

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
CIPHARMA**

MARIANA DUARTE AZEVEDO SILVA

**ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Hancornia speciosa GOMES (MANGABA) EM RATOS**

OURO PRETO – MG – BRASIL

MARIANA DUARTE AZEVEDO SILVA

**ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Hancornia speciosa GOMES (MANGABA) EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Química e farmacologia de substâncias bioativas

Orientadora: Profa Dr^a Andrea Grabe Guimarães
Co-orientadora: Profa Dr^a Carla Penido Serra

OURO PRETO – MG

2012

Aos meus pais, Antônio e Mailde.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar minha vida.

À minha família, pelos valores morais e pessoais adquiridos, fundamentais para formação da minha personalidade. Infinitos agradecimentos aos meus pais, Antônio e Mailde, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Aos meus irmãos, Gabriela e Luís Filipe, pelo carinho e paciência. Ao Ricardo, pelo amor, carinho, paciência, dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho.

À Profa. Andrea Grabe Guimarães, pela amizade, confiança, disponibilidade para ensinar e resolver problemas e grande contribuição para minha formação científica.

À Profa. Carla Penido Serra, pela oportunidade de continuidade do trabalho no laboratório de farmacologia experimental.

Ao Prof. Homero, pela assistência no sistema de aquisição de dados.

À Profa. Neila e ao Prof. Romulo, pela parceria no laboratório de farmacologia e pela contribuição direta ao trabalho.

Ao Prof. Hildeberto, pela ajuda na obtenção da licença ambiental e identificação do material vegetal.

Aos colegas do laboratório de farmacologia experimental, por tornarem a rotina do laboratório prazerosa e pela contribuição diária ao trabalho. Em especial ao Luan, pela ajuda na análise dos dados e à Danielle, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo.

Ao pessoal do biotério, pelo suporte e aprendizado na criação dos animais e ao Wilson, pela ajuda no manejo dos mesmos.

Aos demais laboratórios e funcionários do CiPharma, por estarem sempre dispostos nas soluções das dificuldades.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pela minha formação acadêmica.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos”

Albert Einstein

RESUMO

A *Hancornia speciosa* Gomes, espécie ocorrente no cerrado brasileiro e conhecida popularmente como mangaba, é utilizada tradicionalmente no tratamento da hipertensão arterial (HA), dentre outras aplicações terapêuticas. Estudos desmonstraram que o extrato de *H. speciosa* possui atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina, efeito vasodilatador dependente de óxido nítrico (NO), atividade anti-oxidante e atividade hipotensora *in vivo*. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade do extrato etanólico bruto das folhas de *H. speciosa* sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos *Wistar* machos com alterações pressóricas induzidas pela angiotensina I (ANG I), angiotensina II, noradrenalina (NA) e um inibidor da síntese de óxido nítrico (*L*-NAME), assim como de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O extrato da *H. speciosa* (100 ou 200 mg/kg) ou o veículo foram administrados por via oral (VO) a ratos *Wistar* e, em seguida, estes foram cateterizados para registro da pressão arterial (PA) e administração de diferentes doses de ANG I, ANG II ou NA. A atividade do extrato foi comparada aos fármacos captopril (50 mg/kg), losartana (30 mg/kg) e prazosin (0,1 mg/kg). No segundo protocolo, os ratos cateterizados receberam o *L*-NAME (60 mg/kg, I.V.) e, após 20 minutos, foi administrado o extrato (30 ou 100 mg/kg, I.V.). Os SHR conscientes, previamente cateterizados, foram tratados com o extrato (200 ou 400 mg/kg) por via oral e os sinais cardiovasculares obtidos antes e por 6 horas após o tratamento. Para todos os protocolos foram avaliados os parâmetros cardiovasculares: PA sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos PR, QRS, QT e QTc do eletrocardiograma, cujo sinal foi obtido a partir de agulhas inseridas no tecido subcutâneo. Foi observado que o extrato da *H. speciosa* (200 mg/kg) atenuou o aumento da PAS e PAD em 9,8 % e 18,2 %, respectivamente, após a administração de 100 pmol de ANG I; além de atenuar o prolongamento do intervalo QT em até 11,3 %. Após a administração de 50 pmol de ANG II, o extrato atenuou o aumento da PAS e PAD em 8,6 % e 8,4 %, respectivamente, além de reduzir o prolongamento do intervalo QT em 11,5 %. O extrato (200 mg/kg) também atenuou o aumento da PAS e PAD em 11,1 % e 15,1 % após a administração de 1 nmol de NA, além de reduzir o prolongamento do intervalo QT em 25,8%. Assim, foi demonstrado que o extrato da *H. speciosa* amenizou as alterações pressóricas induzidas pela ANG I, ANG II e NA, assim como

os anti-hipertensivos captopril, losartana e prazosina, além do potencial efeito cardioprotetor sobre o intervalo QT. A atividade hipotensora do extrato (100 mg/kg, I.V.) foi observada nos ratos que receberam o *L-NAME*, com redução máxima da PAS e PAD em 24,6% e 22,4%, respectivamente, e para os SHR conscientes que receberam o extrato na dose de 400 mg/kg, com redução de 12,7% e 17,3% para PAS e PAD, respectivamente. Dessa forma, os resultados obtidos são evidências que sustentam a espécie estudada como promissora para o tratamento das doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Hancornia speciosa Gomes is a specie found in brazilian *cerrado*, a savannah-like vegetation, popularly known as “mangaba”, traditionally used to treat hypertension, among other therapeutic application. Some studies have reported that *H. speciosa* has inhibitory angiotensin-converting enzyme activity, nitric oxide (ON) vasodilatation-dependent, anti-oxidant and *in vivo* hypotensive activity, among others activities. The objective of this study was to evaluate the crude ethanolic leaves' extract of *H. speciosa* activity on cardiovascular parameters in normotensive rats, treated with angiotensin I (ANG I), angiotensin II (ANG II), noradrenaline (NA) and a nitric oxide synthesis inhibitor (*L*-NAME), and also in spontaneously hypertensive rats (SHR). The *H. speciosa* extract (100 or 200 mg/kg) was given orally to male Wistar rats and then, they had the femoral artery and vein catheterized to measure the arterial pressure (AP) and for intravenously (I.V.) administration of ANG I, ANG II and NA. The extract activity was compared with oral captopril (50 mg/kg), losartan (30 mg/kg), and I.V. prazosin (0.1 mg/kg). For the second protocol, the previously catheterized rats received *L*-NAME (I.V.) and after 20 minutes, the extract was administered (30 or 100 mg/kg, I.V.). The SHR were treated with the extract (200 or 400 mg/kg) by oral route and had cardiovascular signals obtained before and after the administration. Cardiovascular parameters evaluated were: systolic (SAP) and diastolic AP (DAP), heart rate (HR) and PR, QRS, QT and QTc intervals of the electrocardiogram. It was observed that the *H. speciosa* extract (200 mg/kg) attenuated the SAP and DAP changes induced by ANG I (100 pmol) in 9.8 % and 18.2 %, respectively, and attenuated the QT interval prolongation in 11.3 %. After ANG II (50 pmol) administration, the extract attenuated the SAP and DAP increase in 8.6 % and 8.4 %, respectively. The extract (200 mg/kg) also attenuated the SAP and DAP increase in 11.1 % e 15.1 %, respectively, after the NA (1 nmol) administration and attenuated in 25.8% the QT interval prolongation. In this way, the *H. speciosa* extract attenuated the arterial pressure changes induced by ANG I, ANG II and NA, similar to captopril, losartan and prazosin, respectively, and had potential cardioprotector effect on the QT interval. It was observed that the extract (100 mg/kg) had a hypotensive activity in the *L*-NAME model, with maximum reduction of 24.6% and 22.4% for SAP and DAP, respectively. For the SHR treated with 400 mg/kg of extract, the maximum reduction was 12.7% and 17.3% for SAP and DAP, respectively. So, these results are evidences that supporting the *H. speciosa* as promising in hypertension treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química das substâncias presentes na fração do extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> . 1 , L-(+)-borsenitol; 2 , ácido quínico; 3 , rutina.....	28
Figura 2	Fotografia da <i>Hancornia speciosa</i> Gomes em seu habitat natural (A). Foto ampliada de flor (B), fruto e folhas (C).....	31
Figura 3	Fotografia da excisada da <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	32
Figura 4	Fluxograma do preparo do extrato etanólico bruto da <i>Hancornia speciosa</i>	32
Figura 5	Desenho esquemático do sistema de aquisição de sinais, rato anestesiado cateterizado em experimentação e obtenção dos sinais de pressão arterial e eletrocardiograma.....	35
Figura 6	Traçado normal do eletrocardiograma (ECG) de rato visualizado no <i>software Windaq</i> - derivações DI, DII e DIII; intervalos do ECG na derivação DII utilizados nas análises; traçado da pressão arterial (PA) com indicação dos pontos utilizados para obtenção da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD).....	37
Figura 7	Protocolo da padronização do modelo de indução de resposta pressórica pela angiotensina I (ANG I) (A) ou angiotensina II (ANG II) (B) por via I.V. após a administração oral do veículo ou dos anti-hipertensivos captopril (A) ou losartana (B).....	38
Figura 8	Protocolos I a V para avaliação da atividade cardiovascular do extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> em ratos Wistar por indução do aumento da pressão arterial por angiotensina I (ANG I), angiotensina II (ANG II), noradrenalina (NA) e metil éster N ^ω -nitro-L-arginina (L-NAME).....	41
Figura 9	Protocolo de avaliação da atividade cardiovascular do extrato da <i>Hancornia speciosa</i> em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar Kyoto (WKY) que receberam por via oral extrato ou veículo.....	42
Figura 10	Cromatograma obtido por RP-HPLC-UV para o extrato etanólico bruto de folhas de <i>Hancornia speciosa</i> . Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 minutos, seguido de 5 minutos isocrático); temperatura 40°C; detecção UV _{210 nm} ; fluxo de 1 ml/min.....	45
Figura 11	Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC) após a administração de diferentes doses de angiotensina I (ANG I), angiotensina II (ANG II) e noradrenalina (NA) por via intravenosa em ratos anestesiados (n = 6). * P ≤ 0,05 representa diferença em relação à variação da dose anteriormente administrada de ANG I; # P ≤ 0,05 representa diferença em relação à dose anteriormente administrada de ANG II; § P ≤ 0,05 representa diferença em relação à dose anteriormente administrada de NA – ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.....	47
Figura 12	Registro do sinal da pressão arterial (mmHg) de rato anestesiado após as administrações intravenosas de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA).....	48

Figura 13	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (controle) e após a administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos anestesiados que receberam veículo ou captopril (50 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6). * Diferença em relação ao período controle do respectivo grupo.** Diferença em relação ao grupo indicado ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	51
Figura 14	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (controle) e após a administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos anestesiados que receberam veículo ou losartana (30 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6). * Diferença em relação ao controle.** Diferença em relação ao grupo indicado ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	42
Figura 15	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após a administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos anestesiados que receberam veículo, captopril (50 mg/kg) e extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de ANG I. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	55
Figura 16	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após a administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos anestesiados que receberam veículo, losartana (30 mg/kg) e extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de ANG II. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	58
Figura 17	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos anestesiados que receberam veículo e extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de NA. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo. ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	61
Figura 18	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e QTc antes (controle) e após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos anestesiados que receberam veículo (V.O.), extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (100 mg/kg, V.O.) e prazosina (0,1 mg/kg, I.V.). Os valores representam a média ± e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de NA. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ** Diferença em relação ao grupo indicado. ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	64
Figura 19	Registro do sinal da pressão arterial de rato anestesiado que recebeu por via intravenosa L-NAME (60 mg/kg) e extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (100 mg/kg).....	65

