativação da maquinaria contrátil nas contrações tetânicas é dependente da entrada de cálcio pelo sarcolema e a manutenção da contração é dependente da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995).

Observamos que o tratamento com *Eugenia sulcata* mostrou um aumento na força de contração tetânica (Figura 13), sugerindo que o óleo essencial pode influenciar a entrada de cálcio pelo sarcolema e/ou a sensibilidade dos miofilamentos (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995). Uma vez que o efeito inotrópico ao cálcio não foi modificado com o tratamento podemos sugerir que a entrada de cálcio sarcolemal não esteja influenciando neste parâmetro avaliado.

As contrações tetânicas também foram potencializadas com o tratamento com o extrato aquoso de *Scutia buxifolia* Reissek em animais SHR (SCHNEIDER, 2015) e com o extrato de *Campomanesia xanthocarpa* em animais com Síndrome Metabólica (SANT'ANNA, 2012).

Em contra ponto, os tratamentos com os óleos essenciais de eugenol e eucaliptol mostraram uma diminuição significativa nas contrações tetânicas (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005). E o tratamento com óleo essencial de *B. salicifolius* não alterou a força das contrações tetânicas (FERNANDES, 2016).

5.2. Índice de hipertrofia cardíaca

A relação peso VE/PC é considerada um índice de hipertrofia ventricular. A hipertrofia cardíaca constitui-se num mecanismo adaptativo do coração, em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional (MILL et al., 1994).

A tabela 1 mostra o peso corporal dos animais durante todo o tratamento, demonstrando que não houve alteração. Os resultados mostram que o óleo de *Eugenia sulcata* foi capaz de diminuir a relação peso VE/peso corporal nos animais WK bem como nos animais SHR, demonstrando uma hipotrofia nos animais normotensos e um antihipertrofia nos animais hipertensos, como mostrado na figura 14.

Em seus estágios iniciais, o ventrículo hipertrofiado é capaz de compensar uma carga de trabalho aumentada, mas nos estágios posteriores, os miócitos cardíacos ficam comprometidos causando descompensação e isso pode levar à insuficiência cardíaca. A causa mais comum de hipertrofia cardíaca é a hipertensão arterial (SHAPIRO; KLEINEBENNE; MCKENNA, 1985). Como a hipertrofia em seres humanos é geralmente associada com hipertensão crônica, o SHR é um modelo realista de hipertrofia humana (BROOKSBY; LEVI; JONES, 1992).

O óleo essencial das folhas de *A. zerumbet* (10 mg/kg) que apresenta como constituinte majoritário o 4-terpineol, foi capaz de reverter a hipertrofia cardíaca em animais hipertensos com 3 meses de idade (BARCELOS et al., 2010), o extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (100 mg/kg) também foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca em ratos Wistar infartados (ZAPATA-SUDO et al., 2014).

A relação VE/PC dos ratos submetidos ao tratamento com *S. buxifolia* não apresentou modificações entre os animais dos grupos tratados e seus respectivos controles (SCHNEIDER, 2015).

5.3. Análises Bioquímicas

5.3.1 Atividade da ATPase Miosínica

O tratamento com o óleo essencial de *Eugenia sulcata* demonstrou um aumento significativo na atividade específica da ATPase miosínica (Figura 15). Este aumento na atividade enzimática aumenta a quantidade de energia disponível, refletindo-se em acréscimo da capacidade de geração de força contrátil pelo músculo cardíaco.

Igualmente, Fernandes, 2016 demonstrou que houve um aumento da atividade da enzima em animais SHR tratados com o óleo essencial de *B. salicifolius* da mesma forma o tratamento com o extrato aquoso de *Scutia buxifolia* também aumentou a atividade da ATPase miosínica em SHR (SCHNEIDER, 2015).

Já os óleos eugenol e eucaliptol que causam efeito inotrópico negativo, os autores não encontraram quaisquer diferenças na atividade da ATPase miosínica, os resultados foram semelhantes no tratamento e nos controles (DAMIANI et al., 2004; SOARES et al., 2005).