Figura 20	Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS) após a administração do extrato etanólico de <i>Hancornia speciosa</i> 30 ou 100 mg/kg por via intravenosa em ratos que receberam previamente L-NAME. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6). * Diferença em relação ao grupo veículo ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	66
Figura 21	Variação percentual da pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração do extrato etanólico de <i>Hancornia speciosa</i> 30 ou 100 mg/kg por via intravenosa em ratos que receberam previamente L-NAME. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6). * Diferença em relação ao grupo veículo ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	67
Figura 22	Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), diastólica (PAD, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) antes e em 360 minutos após a administração de veículo ou extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (200 ou 400 mg/kg, V.O.) a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou ratos <i>Wistar Kyoto</i> (WKY) conscientes. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao tempo 0 ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	70
Figura 23	Valor absoluto dos intervalos PR, QRS e QT do eletrocardiograma (ECG, ms) e QTc antes e em 360 minutos após a administração de veículo ou extrato etanólico da <i>Hancornia speciosa</i> (200 ou 400 mg/kg, V.O.) a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou ratos <i>Wistar Kyoto</i> (WKY) conscientes. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao tempo 0. ($P \leq 0,05$, ANOVA <i>one-way</i> seguido de Bonferroni).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gradiente de eluição empregado para obtenção do perfil cromatográfico por HPLC.....	33
Tabela 2	Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 0,1; 1; 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I).....	48
Tabela 3	Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 0,5, 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II).....	48
Tabela 4	Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA).....	48
Tabela 5	Varição percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos que receberam veículo, captopril (50 mg/kg) e extrato da <i>H. speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral.....	56
Tabela 6	Varição percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos que receberam veículo, losartana (30 mg/kg) e extrato da <i>H. speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral.....	59
Tabela 7	Varição percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos que receberam veículo e extrato da <i>H. speciosa</i> (100 ou 200 mg/kg) via oral.....	62
Tabela 8	Varição percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG, antes e por seis horas após a administração de veículo ou extrato da <i>Hancornia speciosa</i> (200 ou 400 mg/kg) via oral em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou <i>Wistar Kyoto</i> (WKY).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCV	Doença Cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.p.m	Erro Padrão da Média
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência Cardíaca
HA	Hipertensão Arterial
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
I.P.	Intraperitoneal
I.V.	Intravenosa
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
L-NAME	Metil Éster N ^ω -Nitro-L-Arginina
NA	Noradrenalina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PE	Polietileno
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High-performance liquid chromatography</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNS	Sistema Nervoso Simpático

SRA	Sistema Renina-angiotensina
TR	Tempo de Retenção
U.V.	Ultra-Violeta
V.O.	Via Oral
WKY	<i>Wistar Kyoto</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E A HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	19
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE RESPOSTA PRESSÓRICA E HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	23
2.3	PRODUTOS NATURAIS E A <i>Hancornia speciosa</i> GOMES.....	26
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	31
4.1.1	Coleta, secagem e moagem.....	31
4.1.2	Prepara do extrato etanólico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	32
4.2	OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO.....	33
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>Hancornia speciosa</i> PARA EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	33
4.4	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	34
4.4.1	Procedimentos cirúrgicos.....	34
4.5	PARÂMETEROS CARDIOVASCULARES.....	35
4.5.1	Obtenção dos parâmetros cardiovasculares.....	35
4.5.2	Análise dos parâmetros cardiovasculares.....	36
4.6	PADRONIZAÇÃO DAS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E ELETROCARIOGRÁFICAS INUZIDAS PELA ANGIOTENSINA I E ANGIOTENSIA II.....	37

4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i> EM RATOS WISTAR.....	39
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i> EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	42
4.9	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i>	45
5.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO.....	45
5.3	PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E ELETROCARDIOGRÁFICAS INDUZIDAS PELA ANGIOTENSINA I, ANGIOTENSINA II E NORADRENALINA.....	45
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i>	53
5.4.1	Modelo de indução de alterações pressóricas pela angiotensina I.....	53
5.4.2	Modelo de indução de alterações pressóricas pela angiotensina II.....	56
5.4.3	Modelo de indução de alterações pressóricas pela noradrenalina.....	60
5.4.4	Modelo de indução de alterações pressóricas pelo L-NAME	65
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i> EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	68
6	DISCUSSÃO.....	73
6.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i>	73
6.2	PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS DE INDUÇÃO DE RESPOSTA PRESSÓRIA PELA ANGIOTENSINA I E ANGIOTENSINA II.....	73
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hancornia speciosa</i>	77
6.3.1	Participação do sistema renina-angiotensina na resposta do extrato da <i>Hancornia speciosa</i>	77
6.3.2	Participação do sistema nervoso simpático na resposta do extrato da <i>Hancornia speciosa</i>	79

6.3.3	Participação do óxido nítrico na resposta hipotensora do extrato da <i>Hanconia speciosa</i>	82
6.3.4	Atividade anti-hipertensiva do extrato da <i>Hanconia speciosa</i> em ratos espontaneamente hipertensos.....	83
7	CONCLUSÕES	86
8	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas como recurso terapêutico da antiguidade até os dias atuais (WHO, 2002; SAMUELSSON, 2004), sendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento dependem de plantas para a assistência primária à saúde (WHO, 2002). No Brasil, apenas 20 % da população consome 63 % dos medicamentos alopáticos; o restante da população utiliza como principal fonte terapêutica os produtos de origem natural, especialmente as plantas, dentro de um contexto cultural, na medicina popular ou na forma de fitoterápicos (FOGLIO, 2006).

Apesar da ampla utilização das plantas medicinais para diversos fins terapêuticos, apenas 17% foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímico e farmacológico (FOGLIO, 2006). A investigação dos materiais vegetais é necessária a fim de demonstrar sua eficiência farmacológica, para determinar o mecanismo de ação e para descartar aqueles tóxicos e ou ineficazes (NGUELEFACK, 2009). Além da utilização direta na terapêutica, as plantas medicinais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e desenvolvimento de fármacos, uma vez que podem ser utilizadas como matéria-prima para a síntese ou modelo para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2002; MYLES, 2003, CALIXTO, 2005). Segundo Butler (2008), quase metade dos medicamentos desenvolvidos após 1982 foi obtido direta ou indiretamente a partir de fontes naturais e, devido ao grande número de compostos derivados de produtos naturais em teste clínico - mais de 100 fármacos em 2008, conclui-se que os produtos naturais ainda são uma fonte viável de novos fármacos. Em relação aos fármacos anti-hipertensivos, foram descobertos 77 no período de 1981 a 2006, entre os quais 2 (2,6 %) foram derivados de produtos naturais, 48 (62,3 %) foram sintetizados com base em produtos naturais e 27 (35 %) foram produtos obtidos de síntese aleatória (NEWMAN, 2007).

Utilizada tradicionalmente pela população como terapia alternativa para a hipertensão arterial (HA) (HIRSCHMANN, ARIAS, 1990), a *Hancornia speciosa* Gomes, conhecida popularmente como mangaba, é encontrada no cerrado brasileiro (RODRIGUES, CARVALHO, 2001; BRASIL; 2006) e vem sendo amplamente estudada devido ao potencial terapêutico como anti-hipertensivo (SERRA *et al.*, 2005;

FERREIRA *et al.*, 2007a,b; ENDRINGER *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2011), anti-tumoral (ENDRINGER *et al.*, 2009) e gastroprotetora (MORAES *et al.*, 2008).

Apesar da diversidade de medicamentos disponíveis para a terapêutica, incluindo aqueles de origem natural ou derivados, as doenças cardiovasculares (DCV) representam um dos maiores problemas de saúde pública, com elevada incidência no mundo ocidental, acometendo tanto países do primeiro mundo, como países em desenvolvimento (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2010), a HA atinge 30% da população brasileira, chegando a mais de 50% na terceira idade e está presente em 5% das crianças e adolescentes. Em nível mundial, a HA é responsável por mais de um terço das mortes, cerca de 54% dos casos de acidente vascular encefálico, 47% dos casos de doenças cardíaca isquêmica e 25% dos casos de outras DCV (LAWES, 2008). Dessa maneira, torna-se relevante e necessária a contínua investigação por fármacos com atividade anti-hipertensiva e os produtos naturais, por sua vez, constituem uma fonte promissora para a descoberta de novas substâncias e um campo aberto para a investigação científica (GUERRA; NODARI, 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E A HIPERTENSÃO ARTERIAL

A doença cardiovascular (DCV) constitui a maior causa de morbimortalidade no mundo e contribui substancialmente para o aumento dos custos de financiamento da saúde. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007) estima que, no ano de 2005, 30 % dos óbitos foram em decorrência de DCV e em geral, 80% das mortes e casos de invalidez prematura ocorreram nos países de baixa e média renda e, mais da metade, ocorreram em pessoas com idade entre 45 - 69 anos (LAWES, 2008). No Brasil, o índice de óbitos devido às DCV encontra-se próximo ao índice mundial, 31,3% (BRASIL, 2010).

O principal fator de risco para o desenvolvimento das DCV é a hipertensão arterial (HA), sendo que a taxa de mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SBC, SBH, SBN, 2010). A hipertensão arterial é definida clinicamente como a condição patológica na qual o indivíduo apresenta uma pressão arterial sistólica superior ou igual a 140 mmHg, e uma pressão arterial diastólica superior ou igual a 90 mmHg, em indivíduos que não estejam fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (WHO, 2003; BRASIL, 2004; SBC, SBH, SBN, 2010). A hipertensão essencial caracteriza-se pela etiologia não completamente conhecida, poligênia, dependente de fatores humorais e influenciada pelo fenótipo (LERMAN *et al.*; 2005; BADYAL *et al.*, 2003, SARIKONDA *et al.*, 2009).

Dados recentes demonstram que 33,5% dos adultos dos Estados Unidos da América são hipertensos (ROGER *et al.*, 2010) e, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2010), a HA atinge 30% da população brasileira, 50% da população da terceira idade e 5% das crianças e adolescentes. Trata-se de uma doença crônica, que está relacionada à 40% dos casos de infartos, 80% dos casos de acidente vascular encefálico (AVE) e 25% dos casos de insuficiência renal terminal no Brasil (SBH, 2010).

O objetivo da terapêutica da HA é reduzir a PA e os eventos cardiovasculares (CVC) fatais e não-fatais, como invalidez prematura e a alta frequência de internações

(SBC, SBH, SBN, 2010). Dessa forma, a redução dos casos de AVE e da doença isquêmica coronariana, por meio da identificação dos portadores da HA e do controle adequado dos níveis pressóricos poderá impactar o Sistema Único de Saúde com redução da morbimortalidade e diminuição dos custos sociais e financeiros (BRASIL, 2004). Os agentes anti-hipertensivos utilizados atualmente na terapêutica compreendem os diuréticos, bloqueadores α -adrenérgicos, bloqueadores β -adrenérgicos, os antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os antagonistas do receptor AT₁ (WHO, 2007; SBC, SBH, SBN, 2010). A inibição farmacológica do sistema renina-angiotensina (SRA) é uma estratégia terapêutica amplamente utilizada para o tratamento da HA e redução dos riscos dos eventos cardiovasculares (CAT, TOUYZ, 2011) e, nesse aspecto, substâncias que atuam no SRA tem sido objeto de estudos intensos.

Pelo fato das DCV induzirem alterações na atividade elétrica cardíaca, o diagnóstico das doenças ou o efeito benéfico do tratamento pode ser realizado pela análise do eletrocardiograma (ECG), sendo este o procedimento mais utilizado na prática clínica (GUIMARÃES, 2003). As alterações no intervalo QT, que corresponde ao tempo de repolarização ventricular, constituem a mais importante anormalidade do ECG, devido à associação entre o prolongamento do intervalo QT e a ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita (CRUMB, CAVERO, 1999; CAVERO *et al.*, 2000; CAVERO, CRUMB, 2006). Por outro lado, o intervalo QT pode ser usado para demonstrar a potencial atividade cardioprotetora de uma nova formulação ou um novo fármaco em restaurar ou preservar as propriedades eletrofisiológicas dos cardiomiócitos (KOMPA, SUMMERS, 2001). A cardioproteção envolve uma complexa sinalização nas células cardíacas culminando com efeitos benéficos em sua integridade e funcionalidade (KÜBLER, HAASS, 1996; ANTZELEVITCH, 2007; LOTZ, 2011). Mozos e Cristescu (2005), dentre outros (BAILLARD *et al.*, 2000; DIAS DA SILVA *et al.*, 2002), relataram o efeito do IECA captopril em promover a redução da repolarização ventricular e o risco de arritmia, além de sugerirem a interação entre os efeitos eletrofisiológicos e o sistema renina-angiotensina (RAS) (DE MELLO, CRESPO, 1999; DOMENIGHETTI *et al.*, 2007).

O SRA está envolvido na manutenção da estabilidade hemodinâmica nos seres humanos, regulando o volume de líquido extracelular, o balanço eletrolítico, sobretudo

de íons sódio e a função cardiovascular. Seu extenso papel deve-se ao fato desse sistema exercer efeitos diretos e indiretos em múltiplos órgãos e, também, ao fato de interagir com outros sistemas vasomotores, como o sistema nervoso autônomo (SNA), bem como com outros hormônios vasoativos (PAUL, 2006; PERAZELLA, SETARO, 2003).

A cascata do SRA se inicia com a hidrólise do precursor angiotensinogênio a angiotensina I (ANG I) pela ação da renina, uma aspartil-protease, liberada a partir das células justa-glomerulares renais em resposta a redução da perfusão renal. O decapeptídeo ANG I é convertido no octapeptídeo angiotensina II (ANG II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo esta identificada como o principal regulador do SRA e encontrada principalmente no endotélio vascular dos pulmões. A ANG II regula a pressão arterial e seus efeitos vasoconstritores são mediados pela estimulação dos receptores no músculo liso vascular (CAT, TOUYZ, 2011; CHRYSANT, 2010; DASGUPTA, ZHANG, 2011; PERAZELLA, SETARO, 2003; CAT, TOUYZ, 2011). Os efeitos clássicos são mediados por dois sítios receptores de membrana, AT₁ e AT₂, que diferem entre si em termos de localização, regulação e expressão tecido-específica.

O receptor AT₁ medeia os principais efeitos da ANG II, como vasoconstrição, aumento da PA, da contratilidade cardíaca, da absorção tubular de sódio e proliferação celular, e medeia efeitos prejudiciais, como o estresse oxidativo, disfunção endotelial doenças cardiovasculares e inflamação. (CAT, TOUYZ, 2011; DASGUPTA, ZHANG, 2011; PAUL, 2006; OPARIL *et al.*, 2005). Este receptor é encontrado em todos os órgãos, incluindo o coração, rins, fígado, adrenais, pulmão e vasculatura. O receptor AT₂ é expresso no coração e aorta de fetos e, após o primeiro ano de vida, a expressão deste receptor reduz (rins, pulmão e fígado), sugerindo a importância deste no desenvolvimento fetal (DASGUPTA, ZHANG, 2011). Atua particularmente na regulação do crescimento, diferenciação e regeneração de neurônios teciduais, inibição de proliferação e hipertrofia, além de controle do tônus vascular por meio de vasodilatação (DASGUPTA, ZHANG, 2011; PAUL, 2006; OPARIL *et al.*, 2005).

Recentemente, foi identificado um homólogo da ECA, a ECA-2, uma carboxipeptidase capaz de clivar um aminoácido de ambos os peptídeos, ANG I e

ANG II, reduzindo os níveis circulantes de ANG II e aumentando o metabólito angiotensina (1-7) (ANG (1-7)). Este peptídeo liga-se ao receptor Mas, cuja resposta está relacionada a benefícios nos tecidos cardiovasculares, como redução da contratilidade cardíaca, redução da hipertrofia e fibrose (CAT, TOUYZ, 2011; DASGUPTA, ZHANG, 2011; SANTOS *et al.*, 2000). Desta forma, o eixo ECA 2 – angiotensina (1-7) – Mas é considerado um alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos cardiovasculares (DASGUPTA, ZHANG, 2011).

O aumento da atividade da ECA na hipertensão e aterosclerose já foi descrito em diversos trabalhos e tem sido proposto como um fator causal nessas patologias. A hipertensão e a aterosclerose também estão associadas com a disfunção endotelial e a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (LÜSCHER, BARTON, 1997). Os efeitos mediados pelo NO sobre o sistema cardiovascular são vasodilatação (FURCHGOTT, ZAWADSKI, 1980), inibição da agregação plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1990) e efeito anti-proliferativo (GARG, HASSID, 1989). O NO endotelial desempenha um papel importante na homeostase vascular por meio do controle do tônus vascular, da modulação do crescimento das células do músculo liso vascular, da diminuição da adesão e agregação plaquetárias, além da aderência de outros componentes sanguíneos (VANHOUTTE, BOULANGER, 1995; MOMBOULI, VANHOUTTE, 1999). Uma diminuição da produção de NO pelas células endoteliais está fortemente associada à disfunção ou injúria endotelial, tendo uma participação importante em patologias cardiovasculares como aterosclerose e hipertensão arterial (BUSSE, FLEMING, 1996). Persson *et al.* (2000) demonstraram que a atividade aumentada da ECA pode ser devida, parcialmente, à diminuição da disponibilidade de NO em casos de hipertensão e aterosclerose, uma vez que o NO é um inibidor endógeno da ECA, provavelmente por se ligar ao íon zinco presente no sítio ativo da enzima.

Apesar dos IECA disponíveis no mercado serem efetivos para o tratamento crônico da HA, estão relacionados a diversos efeitos adversos no uso ao longo prazo, como tosse, distúrbios no paladar e rachaduras na pele (CLELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a pesquisa de novos IECA pode ser uma alternativa futura para o controle da HA com redução dos efeitos adversos. Vários modelos experimentais de indução da HA foram desenvolvidos para mimetizar a hipertensão humana

(DROGGRELL; BROWN, 1998; LERMAN *et al*, 2005; SARIKONDA *et al*, 2009), sendo ferramentas úteis para a busca e caracterização de potenciais agentes anti-hipertensivos (BADYAL *et al.*, 2003, LERMAN *et al.*, 2005).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE RESPOSTAS PRESSÓRICAS E DE HIPERTENSÃO ARTERIAL

Para a avaliação da potencial atividade cardiovascular de fármacos, é importante a avaliação pré-clínica em modelos animais normais e acometidos pela HA. Estes modelos experimentais, além de serem utilizados para a busca de potenciais agentes anti-hipertensivos, têm contribuído significativamente para aumentar a compreensão da patogênese das doenças (CHORRO, 2009). Além do mais, as alterações patofisiológicas mais comuns no sistema cardiovascular humano como a hipertensão, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca podem ser reproduzidas com sucesso em ratos (DOGGRELL, 1998).

Devido à heterogenicidade e multifatorialidade da HA, vários modelos experimentais de indução desta patologia foram desenvolvidos em ratos para mimetizar a HA humana, tais como os modelos genéticos e farmacológicos (LERMAN *et al*, 2005; SARIKONDA *et al*, 2009; DROGGRELL; BROWN, 1998). A seleção do modelo a ser usado deve considerar os objetivos e as limitações do estudo, sejam elas técnicas ou financeiras (BADYAL *et al*, 2003; DOGGRELL, BROWN, 1998).

Considerando o papel do SRA na regulação e remodelamento cardiovascular, bem como no controle da pressão arterial (DZAU, 2005; POLITI *et al.*, 2010; CRY SANT, 2010), a ANG II induz ao aumento da pressão arterial (PA) dose-dependente após única dose *in bolus* ou infusão contínua, sendo este um modelo experimental amplamente utilizado (SCHEUER, PERRONE, 1993; KANE, 2010). A estimulação aguda do SRA pela ANG II regula a homeostase dos fluidos corporais e a vasoconstrição, enquanto que a estimulação crônica promove a migração, hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas (DASGUPTA, ZHANG, 2011).

A resposta máxima obtida após administração de ANG II *in bolus*, em dose acima da escala de ng/kg, produz resposta máxima em segundos devido a rápida vasoconstrição e retorna aos níveis normais em 2 a 3 minutos (RECKELHOFF, 2003). A ANG I, quando administrada por via I.V., é convertida imediatamente em ANG II e

induz resposta pressora em níveis inferiores à resposta obtida para a ANG II devido ao efeito de primeira passagem pelos pulmões (HELLER, MOHRMAN, 1998). Em presença de um inibidor da ECA, a conversão dos peptídeos não é realizada, impossibilitando o aumento dos níveis pressóricos pela ANG I. Gardiner *et al.* (1993,1990b) utilizaram doses de ANG I e ANG II *in bolus* por via intravenosa (I.V.) para induzir aumentos pressóricos e avaliar a resposta cardiovascular na presença de outras substâncias vasoativas, sendo obtida resposta pressórica dose-dependente para cada um dos peptídeos. Robinson *et al* (1999) realizou um experimento que consistia na infusão intracerebroventricular do IECA captopril e na infusão sistêmica de ANG I. O captopril atenuou significativamente a resposta pressórica da administração do peptídeo através da inibição da conversão local de ANG I em ANG II.

Por exercer importante papel na regulação do coração, o sistema nervoso autônomo (SNA) está envolvido em muitos dos processos fisiopatológicos cardiovasculares. A epinefrina plasmática pode estar aumentada em pacientes com hipertensão essencial e, um episódio ou o aumento sustentado da liberação de NA pode promover o desenvolvimento de pressão arterial elevada (FLORAS, 1992; KLEINJANS *et al.*, 1984; STEIN *et al.*, 1997). Vários estudos sugerem que anormalidades no SNA desencadeiam arritmias, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e morte súbita (CORR *et al.*, 1986; PORTER *et al.*, 1996; SHUSTERMAN *et al*, 1998).

A administração aguda de NA produz aumentos dose-resposta na pressão arterial média. A combinação de diferentes mecanismos pode mediar os efeitos pró-hipertensivos de noradrenalina, tais como vasoconstrição, aumento da resistência periférica total, estimulação do SRA, hipertrofia e remodelamento vascular (BOESEN, 2005). Vidal *et al.* (2010), para avaliar a atividade da piridostigmina encapsulada sobre o sistema cardiovascular, realizaram a estimulação do SNS por meio da administração de NA *in bolus* I.V. nas doses de 1 ou 3 µg, sendo observado o aumento da PA arterial dose-resposta e prolongamento do intervalo QT. Recentemente, Hong *et al.* (2011) obtiveram curva dose-resposta de 5 doses de NA (compreendidas entre 0,01 e 3,1 µg/kg) administradas por via I.V. *in bolus*, com o

objetivo de avaliar a relação entre a hipertensão aguda induzida pela ativação simpática, alfa-adrenoreceptores e o NO.

Outro modelo de indução de resposta pressórica já bem descrito na literatura (BADYAL, 2003; SARIKONDA e COLS, 2009), consiste no bloqueio da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser obtido pelo uso de análogos de *L*-arginina, como o metil éster N^ω-nitro-*L*-arginina (*L*-NAME) (RIBEIRO, 1992; LÓPEZ *et al.*, 2011). O quadro de HA sistêmica desencadeado pela administração de *L*-NAME *in vivo* é dose-dependente e deve-se à vasoconstrição generalizada (REES *et al.*, 1989; GARDINER *et al.*, 1990a e b), indicando que a liberação basal de NO nos vasos de resistência periféricos é responsável pela ação vasodilatadora contínua *in vivo* (ZAPPELINI *et al.* 1997). O efeito pressor induzido pelo *L*-NAME está associado principalmente à vasoconstrição renal, mesentérica e do trem posterior (GARDINER *et al.*, 1990a), além de levar à bradicardia reflexa, redução do débito cardíaco (GARDINER *et al.*, 1990b) e aumento da resistência vascular sistêmica (ZAPPELINI *et al.*, 1997), quando administrado em ratos conscientes. O tratamento com *L*-NAME diminui de forma significativa os níveis de metabólitos de NO no tecido vascular e observa-se um aumento na expressão de renina, ECA e receptor AT₁ nos vasos sanguíneos e aumento da pressão sanguínea. Esses resultados, juntamente com a maior atividade do SRA vascular levando ao aumento do tônus vascular, sugerem uma interação local entre o SRA e o NO (NAVARRO *et al.*, 1994). Uma maior atividade da NOS em aorta de ratos tratados com enalapril foi observada, sustentando a idéia de que a inibição do SRA leva ao aumento da atividade da NOS (GONZÁLEZ-BOSC *et al.*, 2000). Além do mais, tratamentos crônicos com inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores AT₁ da angiotensina são capazes de prevenir a instalação ou reverter à hipertensão e a lesão renal já estabelecidas através do tratamento crônico com *L*-NAME (POLLOCK *et al.*, 1993; FAZAN JR., 2001).

A mais comum causa de HA humana é a hipertensão essencial, cuja causa pode ser resultante da interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais (SARIKONDA *et al.*, 2009). Tal quadro de HA é mimetizado pelo modelo experimental genético, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), os quais desenvolvem ao longo da vida a HA, danos em órgãos-alvos e alterações patofisiológicas similares a hipertensão essencial humana, sendo este um modelo de excelência para o estudo da

patogênese, terapia, e testes para novos anti-hipertensivos, profilaxia e complicações da doença (DOGGRELL, BROWN, 1998; BADYAL, 2003; SARIKONDA *et al.*, 2009). Como os SHR derivaram originalmente da colônia de ratos *Wistar Kyoto* (WKY), estes são utilizados como um grupo controle normotenso do SHR (LERMAN *et al.*, 2005; SARIKONDA *et al.*, 2009). Este modelo de hipertensão tem sido utilizado amplamente para avaliar a potencial atividade anti-hipertensiva de produtos naturais (MAGHRANI *et al.*, 2005; SARIKONDA *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2010; JIA *et al.*, 2011).

.2.3 PRODUTOS NATURAIS E A *Hancornia speciosa* GOMES

O Brasil é o país que detém a maior biodiversidade vegetal, em torno de 15 a 20 % do total mundial (BRASIL, 2005), considerada uma potencialidade no que diz respeito à possibilidade de utilização dos vegetais para obtenção de moléculas complexas biologicamente ativas (GOTTLIEB; BORIN, 2000; CALIXTO, 2005). No entanto, estima-se que menos de 10% das plantas brasileiras foram avaliadas para atividades biológicas e menos de 5% foram submetidas a estudos detalhados de fitoquímica (LUNA, 2005). O interesse em utilizar os produtos naturais como protótipo para o desenvolvimento de compostos pode ser explicado pela singularidade estrutural destas substâncias. Assim, o arsenal terapêutico pode ser ampliado mediante modificação química de substâncias isoladas de produtos naturais, inicialmente submetidas a ensaios de atividades biológicas. Aquelas que apresentam atividade farmacológica de interesse são submetidas a fracionamento biomonitorado com vistas ao isolamento de protótipos que servirão de base para o desenvolvimento de novos fármacos, visando maior especificidade e menor toxicidade (RATES, 2001). Tal situação pode ser exemplificada pelo estudo dos brasileiros Ferreira e colaboradores, que descreveram na década de 60 a atividade inibitória de uma fração do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* sobre a ECA. Da fração do veneno foram isolados seis peptídeos, dos quais um serviu como protótipo para o design de potentes inibidores competitivos da ECA, dentre eles o captopril, o primeiro inibidor dessa enzima comercialmente disponível para o tratamento da HA (IANZER *et al.*, 2004).