O aumento da geração de energia pela ATPase miosínica cardíaca, provavelmente, auxilia para que este óleo não afete negativamente o funcionamento do músculo cardíaco na geração de força contrátil.

5.3.2. Atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e cardíaca

Observamos que a atividade cardíaca da enzima mostrou uma diminuição significativa nos animais tratados, tanto nos WK quanto nos SHR, e quando a ECA foi medida no soro houve uma diminuição significativa apenas nos animais hipertensos, logo o óleo essencial de *Eugenia sulcata* apresentou uma inibição da atividade da ECA (Figura 16).

Sharifi et al., (2013) demonstraram uma diminuição da atividade da ECA de *Berberis integerrima* (Berberidaceae), *Crataegus microphylla* (Rosaceae), *Nymphaea alba* L. (Nymphaeaceae), *Onopordon acanthium* L. (Asteraceae), *Quercus infectoria* (Fagaceae), *Rubus* sp. (Rosaceae), bem como o extrato de *Cynara scolymus* (VILLIGER et al., 2015).

O óleo essencial de *Ajuga pseudoiva* também apresentou uma inibição da atividade da ECA em pulmões de coelho (MANSOUR et al., 2013). Jaarin et al., 2015 avaliaram a atividade cardíaca da ECA sérica em ratos hipertensos induzidos com L-NAME e tratados com óleo essencial de *Nigella sativa*, demonstrando que houve uma diminuição na atividade.

Os extratos fenólicos de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* apresentaram uma diminuição significativa na atividade da ECA sérica, os autores atribuem a atividade encontrada a presença de flavonoides nos dois extratos (IRONDI, et al., 2016). Fernandes, 2016 demonstrou que houve uma redução significativa na atividade da enzima cardíaca tanto nos animais SHR quanto WKY tratados 30 dias com *B. salicifolius*, sem quaisquer alterações na ECA sérica.

Sikora; Broncel; Mkiciuk-Olasik, (2014) analisaram o efeito do tratamento de *Aronia melanocarpa* (1-300 µg/mL) em humanos e demonstraram uma inibição na ECA sérica dos pacientes. Extrato de *Cecropia pachystachya* também se demonstrou eficaz em diminuir a atividade da ECA renal de ratos que foram nefrectomizados (MAQUIAVELI et al., 2014). Os extratos de duas espécies de *Zingiber officinale* foram avaliados em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Os resultados mostraram que houve uma diminuição significativa da enzima sérica dos animais (AKINYEMI; DEMILUYI; OBOH, 2014).

Já em animais hipertensos tratados com *S. buxifolia* a análise da enzima conversora de angiotensina sérica e cardíaca não demonstrou alteração na sua atividade (SCHNEIDER, 2015).

5.4. Análise imunotoxicológica

5.1.1. Viabilidade celular

Na figura 17, podemos observar os resultados da viabilidade celular para linfócitos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Eugenia sulcata*. Verificou-se que o controle positivo (CP) apresentou inviabilidade de 11% quando comparado ao controle negativo (CN), e que ambas as doses do óleo não causaram inviabilidade celular quando comparados ao CN. Estes resultados mostram que nas concentrações testadas o óleo não apresentou efeito citotóxico.

Em contraste o óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. que apresentou em sua composição química o α -Pineno, β -Pineno e o β -Cariofileno, quando foi testado frente à viabilidade celular promoveu efeito citotóxico a partir de concentrações acima da DL50/1000 para leucócitos e macrófagos humanos (DUARTE, 2016). Ao investigar o efeito citotóxico do composto α -Pineno, frente a culturas de fibroblastos na concentração de 50 µg/mL também constataram uma baixa citotoxicidade (SOBRAL-SOUZA et al, 2014).

O extrato hidroalcolico de *Euphorbia tirucalli* foi avaliado em cultura celular de leucócitos, os autores demonstraram que houve um aumento no percentual de células inviáveis com o aumento das concentrações do extrato que foram administradas, mostrando então um efeito citotóxico em altas concentrações de *E. tirucalli* (MACHADO et al., 2016).