A seleção de espécies vegetais para a pesquisa de produtos naturais bioativos, baseada em levantamentos etnobotânicos, apresenta maior probabilidade de sucesso, em comparação com a seleção aleatória (SLISH *et al.*, 1999; MANGANELLI

et al, 2000). Nos últimos anos, a espécie *Hancornia speciosa* Gomes, família Apocynaceae, vem sendo amplamente estudada devido ao potencial terapêutico como anti-hipertensivo. Esta espécie é conhecida popularmente como mangaba, uma árvore nativa dos trópicos (OLIVEIRA, VALIO, 1992), mais conhecida por seus frutos, rica fonte de proteína e usados comercialmente para a produção de sucos e sorvetes (PARENTE *et al.*, 1985). A casca da *H. speciosa* é utilizada na medicina popular para o tratamento de dermatoses e doenças hepáticas (RODRIGUES, CARVALHO, 2001), diabetes (GRANDI *et al.*, 1989) e como antiinflamatória (LIMA, MARTINS, 1996); a raiz é usada no tratamento de reumatismo e como anti-hipertensiva (GRANDI *et al*, 1989).

Serra *et al.* (2005) relataram, pela primeira vez, a atividade inibidora da ECA observada para o extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* por meio de bioensaio colorimétrico. O extrato apresentou efeito vasodilatador induzido pela inibição da ECA, de maneira concentração-dependente, em preparações de anel de aorta de rato pré-contraídas pela ANG I, em presença de L-NAME e indometacina (SERRA, 2004). Foi avaliado também o efeito vasodilatador do extrato da *H. speciosa* em anéis de aorta mesentérica superior, sendo observada a vasodilatação concentração-dependente e dependente do endotélio, por um mecanismo dependente da liberação de NO via ativação do PI3K (Ferreira *et al*, 2007b). Ferreira *et al.* (2007a) também relataram a atividade vasodilatadora do extrato por um mecanismo dependente de NO sobre a ativação dos canais de potássio e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Foi realizado o fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA do extrato etanólico da *H. speciosa* e evidenciou-se o potencial anti-hipertensivo da espécie pelo isolamento de várias frações ativas e o isolamento do flavonóide rutina e dos ciclitols L-(+)-borsenitol e ácido quínico (figura 1) como constituintes da *H. speciosa* que contribuem para o efeito vasodilatador (ENDRINGER *et al.*, 2007). O efeito anti-hipertensivo da rutina já foi demonstrado (DUARTE *et al*, 2001), porém com duração inferior a *H. speciosa* (SILVA *et al.*, 2011). Os efeitos cardiovasculares do ácido quínico e do borsenitol necessitam ainda de maiores investigações (SILVA *et al.*, 2011).

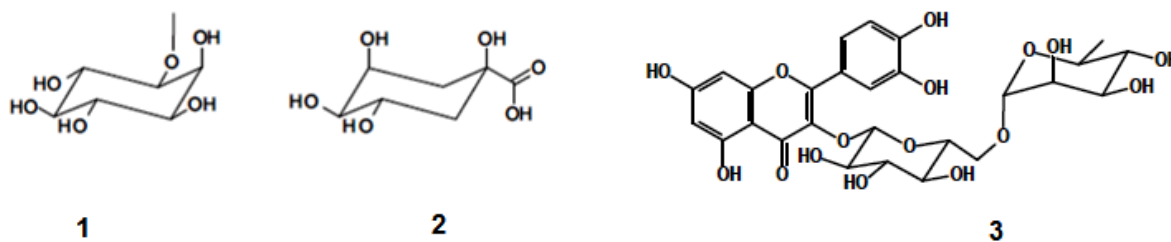


Figura 1 - Estrutura química das substâncias presentes na fração do extrato etanólico da *Hancornia speciosa*. **1**, L-(+)-borsenitol; **2**, ácido quínico; **3**, rutina. (ENDRINGER *et al*, 2009; OH *et al*, 2003).

Foi avaliado também o efeito hipotensor da fração do extrato da *H. speciosa* contendo a rutina, borsenitol e ácido quínico em camundongos hipertensos (Doca-sal), na dose de 100 mg/kg e administrado por via intraperitoneal, sendo observado a redução da PA sistólica (PAS) dos camundongos (Castro Braga, 2009). Recentemente, Silva *et al* (2011) avaliaram o efeito da mesma fração do extrato em camundongos normotensos (1 mg/kg, via oral), sendo observado efeito hipotensor dose-dependente, com redução da atividade da ECA e aumento dos níveis plasmáticos de nitrito. Na presença do inibidor da óxido-nítrico sintase ocorreu a redução do efeito hipotensor. Também foi demonstrada a atividade anti-oxidante da fração do extrato da *H. speciosa*, o que pode contribuir para a atividade hipotensiva ou anti-hipertensiva do extrato uma vez que os radicais livres possuem atividade vasoconstritora e reduzem a vasodilatação endotélio-dependente (Castro Braga, 2009). Foi avaliada, mais uma vez, a fração do extrato (0,1 mg/kg na água de beber) em camundongos hipertensos durante 14 dias, sendo observado redução da PAS durante todo o tratamento. Em tratamento semelhante, os animais normotensos não sofreram alterações pressóricas (Castro Braga, 2009).

A fração do extrato contendo o borsenitol, ácido quínico e rutina inibem o NF- κ B, o que sugere o potencial da *H. speciosa* no tratamento do câncer (ENDRINGER *et al.*, 2009). Além do mais, terapias que bloqueiam a produção de ANG II tem sido relacionadas à supressão de crescimento de tumores, metástase e angiogênese em modelos experimentais, além de reduzir a prevalência de câncer em pacientes hipertensos (ARAFAT *et al.*, 2007).

Esses resultados apresentados corroboram a utilização da *H. speciosa* como anti-hipertensivo na medicina tradicional. No entanto, faz-se necessário a avaliação

da atividade da *H. speciosa* sobre os parâmetros eletrofisiológicos e utilização de outros modelos de indução de aumentos pressóricos ou hipertensão arterial.

Deve-se considerar que apesar dos inibidores da ECA serem amplamente utilizados e eficientes no tratamento da hipertensão, vários efeitos indesejáveis tem sido observados, como tosse, hiperpotassemia, fissuras na pele e distúrbios do paladar (CLELAND *et al.*, 1998). Desta forma, a pesquisa por novos inibidores da ECA derivados de produtos naturais pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da hipertensão com redução dos efeitos indesejáveis.

3 OBJETIVOS

Avaliar a atividade cardiovascular do extrato etanólico de *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba) em ratos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Obter o extrato etanólico da *H. speciosa* e o seu perfil cromatográfico;

2.1.2 Padronizar e caracterizar, quanto às alterações cardiovasculares, os modelos farmacológicos de indução do aumento da pressão arterial pela angiotensina I (ANG I) e angiotensina II (ANG II);

2.1.3 Avaliar a atividade cardiovascular do extrato etanólico de *H. speciosa* nos modelos farmacológicos de indução do aumento da pressão arterial pela ANG I, ANG II, noradrenalina (NA) e por inibição da síntese de óxido nítrico utilizando-se o L-NAME, em ratos *Wistar*.

2.1.4 Avaliar a atividade cardiovascular do extrato etanólico de *H. speciosa* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta, secagem e moagem

Cerca de 2,5 kg de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes foram coletadas em novembro de 2010 no município de São Gonçalo do Rio Preto, MG, sob a licença COL030/10 do Instituto Estadual de Florestas. A espécie (figuras 2 e 3) foi identificada pelo Prof. Dr. Hildeberto de Souza Caldas, lotado no Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP, em cujo herbário foi depositada uma exsicata sob número 25.606.

Inicialmente foi realizada a triagem por inspeção visual do material coletado, momento em que foram descartadas as folhas contaminadas por insetos ou fungos. Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa ventilada a 35°C, durante duas semanas. O material seco foi pulverizado em moinho de facas.



Figura 2- Fotografia da *Hancornia speciosa* Gomes em seu habitat natural (A). Foto ampliada de flor (B), fruto e folhas (C).



Figura 3 - Fotografia da exsicata da *Hancornia speciosa* Gomes.

4.1.2 Preparo do extrato etanólico das folhas de *Hancornia speciosa*

O material pulverizado, em porções de 30 g, foi submetido à extração por sonicação com etanol, seguida da concentração em evaporador rotatório até resíduo. Todos os resíduos obtidos foram homogeneizados e foi realizada a remoção do solvente em estufa a 30°C. O fluxograma da figura 4 representa a sequência de procedimentos adotados para a preparação do extrato bruto.

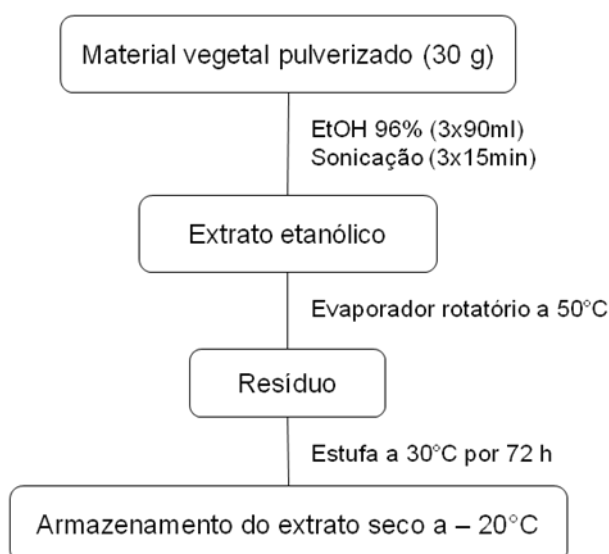


Figura 4 - Fluxograma do preparo do extrato etanólico bruto da *Hancornia speciosa*.

4.2 OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO

A amostra do extrato da *H. speciosa* foi solubilizada em metanol, grau HPLC, com auxílio de sonicação durante 15 minutos, na concentração de 10 mg/ml. Foi realizada a centrifugação da amostra a 8.000 rpm por 5 minutos. Foi injetada alíquota de 10 µl do sobrenadante em equipamento Waters Alliance 2695 e foi utilizada coluna Shimadzu ODS C18 (partículas de 5 µm, 250 x 4,6 mm), fluxo de 1 ml/min. As análises foram realizadas a 40°C com detecção no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 190 a 800 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizado o gradiente linear descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado para obtenção do perfil cromatográfico por HPLC.

Tempo (min)	A(%)	B (%)
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

Legenda: A= Ácido fosfórico 0,1%. B= acetonitrila + ácido fosfórico 0,1%.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Hancornia speciosa* PARA EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

Para administração oral, a solução do extrato bruto da *H. speciosa* foi preparada a partir do extrato pesado em quantidade necessária para alcançar a dose definida para cada animal, seguida da solubilização em 4,0 ml de capryol (Gatedossé, França):água Mili-Q (6,5:3,5) e submetida à sonicação (3x15 min).

Para a administração intravenosa (I.V.), o extrato bruto da *H. speciosa* foi solubilizado em solução salina:dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Brasil) (95:5), seguida de sonicação (3x15 min) e filtração em membrana de celulose 5 µm. O volume máximo administrado a cada animal foi o máximo de 0,5 ml.

4.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFOP, sob o número 63/2010.

Foram utilizados ratos *Wistar*, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e *Wistar Kyoto* (WKY) machos pesando de 250 a 270 g, fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos sob ciclo de 12 horas claro/escuro e recebendo água e ração (Nuvilab) *ad libitum*. Para os experimentos cuja administração das soluções foi realizada por via oral, os animais foram mantidos em jejum por oito a doze horas anteriormente aos experimentos, com acesso livre à água.

4.4.1 Procedimentos cirúrgicos

Para a maioria dos protocolos experimentais, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina/xilazina, na dose de 100/14 mg/kg e para o protocolo de alteração pressórica induzida pelo L-NAME (protocolo V) foram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 60 mg/kg, ambos administrados por via intraperitoneal (I.P.). Após a indução da anestesia, os animais foram traqueostomizados utilizando um tubo de polietileno (PE) e deixados sob respiração espontânea.

Após assepsia e tricotomia da região inguinal esquerda, foi realizada pequena incisão para exposição do feixe femoral. Para obtenção dos sinais da pressão arterial (PA) e para a administração I.V. das soluções, foram inseridos cateteres na artéria e veia femorais, respectivamente. Os cateteres foram confeccionados unindo-se, por aquecimento, 5,0 cm de tubo de PE 10 a 15,0 cm de tubo de PE 50 e preenchidos com solução de salina heparinizada (50 UI/ml de heparina sódica, Hipolabor, Brasil).

Para os grupos experimentais em que foram utilizados os ratos SHR e WKY acordados, apenas o cateter arterial foi implantado e foi externado com o auxílio de um trocárter sob o tecido subcutâneo no dorso do animal para a mensuração da PA cerca de 24 horas após os procedimentos cirúrgicos.

4.5 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.5.1 Obtenção dos parâmetros cardiovasculares

O sinal do eletrocardiograma (ECG) foi obtido utilizando-se como sensor agulhas hipodérmicas de aço inoxidável. Estas agulhas foram inseridas no tecido subcutâneo dos membros superiores direito, esquerdo e inferior esquerdo, com o objetivo de mensurar a diferença de potencial relativa às derivações periféricas DI, DII e DIII.

A extremidade distal do cateter inserido na artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão *TruWave* (*Edwards Lifescience*, Canadá) para aquisição do sinal de PA. O transdutor de pressão e as agulhas hipodérmicas foram conectados a um sistema condicionador de sinais (figura 5) para a obtenção dos mesmos em tempo real a uma frequência de 1200 Hz, processados por uma placa conversora analógico-digital (*DaqBoard/2001*, EUA).

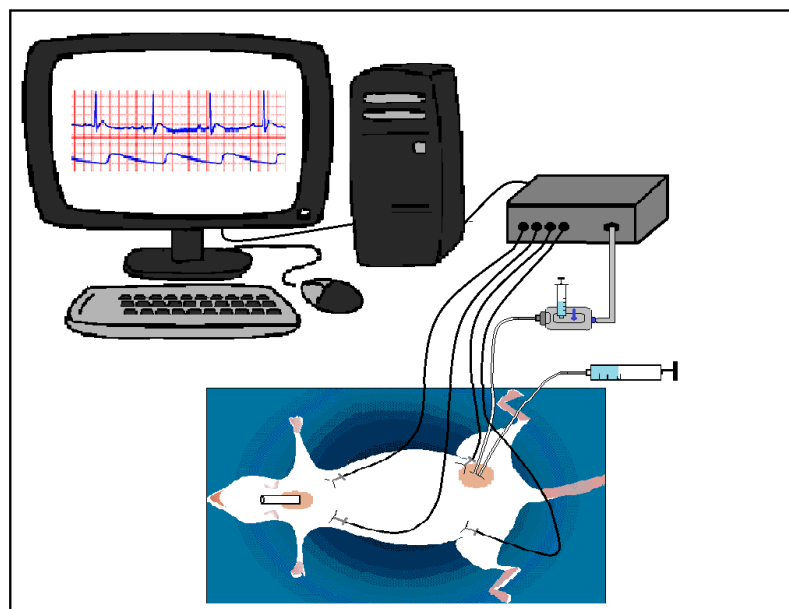


Figura 5 - Desenho esquemático do sistema de aquisição de sinais, rato anestesiado cateterizado em experimentação e obtenção dos sinais de pressão arterial e eletrocardiograma.

4.5.2 Análise dos parâmetros cardiovasculares

Os registros digitais dos experimentos foram convertidos utilizando o software Matlab 7.0 (MathWorks, EUA) e analisados por inspeção visual com o auxílio do software WinDaq (DATAQ *Instruments*, EUA). Foram selecionados segmentos de 2,0 segundos em instantes determinados pelos protocolos experimentais, os quais foram gravados para posterior obtenção dos parâmetros cardiovasculares.

Foram extraídos os seguintes parâmetros cardiovasculares: pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD); frequência cardíaca (FC) e intervalos PR, RR, complexo QRS e QT do ECG (detalhados abaixo), os quais estão representados na figura 6. O parâmetro QTc, que corresponde ao intervalo QT corrigido utilizando-se o índice de *Fridericia* ($QTc = QT/(RR)^{1/3}$), também foi obtido.

Intervalo PR – Intervalo de tempo mensurado entre o início da onda P, que corresponde à despolarização atrial que se inicia no átrio direito e se estende ao átrio esquerdo, e o início do complexo QRS. Representa o intervalo de tempo compreendido entre o começo da despolarização atrial e ventricular;

Complexo QRS – Compreende as rápidas deflexões produzidas durante a despolarização dos ventrículos. É composto por uma deflexão ascendente, a onda R, a qual é precedida e sucedida por deflexões descendentes - onda Q e onda S, respectivamente;

Intervalo QT – Corresponde à sístole elétrica total ventricular, compreendendo o tempo desde a despolarização até a repolarização dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente. Inclui o complexo QRS, o segmento ST e a onda T. Esta última representa a repolarização ventricular e é normalmente ascendente em relação ao ponto isoeletrico;

Intervalo RR – Parâmetro determinante da frequência cardíaca que representa o intervalo entre duas ondas R adjacentes.

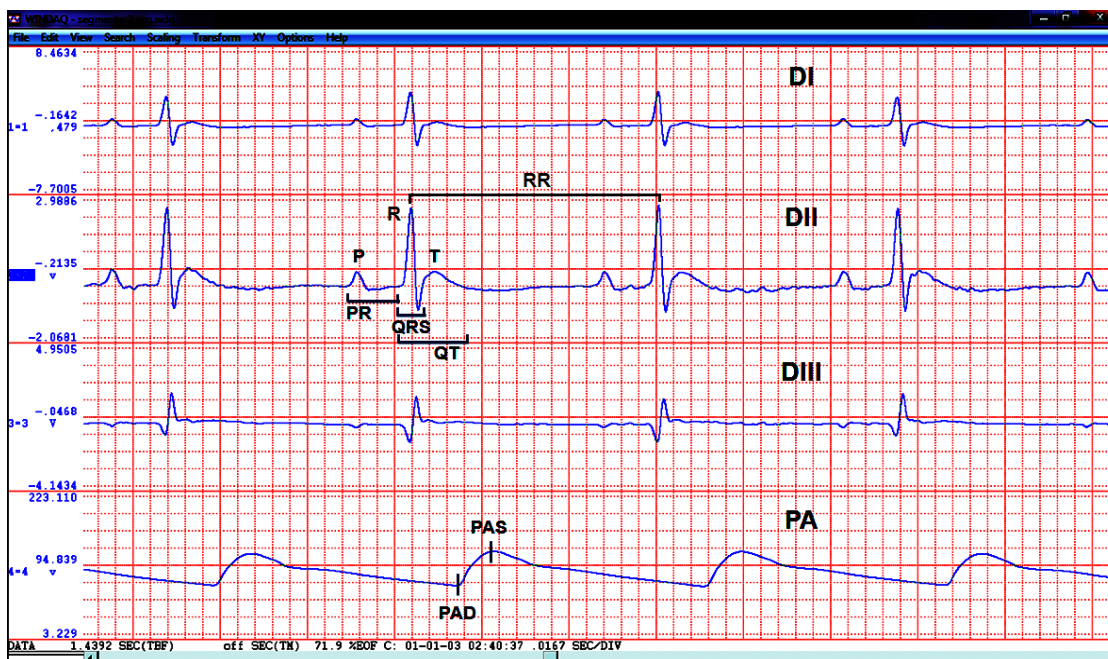


Figura 6: Traçado normal do eletrocardiograma (ECG) de rato visualizado no *software Windaq* - derivações DI, DII e DIII; intervalos do ECG na derivação DII utilizados nas análises; traçado da pressão arterial (PA) com indicação dos pontos utilizados para obtenção da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD).

4.6 PADRONIZAÇÃO DAS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E ELETROCARDIOGRÁFICAS INDUZIDAS PELA ANGIOTENSINA I E ANGIOTENSINA II.

Foi realizada a administração I.V. *in bolus* de angiotensina I (ANG I, Sigma, EUA) e angiotensina II (ANG II, Sigma, EUA) para avaliar as respostas pressóricas e eletrocardiográficas dos animais. Para obtenção da curva dose-resposta das respostas pressóricas, foram utilizadas quatro ou cinco doses de cada substância a fim de selecionar três doses capazes de induzir a aumentos significativos da PA. Considerando dados da literatura, optou-se por avaliar as dose de 0,1; 1; 10, 30 e 100 pmol de ANG I (figura 7A) e 0,05; 0,5; 5 e 50 pmol de ANG II (figura 7B).

Foi padronizado o volume de 0,1 ml para administração I.V. de cada dose de ANG I e ANG II e 0,2 ml de solução salina 0,9 % para lavagem da cânula imediatamente após a administração. O intervalo entre as administrações das

diferentes doses foi de 15 minutos, tempo determinado experimentalmente como suficiente para a PA retornar aos níveis anteriores às administrações.

Todos os fármacos administrados por via I.V. foram solubilizados em solução salina 0,9% e os fármacos administrados por via oral foram solubilizados em água Mili - Q.

Foram utilizados os fármacos anti-hipertensivos captopril e losartana como padrões de substâncias capazes de reduzir ou impedir as respostas pressóricas da ANG I e ANG II, respectivamente. Os anti-hipertensivos foram administrados por via oral (V.O.) nas doses de 50 mg/kg de captopril (Attivos Magistrais, Brasil) e 30 mg/kg de losartana (Henrifarma, Brasil). Vinte minutos após a administração oral, foi induzida a anestesia, seguido dos procedimentos cirúrgicos e iniciada a obtenção dos parâmetros cardiovasculares exatamente 60 minutos após a administração do captopril ou losartana. Antes da administração de ANG I ou ANG II, foi realizada a obtenção dos parâmetros cardiovasculares, identificada nos protocolos (figura 7) como controle, durante 3 minutos. Posteriormente, foram avaliados os parâmetros da PA – PAS e PAD, FC e os intervalos do ECG.

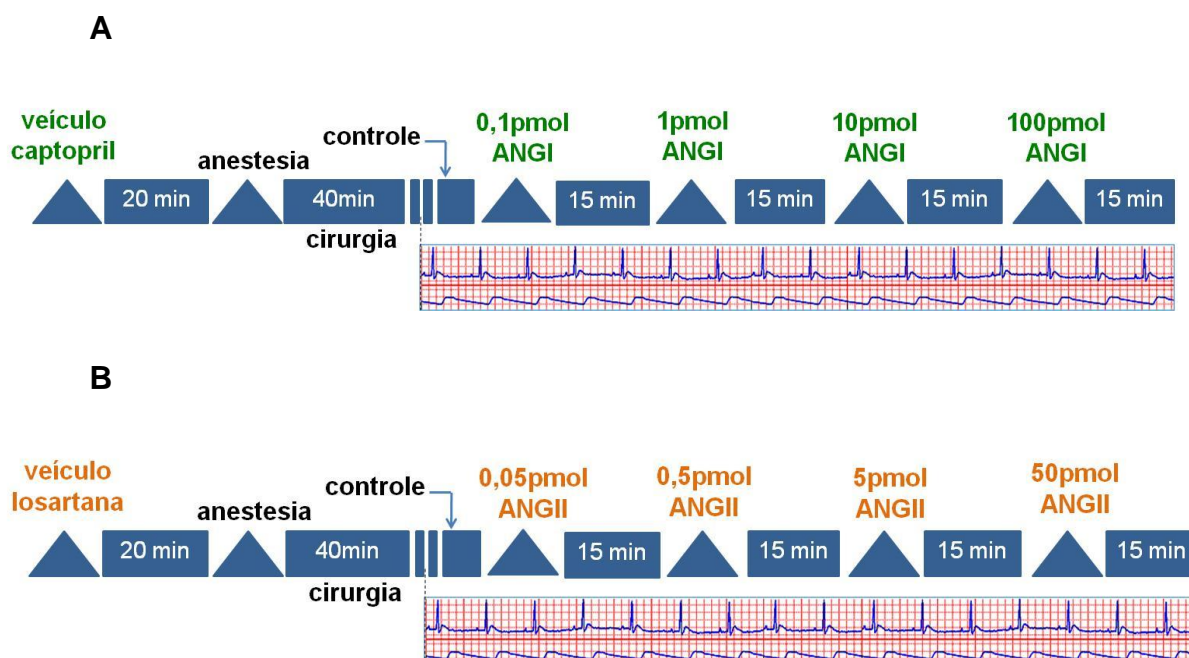


Figura 7: Protocolo da padronização do modelo de indução de resposta pressórica pela angiotensina I (ANG I) (A) ou angiotensina II (ANG II) (B) por via I.V. após a administração oral do veículo ou dos anti-hipertensivos captopril (A) ou losartana (B).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hancornia speciosa* EM RATOS WISTAR

A indução do aumento da PA em ratos *Wistar*, para avaliação da atividade cardiovascular do extrato, foi realizada por administração de ANG I, ANG II, noradrenalina (NA) e metil éster N^ω-nitro-L-arginina (L- NAME).