5.1.2. Índice de dano de DNA

Na figura 18, que avalia o índice de dano de DNA através do teste cometa, observamos que há diferença entre o grupo CN e CP e que todas as concentrações do óleo das folhas de *Eugenia sulcata* mostraram dano significativo quando comparados ao grupo CN. Porém o óleo nas diferentes concentrações apresenta um aumento no índice de dano ao DNA de no máximo 50% quando comparado ao CP, demonstrando assim uma baixa genotoxicidade nas concentrações testadas.

O óleo de *Schinus molle* L apresentou dano significativo para macrófagos humanos quando comparados ao grupo CN, apresentam mais de 20% de dano no DNA. Em contrapartida, o óleo essencial não provocou danos de DNA significativos em nenhuma das concentrações testadas na cultura de leucócitos humanos (DUARTE, 2016).

A adição do extrato hidroalcolico de *Euphorbia tirucalli* nas culturas de leucócitos humanos em diferentes concentrações demonstrou dano ao DNA apenas na maior concentração testada (10 % de extrato), nas demais concentrações não houve diferenças nos tratamentos quando comparados ao controle negativo (MACHADO et al, 2016).

5.1.3. Análise de mutagenicidade

A análise de mutagenicidade foi testada em relação à frequência de micronúcleos para leucócitos humanos, como mostrado na figura 19. Podemos observar que não houve diferenças estatísticas nas concentrações do óleo essencial quando comparados ao CN e todas as concentrações do óleo foram significativamente diferentes do CP, demonstrando que o tratamento não apresentou efeito mutagênico para os linfócitos.

Corroborando com nossos resultados o óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. não promoveu alterações na frequência de micronúcleo para LH. Já para os macrófagos apresentou alterações significativas, apresentando frequência de micronúcleo superior ao CN

(DUARTE, 2016). Catanzaro et al., 2012, demonstraram que o α -pineno, nas concentrações de 25, 30 e 35 μ M, foi capaz de promover alterações significativas na frequência de micronúcleos. Em contra ponto Turkez & Aydin (2016) avaliaram o efeito da exposição de linfócitos humanos ao α -pineno frente a parâmetros mutagênicos e demonstraram que a célula analisada não sofreu alterações significativas comparadas ao controle.

O extrato hidroalcolico de *Euphorbia tirucalli* demonstrou uma maior frequência de micronúcleos, indicando assim um risco genotóxico nas concentrações de 1% e 10% do extrato, com aumentos de três a cinco vezes comparados com o controle negativo (MACHADO, et al., 2016).

No óleo essencial das folhas de *E. sulcata*, os constituintes majoritários são semelhantes ao de algumas plantas já descritas que também foram submetidas a testes imunotoxicológicos, porém cada constituinte pode apresentar um perfil toxicológico diferente, podendo variar em cada tratamento e cepa testada.

Nossos resultados com a imunotoxicidade apesar de apresentar um baixo dano ao DNA, não demonstrou efeitos citotóxicos e não apresentou mutagenicidade podendo ser considerado um óleo essencial potencialmente seguro para usos em enfermidades cardiovasculares. Apesar de encontramos alguns estudos na literatura com compostos isolados de plantas medicinais, ainda são insuficientes os estudos acerca de óleos essenciais a fim comprovar possíveis efeitos tóxicos de plantas que são comumente utilizadas pela população.

6. Conclusões

Os efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Eugenia sulcata* na dose de 10 mg/kg administrados por 30 dias foram avaliados na contratilidade miocárdica (força isométrica, PPP, mudanças de frequência de estímulo, resposta inotrópica a concentrações crescentes de cálcio, resposta β -adrenérgica ao isoproterenol e contrações tetânicas), parâmetros bioquímicos (ATPase miosínica e atividade da ECA) em ratos SHR e WK. Além de avaliar em linfócitos humanos a possível toxicidade do óleo essencial em três diferentes concentrações de 100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$, através de testes imunotoxicológicos (citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade).

- Não houve modificação na capacidade de geração de força isométrica nos animais SHR e WK tratados, demonstrando que não houve prejuízo na contratilidade miocárdica, sem alteração na função do RS, na extrusão de cálcio de membrana, não interferindo nos canais de cálcio de membrana bem como na atividade do receptor β adrenérgico, porém as contrações tetânicas foram potencializadas nos animais SHR, sugerindo que o óleo essencial pode influenciar a sensibilidade dos miofilamentos;
- A atividade ATPásica da miosina foi aumentada nos animais SHR tratados sem alteração nos WK.
- A atividade da ECA cardíaca apresentou uma redução nas duas cepas animais e a ECA sérica apenas nos SHR.
- Verificou-se que todas as doses do óleo não causaram citotoxicidade e nem mutagenicidade e apresentaram uma baixa genotoxicidade.

Em suma, o óleo essencial das folhas de *Eugenia sulcata* na concentração de 10mg/kg, mostrou ser benéfico ao sistema cardiovascular de ratos e apresentou baixa imunotoxicidade em linfócitos humanos.

7. Referências

ADAMS, R.P., **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass**, 2007.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2012.

AKINYEMI, A. J.; DEMILUYI, A. O.; OBOH, G. Inhibition of Angiotensin 1 Converting Enzyme Activity by Two Varieties of Ginger (*Zingiber officinale*) in Rats Fed a High Cholesterol Diet. **Journal of medicinal food**, v. 17, (3), p. 317–323, 2014.

ALONSO, R. J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. Buenos Aires: CORPUS, p. 1360, 2004.

APEL, M. A. et al. Chemical composition from *Eugenia* species - Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of essential oil research**.; v. 16, p. 135-138, 2004.

_____. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo-Brasil). **Pharmacology online**, v, 3, p.376-383, 2006.

ARANTES, A. A. & MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** v. 3, (2), p. 111-127, 2002.

ARAÚJO, D. S. D. et al. **Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**, p.39-62. In: F.A. Esteves (ed.). Ecologia de Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Rio de Janeiro, UFRJ/NUPEM, p. 442, 1998.

ANDRADE, T. U. et al. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. **Clinical and Experimental Pharmacological and Physiology**, v. 34, n.7, p. 606-11, 2007.

AYRES, J. E. Prevalence of hypertension in the city of Piracicaba. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v, 57, p. 33-36, 1991.

BALDAUF, C. et al. Ferveu, queimou o ser da erva: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu. V. 11, (3), p. 282-29, 2009.

BALESTIERI, F. M. P. **Imunologia**. Barueri, São Paulo: Manole, 2006.

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

BARAUNA, V.G. et al, Effects of resistance training on ventricular function and Hypertrophy in a Rat Model. **Clinical Medicine & Research** v. 5, n 2, p. 114-120, 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18(1), p. 37-41, Jan./Mar, 2007.

BARCELOS, F. F. et.al. 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 Medicinais**, Botucatu, v.12, n.1, p.48-56, 2010.

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.

BEEVERS, D. G. & MCGREGOR, G. A. **Hipertensão na prática**. 3ª Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2000.

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

BIGLIANI, M. C. et al. Chemical compositions and properties of *Schinus areira* L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits. **Food Chemical Toxicology**. V. 50(7), p. 282-8, 2012.

BIPAT, R. et al. Beneficial effect of medicinal plants on the contractility of post-hypoxic isolated guinea pig atria – Potential implications for the treatment of ischemic–reperfusion injury. **Journal Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 1-7, 2016.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

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

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

_____ et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 408-420, 2006.

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

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

BRITTO, R. M. et al. Aqueous fraction from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaf reduces contractility by impairing the calcium inward current in the mammalian myocardium. **Journal of Ethnopharmacology** v. 138, p. 382– 389, 2011.

BROOKSBY, P.; LEVI, A. J.; JONES, J. V. Contractile properties of ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. **Journal of Hypertension**, v. 10, p. 521–527, 1992.

BUROW, M. E. et al. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants¹. **Cancer Research**. v.58, p. 4940 - 4946, 1998.

CALIXTO, J. B. **Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca**. Ciência hoje, [S.l.], v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001.