Para os protocolos de indução do aumento da PA pela ANG I e ANG II (figura 8, protocolos I e II, respectivamente), o extrato etanólico da *H. speciosa* foi administrado nas doses de 100 ou 200 mg/kg V.O. Em seguida foi realizada a administração de três diferentes doses I.V. dos vasoconstritores, seguindo os mesmos procedimentos da padronização dos protocolos. Os grupos controles receberam por V.O. o veículo utilizado para solubilizar o extrato e as diferentes doses de ANG I ou ANG II. A capacidade do extrato em impedir os aumentos da PA induzidos pelos vasoconstritores foi comparada à atividade anti-hipertensiva dos fármacos padrões, o captopril e a losartana.

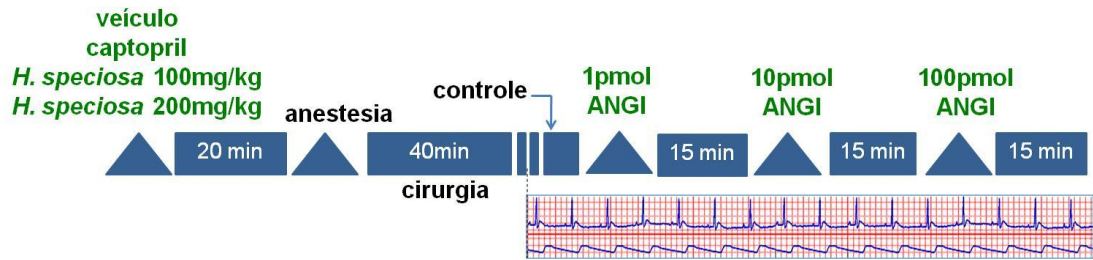
A indução do aumento da PA pela NA (Sigma, EUA) foi realizada pela administração de 4 doses por via I.V. *in bolus* :10 pmol, 100 pmol, 1 nmol e 10 nmol (Figura 8, protocolo III). Foi realizada a administração V.O. do extrato da *H. speciosa* nas doses de 100 ou 200 mg/kg e, 20 minutos após a administração oral, foi induzida a anestesia e realizados os procedimentos cirúrgicos. Sessenta minutos após administração oral, foi iniciada a obtenção dos sinais cardiovasculares. As diferentes doses de NA foram administradas com intervalos de 10 minutos, tempo suficiente para a PA retornar aos níveis anteriores às administrações. O grupo controle recebeu por via oral o veículo utilizado para solubilizar o extrato e as diferentes doses de NA.

A capacidade do extrato de impedir os aumentos da PA induzidos pela NA foi comparada a atividade da prazosina (Sigma, EUA), um anti-hipertensivo utilizado na terapêutica, na dose de 0,1 mg/kg. Esta foi administrada por via I.V. 5 minutos antes da administração das diferentes doses de NA (figura 8, protocolo IV). A atividade do extrato, administrado V.O., foi avaliada também em associação com a prazosina.

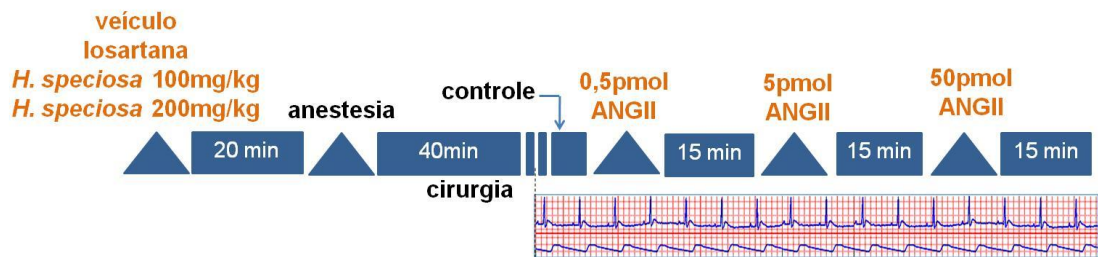
Para o protocolo de indução do aumento da PA pela inibição da síntese do óxido nítrico (figura 8, protocolo V), o L- NAME (Sigma, EUA) na dose de 60 mg/kg (60 mg/ml em água Mili-Q), foi administrado por via I.V. *in bolus* e, 20 minutos depois,

foi realizada a administração do extrato nas doses de 30 mg/kg ou 100 mg/kg por via I.V. Ao grupo controle foi administrado o *L-NAME* e o veículo utilizado para solubilizar o extrato. Neste protocolo foi avaliada a capacidade do extrato em reduzir a PA dos animais previamente tratados com o *L-NAME*, comparado ao grupo controle que recebeu o veículo.

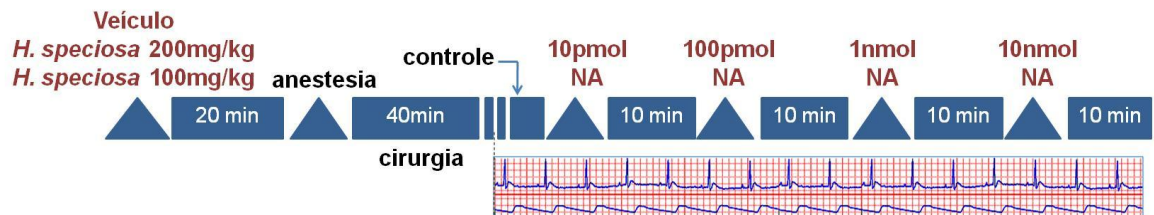
Protocolo I:



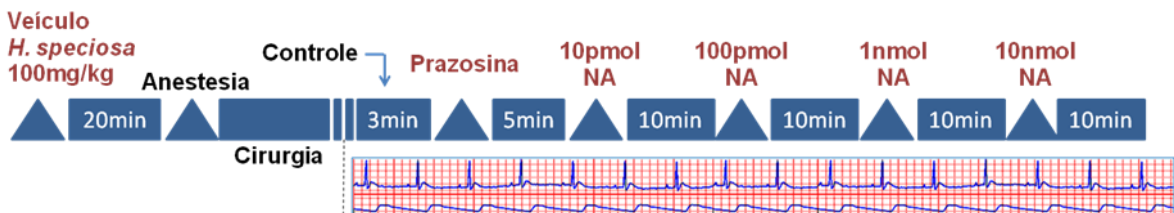
Protocolo II:



Protocolo III:



Protocolo IV:



Protocolo V:

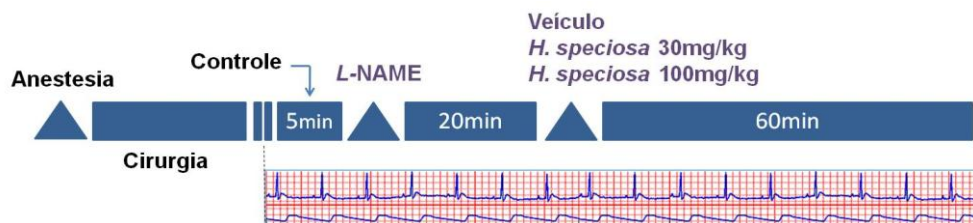


Figura 8 – Protocolos I a V para avaliação da atividade cardiovascular do extrato etanólico da *Hancornia speciosa* em ratos Wistar por indução do aumento da pressão arterial por angiotensina I (ANG I), angiotensina II (ANG II), noradrenalina (NA) e metil éster N^ω-nitro-L-arginina (L-NAME).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Hancornia speciosa* EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Foi avaliada a atividade do extrato etanólico da *H. speciosa* em ratos SHR conscientes nas doses de 200 ou 400 mg/kg, V.O. Os ratos, previamente cateterizados e submetidos ao jejum de 12 horas, tiveram os sinais cardiovasculares obtidos imediatamente antes à administração do extrato e por seis horas após a administração (figura 9).

Para a obtenção do sinal do ECG, os animais foram mantidos em contentores de acrílico para redução da mobilidade, a fim de evitar a ocorrência de interferências no sinal. Para o grupo de ratos SHR controle, foi administrado o veículo em que foi solubilizado o extrato, assim como para o grupo de ratos *Wistar Kyoto* (WKY). Foi avaliada a capacidade do extrato em reduzir a pressão arterial dos ratos SHR em relação aos valores pressóricos obtidos anteriormente à administração e aos grupos controles SHR e WKY, além das alterações do ECG.

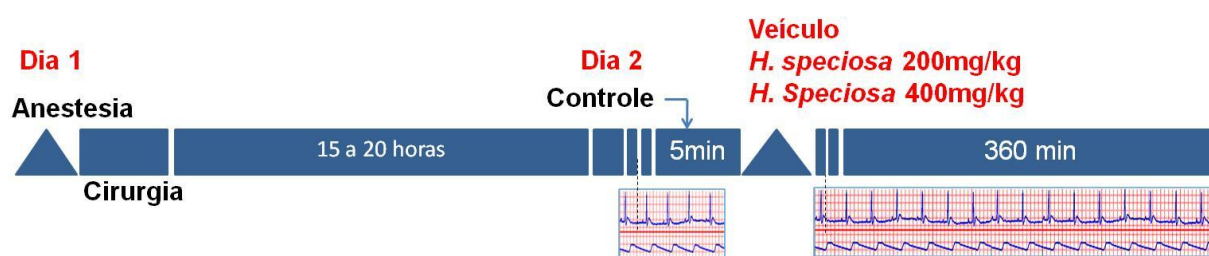


Figura 9: Protocolo de avaliação da atividade cardiovascular do extrato da *Hancornia speciosa* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e *Wistar Kyoto* (WKY) que receberam por via oral extrato ou veículo.

4.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais para a avaliação da atividade cardiovascular do extrato etanólico da *H. speciosa* foram:

Indução do aumento PA pela ANG I (protocolo I):

- Grupo 1: Veículo V.O. + ANG I (1, 10 e 100 pmol) I.V.;
- Grupo 2: Captopril 60 mg/kg V.O.+ ANG I (1, 10 e 100 pmol) I.V.;

- Grupo 3: *H. speciosa* 100 mg/kg V.O.+ ANG I (1, 10 e 100 pmol) I.V.;
- Grupo 4: *H. speciosa* 200 mg/kg V.O.+ ANG I (1, 10 e 100 pmol) I.V.;

Indução do aumento da PA pela ANG II (protocolo II):

- Grupo 1: Veículo V.O. + ANG II (0,5; 5 e 50 pmol) I.V.;
- Grupo 2: Losartana 30mg/kg V.O. + ANG II (0,5; 5 e 50 pmol) I.V.;
- Grupo 3: *H. speciosa* 100 mg/kg V.O. + ANG II (0,5; 5 e 50 pmol) I.V.;
- Grupo 4: *H. speciosa* 200 mg/kg V.O. + ANG II (0,5; 5 e 50 pmol) I.V.;

Indução do aumento da PA pela NA (protocolo III e IV):

- Grupo 1: Veículo V.O. + NA (10, 100 pmol, 1 e 10 nmol) I.V.;
- Grupo 2: Veículo V.O.+ prazosina 0,1 mg/kg I.V. + NA (10, 100 pmol, 1 e 10 nmol) I.V.;
- Grupo 3: *H. speciosa* 100 mg/kg V.O. + NA (10, 100 pmol, 1 e 10 nmol) I.V.;
- Grupo 4: *H. speciosa* 200 mg/kg V.O. + NA (10, 100 pmol, 1 e 10 nmol) I.V.;
- Grupo 5: *H. speciosa* 100 mg/kg V.O. + prazosina 0,1 mg/kg I.V. + NA (10, 100pmol, 1 e 10 nmol) I.V.;

Indução do aumento da PA pelo L-NAME (protocolo V):

- Grupo 1: L-NAME 60mg/kg I.V. + Veículo I.V.
- Grupo 2: L-NAME 60mg/kg I.V. + *H. speciosa* 30 mg/kg I.V.
- Grupo 3: L-NAME 60mg/kg I.V. + *H. speciosa* 100 mg/kg I.V.

Ratos SHR:

- Grupo 1: Veículo V.O. (SHR);
- Grupo 2: Veículo V.O. (WKY);
- Grupo 3: *H. speciosa* 200 mg/kg V.O. (SHR);
- Grupo 4: *H. speciosa* 400 mg/kg V.O. (SHR).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros cardiovasculares avaliados atenderam ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Foram então analisados por *One-way ANOVA*, seguido do pós-teste de *Bonferroni*. Como ferramenta para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EXTRATO ETANÓLICO DA *Hancornia speciosa*

Foram obtidos 69,6 g de extrato etanólico seco das folhas de *H. speciosa* a partir de 1,01 kg do material vegetal pulverizado, o que corresponde ao rendimento de 6,9%.

5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO

A figura 10 apresenta o cromatograma obtido por RP-HPLC para o extrato etanólico das folhas da *H. speciosa*. Foi observado um perfil com predomínio de picos referentes a substâncias polares, cujo tempo de retenção (TR) foi de 0 a 20 minutos. Poucos picos foram relacionados aos compostos de baixa polaridade, com TR superior a 35 minutos ou polaridade intermediária, com TR entre 20 a 35 minutos.

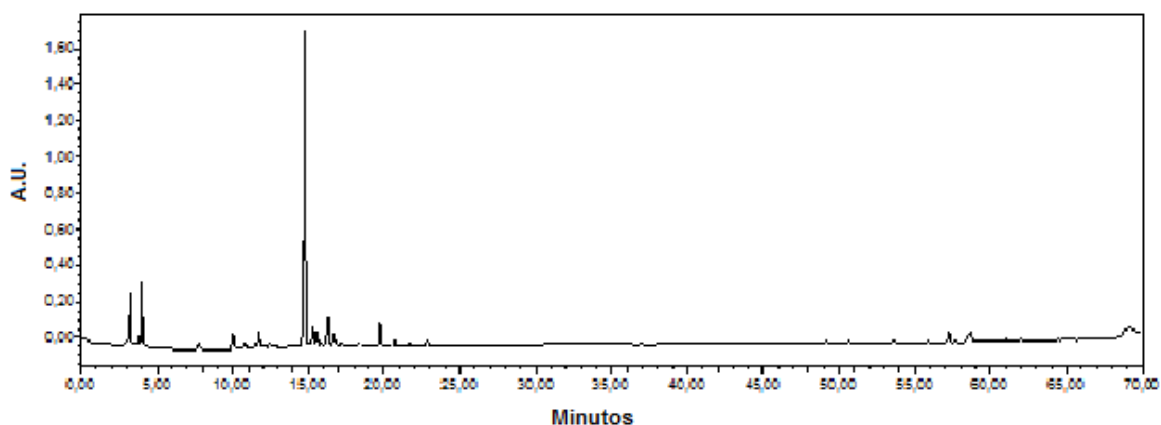


Figura 10 – Cromatograma, obtido por RP-HPLC-UV, para o extrato etanólico bruto de folhas de *Hancornia speciosa*. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 minutos, seguido de 5 minutos isocrático); temperatura 40°C; detecção UV_{210 nm}; fluxo de 1 ml/min.

5.3 PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E ELETROCARDIOGRÁFICAS INDUZIDAS PELA ANGIOTENSINA I, ANGIOTENSINA II E NORADRENALINA.

Foram obtidas curvas dose-respostas de diferentes doses de angiotensina (ANG I), angiotensina II (ANG II) e noradrenalina (NA) a fim de caracterizar e

selecionar 3 ou 4 doses para compor o protocolo de indução do aumento da pressão arterial (PA) em ratos.

A figura 11 apresenta as variações máximas da PAS, PAD e FC obtidas após a administração de diferentes doses de ANG I, ANG II e NA. As médias dos valores absolutos estão apresentadas nas tabelas 2 a 4. Os parâmetros foram avaliados no momento da variação máxima da PA após a administração das substâncias hipertensoras em relação ao controle obtido imediatamente anterior à cada administração. As respostas máximas da PA ocorreram 20 a 40 segundos após as administrações I.V., seguida por redução gradual aos valores normais, por cerca de 5 minutos. Foi possível verificar que as diferentes doses de ANG I, ANG II e NA induziram ao aumento dose-dependente da PAS e PAD.

Foi observado diferença significativa das variações da PAS e PAD entre as doses de 1 e 10 pmol, 10 e 100 pmol de ANG I. A PA máxima atingida foi de 146 mmHg e 107 mmHg para PAS e PAD, respectivamente, após a administração de 100 pmol de ANG I (tabela 2).

Em relação a ANG II, foi observada diferença entre as variações da PA para as doses de 0,5 e 5 pmol, 5 e 50 pmol. A PA máxima atingida foi de 169 mmHg e 114 mmHg para PAS e PAD, respectivamente, após 50 pmol de ANG II (tabela 3).

Foi observado que a NA também induziu a resposta pressora (figura 12), cuja variação máxima ocorreu após a dose de 10 nmol. A PA máxima atingida foi de 211 mmHg para PAS e 138 mmHg para PAD (tabela 4). Foi observado diferença significativa das variações da PAS e PAD entre as doses de 10 e 100 pmol, 100 pmol e 1 nmol, 1 nmol e 10 nmol de NA, confirmando a resposta dose-dependente.

Em relação à FC (figura 11), não foi observado alteração significativa para as diferentes doses de ANG I e ANG II. Para a NA foi observada taquicardia associada aos aumentos pressóricos, sendo significativo para a dose 1 nmol, cujo valor máximo foi de 250 bpm.

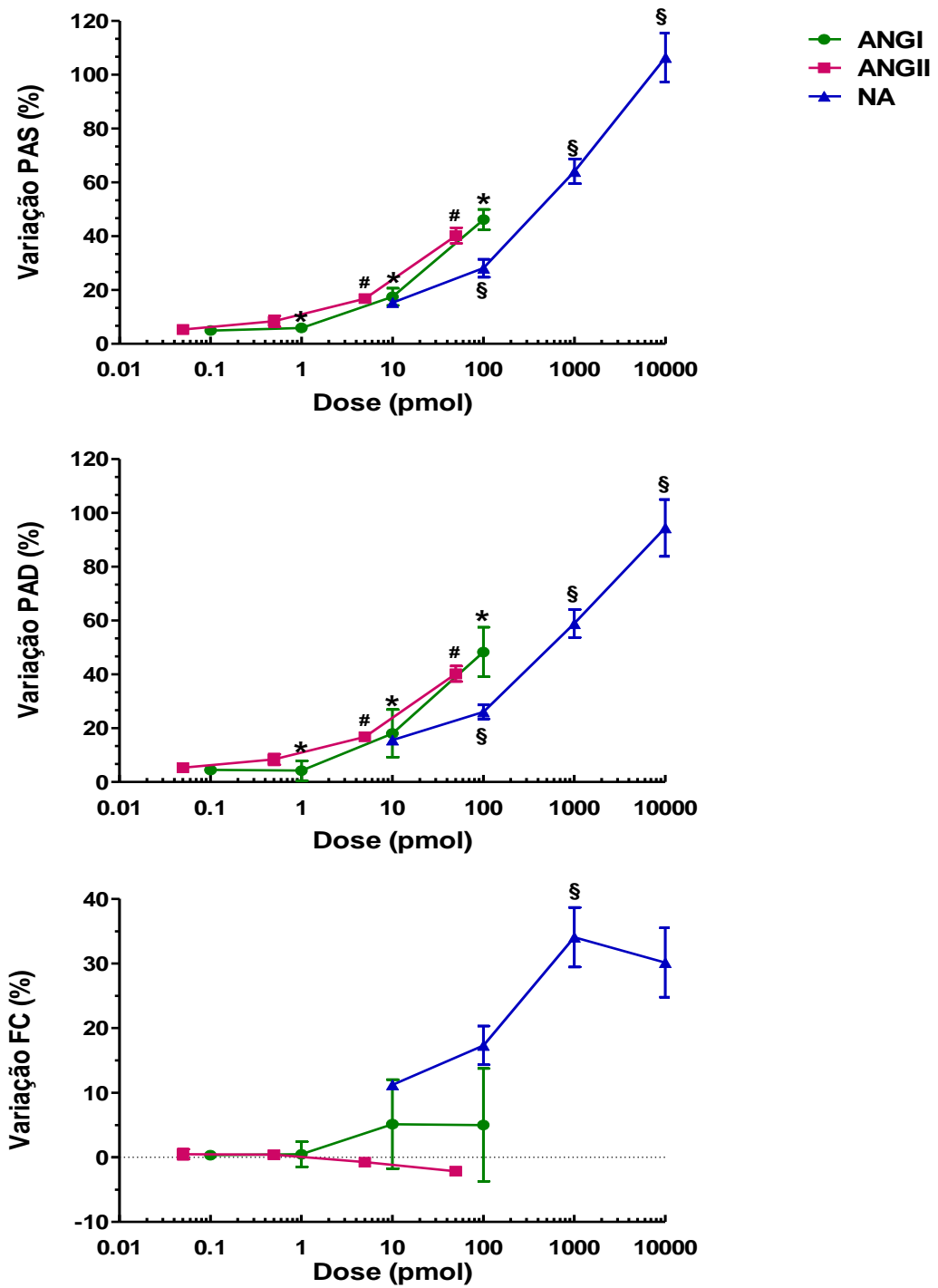


Figura 11: Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC) após a administração de diferentes doses de angiotensina I (ANG I), angiotensina II (ANG II) e noradrenalina (NA) por via intravenosa em ratos anestesiados (n = 6). Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ em relação à variação da dose anteriormente administrada de ANG I; # $P \leq 0,05$ em relação à dose anteriormente administrada de ANG II; § $P \leq 0,05$ em relação à dose anteriormente administrada de NA – ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

Tabela 2 – Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 0,1; 1; 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I).

Parâmetro	Controle	0,1 pmol	1 pmol	10 pmol	100 pmol
PAS (mmHg)	100 ± 2,7	103 ± 2,2	105 ± 3,0	119 ± 6,2*	146 ± 6,6*
PAD (mmHg)	72 ± 3,4	74 ± 2,9	75 ± 3,5	84 ± 6,1	107 ± 5,6*
FC (bpm)	225 ± 8,6	225 ± 5,5	210 ± 8,3	203 ± 11,4	196 ± 10,2

Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6).

Tabela 3 – Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 0,5, 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II).

Parâmetro	Controle	0,5 pmol	5 pmol	50 pmol
PAS (mmHg)	114 ± 3,3	128 ± 4,6*	140 ± 3,5*	169 ± 3,0*
PAD (mmHg)	76 ± 2,5	84 ± 4,1	93 ± 2,2*	114 ± 2,2*
FC (bpm)	234 ± 10,8	224 ± 10,5	232 ± 12,1	242 ± 15,9

Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6).

Tabela 4 – Média dos valores absolutos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA).

Parâmetro	Controle	10 pmol	100 pmol	1 nmol	10 nmol
PAS (mmHg)	105 ± 3,8	111 ± 5,5	125 ± 7,9*	164 ± 9,4*	211 ± 8,1*
PAD (mmHg)	79 ± 3,7	83 ± 4,6	91 ± 4,2*	114 ± 2,7*	138 ± 1,2*
FC (bpm)	195 ± 19,6	149 ± 12,7	162 ± 13,2	210 ± 16,0*	250 ± 6,4*

Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6).

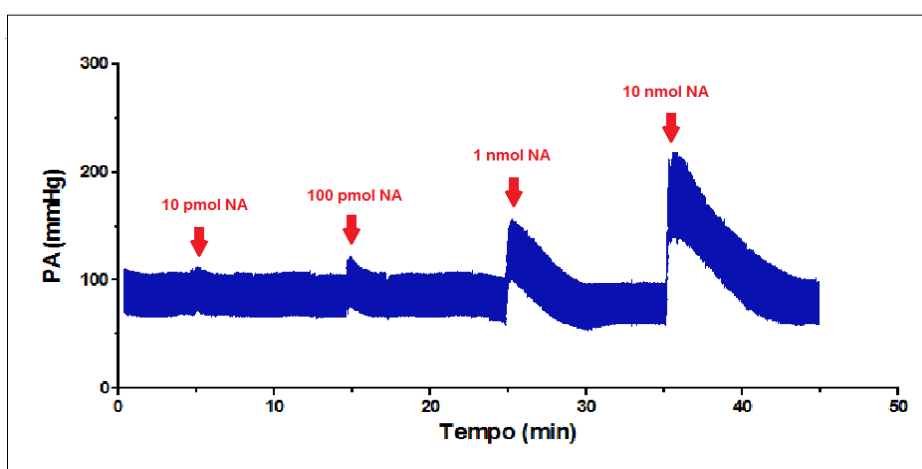


Figura 12 - Pressão arterial (mmHg) de rato anestesiado após as administrações intravenosas de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA).

Assim, dentre as doses avaliadas, foram selecionadas 3 doses de ANG I e ANG II para caracterização dos parâmetros cardiovasculares e para compor o protocolo de avaliação da atividade cardiovascular do extrato etanólico da *H. speciosa*. As doses selecionadas foram 1, 10 e 100 pmol para ANG I e 0,5; 5 e 50 pmol para ANG II. Em relação às alterações eletrocardiográficas induzidas pela NA, não foi necessário realizar a caracterização por ser já descrito na literatura (Vidal *et al.*, 2010).

Os valores máximos alcançados para os parâmetros cardiovasculares após ANG I e ANG II, assim como após os pré-tratamentos com os respectivos fármacos anti-hipertensivos, estão apresentados nas figuras 13 e 14.