CAMPOS, J. C. et al. Increased Clearance of Reactive Aldehydes and Damaged Proteins in Hypertension-Induced Compensated Cardiac Hypertrophy: Impact of Exercise Training. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, Article ID 464195, 11 pages, 2015.

CANE, D. E. **Enzymatic formation of sesquiterpenes**. Chemical Reviews, 90, 1089-1103, 1990.

CATANZARO, I. et al. Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis**, v. 27(4), p. 463 - 469, 2012.

CHAGAS E SILVA, F. et al. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da bacia do rio Tibagi-3. Fazenda Bom Sucesso, Município de Sapopema, PR. **Acta Botânica Brasilica** v. 9(2), p. 289-302, 1995.

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

CONSOLINI, A. E., BALDINI, O. A. N., AMAT, A. G., Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal Ethnopharmacology** v. 66, p.33–39, 1999.

CRACKOWER M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 20, p. 822-828, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, p.1262, 1981.

CRUZ, A.V. M. & KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11(1), p. 47-52, 2004.

CURI, R. & PROCOPIO, J. **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DA FONSECA, C. A. & PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, (7-8), p. 51-54, 2004.

DAMIANI, C. E. N. et al. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 44(6), p. 688-695, 2004.

DE RAMOS, M. F. S. et al. Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian Southeastern maritime forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**: v. 22, p. 109-113, 2010.

DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**. V. 638, p. 90–98, 2010.

DICKOUT, J. G. & LEE, R. M. Blood pressure and heart rate development in Young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology** 274: H794-H800, 1998.

DI STASI, L. C. **Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais**. In: **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, p. 23-27, 1996.

DIMO, T. et al. Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. leaves on the cardiovascular system of anaesthetized rats. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 1135-1139, 2003.

DONATO, A. M. & MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.426-443, 2007.

DUARTE, A. E. et al. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 21, p.743, 2016.

DUARTE, J. A. **Avaliação imunotoxicológica da anacauíta (*schinus molle* L.) em cultura celular**. Dissertação de Mestrado apresentada em Ciências Farmacêuticas, UNIPAMPA, Uruguaiiana, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, (1-2), p. 81-95, 2000.

FERNANDES, M. B. **Avaliando os efeitos do óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius* na função cardiovascular de ratos**. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, UNIPAMPA, Uruguaiiana, 2016.

FERRARIO, C. M. et al. An Evolving Story of Angiotensin II Forming Pathways in Rodents and Humans. **Clinical Science (London)**. V. 126(7), p.461–469, 2014

_____. Intracrine angiotensin II functions originate from noncanonical pathways in the human heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology** 311: H404–H414, 2016.

FREITAS, O. C. et al. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77(1), p.9-21, 2001.

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

GARCIA, E. A. C., NASCIMENTO, V.T., SANTIAGO A.B. S. Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. **Brazilian Journal of medical and biological research**. V. 36, p. 661-668, 2003.

GHELARDINI, C. et al. Local Anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Farmaco** v. 56, p.387-389, 2001.

GONZALEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 24, p. 413-418, 2014.

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

GUTIÉRREZ, R. M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology** v. 117, p. 1-27, 2008.

INTERAMINENSEA, L. F. L. et al. Cardiovascular effects of 1 - nitro - 2 - phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in spontaneously hypertensive rats. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 661–669, 2011.

_____. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 709–716, 2013.

IRONDI, E. A. et al. Inhibitory effect of leaves extracts of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* on two key enzymes involved in obesity and hypertension in vitro. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. V. 5, Issue, 4. August, 2016

JAARIN, K. et al. Mechanisms of the antihypertensive effects of Nigella sativa oil in L-NAME-induced hypertensive rats. **Clinics**, v. 70(11), p. 751-757, 2015.

JOHNSON, L. A. S. & BRIGGS, B. G. Myrtales and Myrtaceae phylogenetic analysis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 71, p. 700-756. 1984.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Artmed, Porto Alegre – Brazil, 2009.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Kuby immunology** 6° Ed. Proto Alegre: Artmed, 2008.

KLEIN, R. M. Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandenses. Pp. 367-375. In: Anais do XXIV Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre 1990. Porto Alegre, **Sociedade Botânica do Brasil**, 1984.

KUMAR, P. et al. S.Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). **Acta Tropica**, v. 122, p. 212-218, 2012

LAHLOU, S. et al.. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**; v. 80(12), p. 1125-1131, 2002.

LANDRUM, L. R. & KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** v. 49(4), p.508-536, 1997.

LEGRAND, C. D. J. & KLEIN, R. M. Mirtáceas. Pp. 45-216. In: P.R. Reitz (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, **Herbário Barbosa Rodrigues**, 1969.

LEITE, C. M; VASSALLO, D. V; MILL, J. G. The effects of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 859-862, 1988.

_____ Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 843-846, 1991.

_____ Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 638-643, 1995.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, p.3-20, 2009.

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

LIMA, G. B., et al. Chemical Composition of Essential Oils and Anticholinesterasic Activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. **latin american journal of pharmacy**, v. 31(1), p. 152-5, 2012a.

LIMA, T. C. et al. Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. **Daru journal of pharmaceutical sciences**, Disponível em: <http://www.darujps.com/content/20/1/23>. 2012b.

LUNARDI, I. et al. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society** v. 12(2), p. 180-183, 2001.

MACHADO, M. M. et al. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 88(1), p. 17-28, 2016.

MANSOUR, M.B. et al. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiviva* Rob. Lamiaceae. **Process Biochemistry** v. 48, p.723-729, 2013.

MAQUIAVELI, C. C. et al. Brazilian embauba (*Cecropia pachystachya*) extract reduces renal lesions in 5/6 nephrectomized rats. **Journal of the Renin-Angiotensin Aldosterone System**, v. 15(4), p. 430–439, 2014.

MARTINS, A.P. et al. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista de Fitoterapia**; v. 11 (2), p. 133-145, 2011.

MCVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae, na interim report. **Taxon** v. 17 (8), p. 354-418. 1968.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 62, p. 215–221, 2010.

MILL, J. G. et al. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1455-1465, 1994.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível in: http://www.paho.org/bireme/index.php?id=286%3Adiamundial-da-hipertensao-2015&option=com_content. Acessado em: Janeiro/2016.

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.

_____ et al. Tension cost correlates mechanical and biochemical parameters in different myocardial contractility conditions. **Clinics**, v. 67, n 5, p. 489-496, 2012.

MOREIRA, F. V. et al. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 20(6), p. 904-909, 2010.

MORENO, P. R. H. et al. Essential oil composition of fruit colour Varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.), v. 64, n. 4, p. 428-432, 2007.

NAKAMURA, M. .J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170–1175, 2010.

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

NEGRONI, J. A. et al. β -adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 81, p. 162-175, 2015.

NEVES, L. J. & DONATO, A. M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Bradea** v. 5(25), p. 273-286, 1989.

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

OKAMOTO, K. & AOKI, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Circulation Journal** Vol. 27, March, 1963.

OLIVEIRA, E. D. Inotropic effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck leaf extracts on the guinea pig atrium. **Brazilian Journal of medical and biological research**. V. 38, p. 111-11, 2005.

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

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/UNICEF. **Cuidados Primários de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 1979**. 64 p. Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978.

PANCHAL, S. K. & BROWN, L. Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. **European Journal Nutrition**., v. 52, p. 397–408, 2013.

PASSOS, A. G. S. et al. The positive inotropic effect of the ethyl acetate fraction from *Erythrina velutina* leaves on the mammalian myocardium: the role of adrenergic receptors. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 928–936, 2013.

PEIXOTO, A. L. & GENTRY, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** v. 13, p. 19-25, 1990.

PETRAKIS, V. P. et al. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behavioural Processes** v. 69, p. 303-322, 2005.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v.1. Rio de Janeiro, **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 1984.

PIRATELLO, A. C. et al. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. **Clinics**. V. 65 (12), p. 1345-1350, 2010.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon Journal**. v. 39, p. 603-13, 2001.

RODRIGUES, A. G. & AMARAL, A. C. F. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: Plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, (Série A. Normas e Manuais Técnicos) **Cadernos de Atenção Básica**; v. 31, p. 56, 2012.

RODRIGUES, R. R. & NAVE, A. G. Heterogeneidade florística das matas ciliares. Pp. 45-71. In: R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho (eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo, Edusp/Fapesp, 2000.

ROMAN, P. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia** v. 76, p. 691-696, 2005.

ROMAGNOLLO, M. B. & SOUZA, M. C., O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, **Brasil**. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20(3), p. 529-548. 2006.

RUILOPE, L. M.; et al. Blood pressure reduction with LCZ696, a novel dual-acting inhibitor of the angiotensin II receptor and neprilysin: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active comparator study. **The Lancet**; v. 375, p. 1255-66, 2010.

SAAD, G. De Azevedo et al. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.3-18, 2009.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

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

SANTOS, B. A. et al. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade. **Phytomedicine**. v. 18, p. 539-543, 2011.

SANTOS, K. T. et al. Effects of Essential Oil From Leaves of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. (Myrtaceae) on Hemodynamic Parameters of Wistar Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**; 32 (6): 944-947, 2013.

_____ Cardiovascular effects of the essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Natural Products**; v. 7, p. 177-183, 2014.

DOS SANTOS-MONTAGNER, G. F. F. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**. v. 24, p. 1410-1416, 2010.

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

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, p. 09-15, 1975.

SCHNEIDER, L. A. **Efeitos do extrato aquoso da casca da *Scutia buxifolia* Reissek sobre parâmetros cardiovasculares em ratos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pampa. Uruguaiana, 2015.

SENSCH, O. et al. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: Comparison of beryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. **British Journal of Pharmacology**. V. 131 (6), p. 1089-1096, 2000.

SHAPIRO, L.M.; KLEINEBENNE, A.; MCKENNA, W. J. The distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: comparison to athletes and hypertensives. *European Heart Journal* Nov; v. 6(11), p. 967-74, 1985.

SHARIFI, N. et al. Discovery of new angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from medicinal plants to treat hypertension using an in vitro assay. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 21, p.74, 2013.

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

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, S. F. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology Journal**. Early Online: p. 1–10, 2015.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 84–191, 1995.

SOARES, M. C. et al. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 453-461, 2005.

SOBRAL, M. P. et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171/>; Acessado em Agosto/2014.

_____ et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acessado em julho/2015.

SOBRAL-SOUZA, C.E. et al. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do α -pineno e carvacrol. **Acta Toxicológico Argentino**. v. 22(2), p. 76-80, 2014.

SOUZA, T. J. T. et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(3), Jul./Set., 2007.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity** v. 8(1), p. 73-94, 2011.

SUÁREZ A.; ULATE, G.; CICCIO, J. F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. **Revista de Biologia Tropical**, v. 48, p. 53-58, 2000.

TALPUR, N. et al. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose– insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, p. 193–199, 2005.

TREVISAN, F. **Efeitos do Estragol na contratilidade de músculo cardíaco de rato**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

TURKEZ, H. & AYDIN, E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of a-pinene. *Toxicology and Industrial Health*, v. 32, n. 1, p. 168–176, 2016.

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

VAZ, A. J., TAKEI, K., BUENO, C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicação**. Guanabara- Rio de Janeiro. Koogau, 2010.

VIEGAS Jr, C. & BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29(2), p. 326-337, 2006.

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

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

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; MARZOUK, B. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. **Food Chemistry**, v. 112, p. 621–626, 2009.

WEBER M. Interrupting the renin-angiotensin system: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist in the treatment of hypertension. **American Journal of Hypertension** v. 12 (Suppl 1), p. 189-94, 1999.

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

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

YAMORI Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension*. **Handbook of Hypertension**. Elsevier, p. 224-39, 1984.

YUNES, R. A. et al. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56, n. 9-10, p. 703-706, 2001.

ZANDI-SOHANI, N.; MHOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and repellent activities of the essential oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 89-94, 2013.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 227, 2014.