A administração I.V. de 10 e 100 pmol de ANG I induziu ao aumento significativo da PAS ($19 \pm 6,8\%$ e $46 \pm 6,5\%$, respectivamente) e PAD ($18 \pm 0,8\%$ e $48 \pm 9,2\%$, respectivamente) em relação ao período controle. O intervalo PR do ECG aumentou, respectivamente, $8 \pm 1,5\%$ e $11 \pm 0,7\%$ após as administrações de 10 e 100 pmol, em relação ao período controle. Não foram observadas alterações no intervalo QRS. Foi observado que o intervalo QT aumentou $10 \pm 1,6\%$ e $12 \pm 0,7\%$ após a administração de 10 e 100 pmol, respectivamente. O QTc aumentou $12 \pm 2,3\%$ e $14 \pm 3,1\%$ após 10 e 100 pmol, respectivamente (figura 13).

O tratamento com captopril 50 mg/kg (figura 13), por si só, reduziu significativamente a PA e foi capaz de atenuar significativamente o aumento da PA induzido por ANG I. O efeito da administração I.V. de 10 e 100 pmol de ANG I foi atenuado pelo captopril, em 18,7 e 22,3 % para a PAS e em 17,4 e 22,1 %, respectivamente. Foi observada a redução da FC para o grupo captopril após 10 e 100 pmol. Não foram observadas alterações significativas dos intervalos PR, QRS e QT do ECG em relação ao grupo tratado com o captopril. Para o QTc o captopril atenuou em 10,8 % o aumento induzido pela ANG I na dose de 100 pmol.

A administração I.V. de 0,5; 5 e 50 pmol de ANG II (figura 14) induziu ao aumento significativo da PAS ($13 \pm 2,4\%$, $23 \pm 3,0\%$ e $49 \pm 3,9\%$, respectivamente) e PAD ($10 \pm 2,2\%$, $23 \pm 2,2\%$ e $51 \pm 5,4\%$, respectivamente). Não foram observadas alterações na FC, intervalos PR e QRS. Foi observado aumento do intervalo QT de $8 \pm 2,4\%$ e $13 \pm 1,9\%$ e do QTc em $4 \pm 9,0\%$ e $17 \pm 3,1\%$ após 5 e 50 pmol, respectivamente.

O tratamento com losartana (30mg/kg) (figura 14) não reduziu a PA por si só, mas foi capaz de atenuar significativamente o aumento da PA induzido pela ANG II. Assim, a losartana atenuou o aumento da PAS em 12,7 e 26,4 %, e PAD em 6,6 e 23,5 %, respectivamente, após a administração de 5 e 50 pmol de ANG II. Não foram observadas alterações significativas da FC e intervalos PR, QRS, QT e QTc do ECG em relação ao período controle e ao grupo veículo.

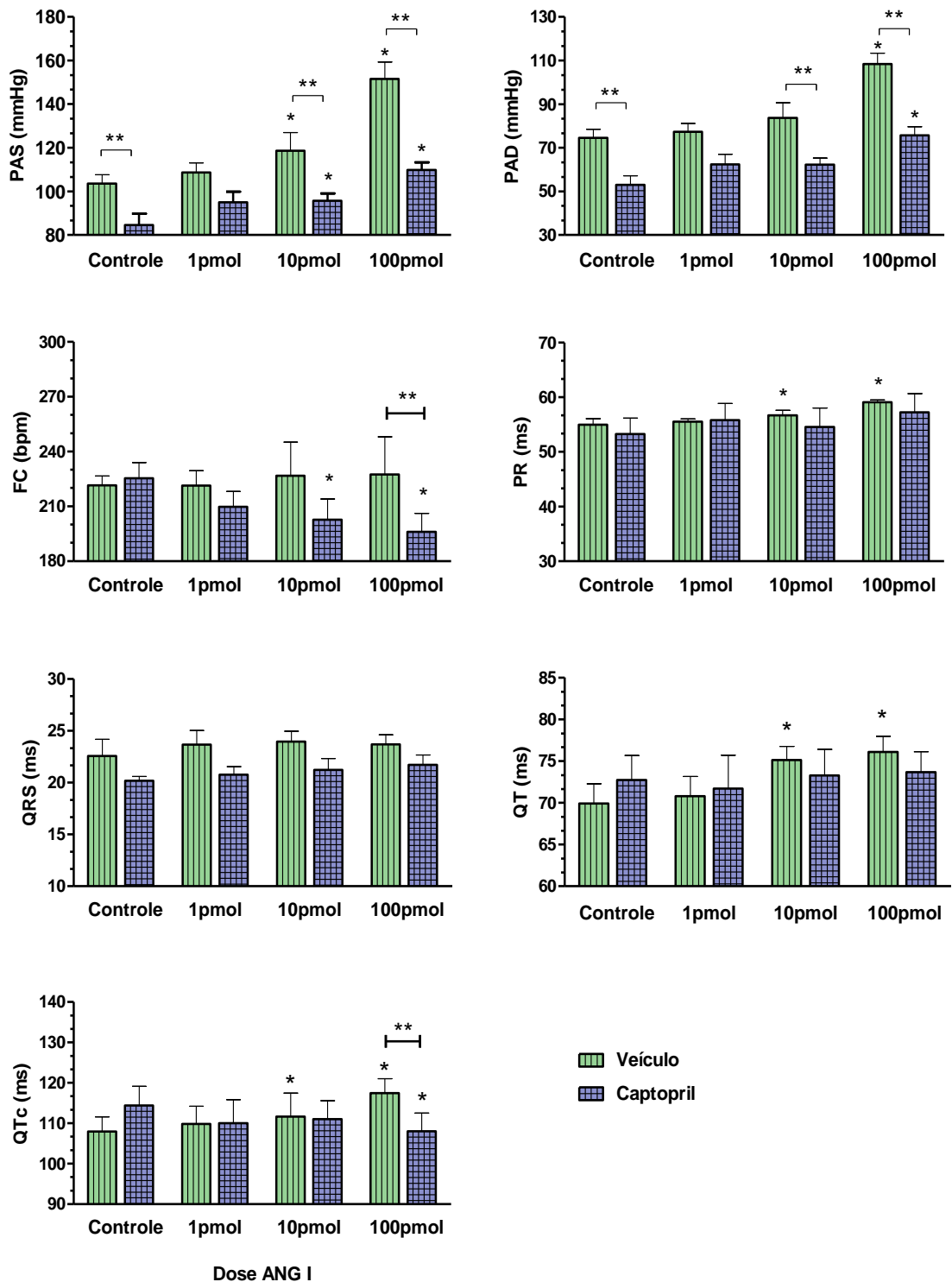


Figura 13 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (controle) e após a administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos anestesiados que receberam veículo ou captopril (50 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6). * Diferença em relação ao período controle do respectivo grupo. ** Diferença em relação ao grupo indicado ($P \leq 0,05$, ANOVA one-way seguido de Bonferroni).

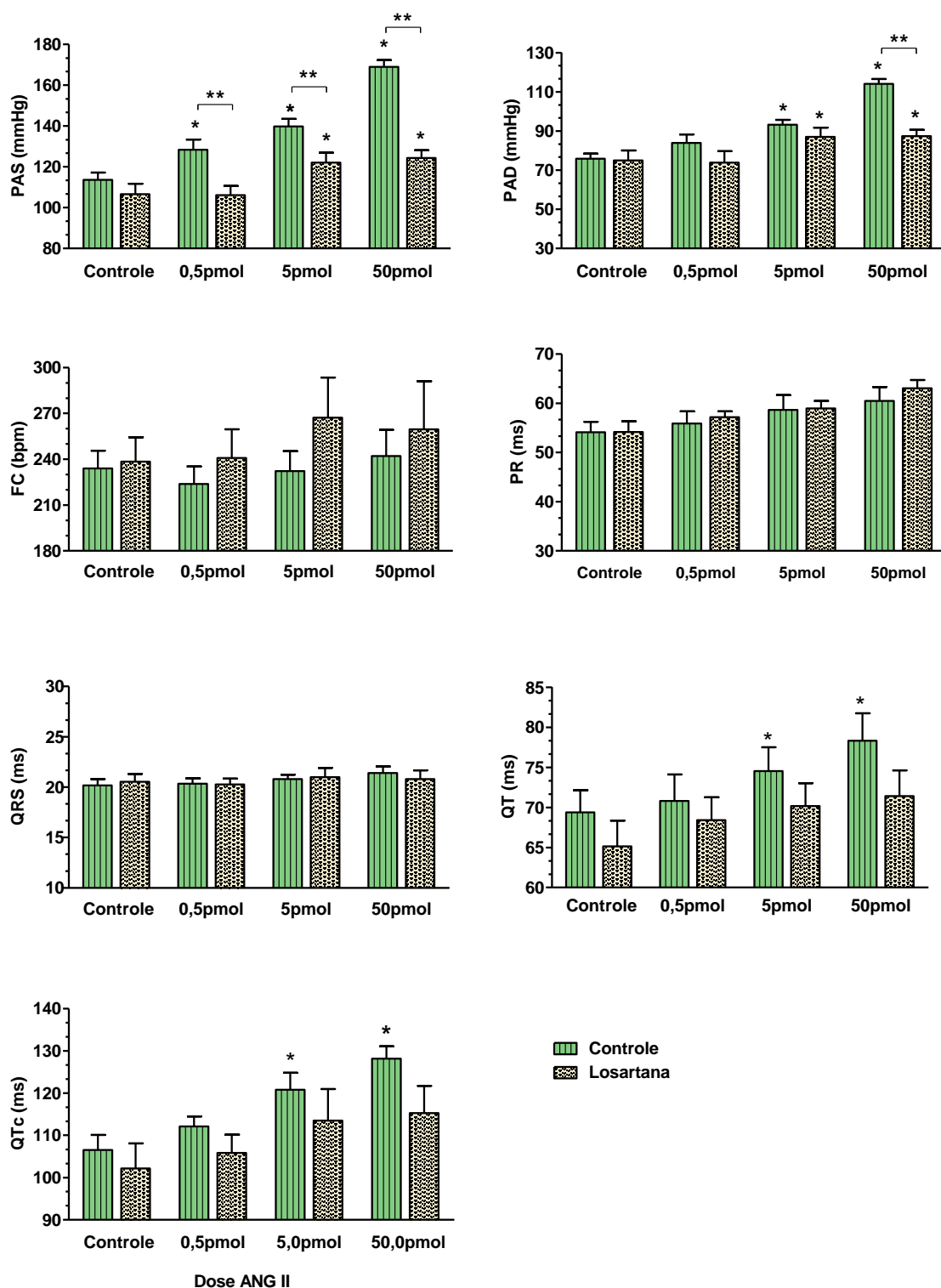


Figura 14 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (controle) e após a administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos anestesiados que receberam veículo ou losartana (30 mg/kg) via oral. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=6). * Diferença em relação ao controle. ** Diferença em relação ao grupo indicado ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hancornia speciosa*

5.4.1 Modelo de indução de alterações pressóricas pela angiotensina I

Para a avaliação da atividade cardiovascular do extrato de *H. speciosa* por meio da indução do aumento da PA pela ANG I, os resultados estão apresentados como as médias dos valores absolutos dos parâmetros cardiovasculares (figura 15) e variação percentual em relação ao período controle anterior às administrações de ANG I (tabela 5).

O extrato da *H. speciosa* na dose de 200 mg/kg (figura 15), assim como o captopril, foi capaz de atenuar o aumento da PAS em 5,7 e 9,8% e da PAD em 14,2 e 18,2% após 10 e 100 pmol, respectivamente.

Foi avaliado o tempo de duração da resposta pressora em presença do captopril e do extrato após cada dose de ANG I. Após a administração de 10 e 100 pmol de ANG I, com a administração prévia apenas do veículo, a duração da resposta pressora foi de aproximadamente 2 e 4 minutos, respectivamente. Após o tratamento com captopril, o tempo da resposta pressora a ANG I 10 e 100 pmol foi de aproximadamente 1 e 2 minutos, respectivamente. Para o extrato 100 mg/kg, o tempo de resposta a ANG I 10 pmol foi de aproximadamente 1,5 minutos e, o tempo de resposta a ANG I 100 pmol foi semelhante ao grupo veículo. Após 200 mg/kg do extrato, não foi observado resposta pressora à ANG I 10 pmol e o tempo de resposta a ANG I 100 pmol foi de 1 minuto. Estes resultados demonstram a atividade inibidora da ECA *in vivo* do extrato de *H. speciosa* e a sua potencial atividade protetora frente a estímulos pressóricos intensos.

Não foram observadas alterações significativas na FC e intervalo QRS do ECG entre o grupo veículo e os demais grupos avaliados após as doses de ANG I (figura 15). Para o intervalo PR, nos grupos veículo e *H. speciosa* 200 mg/kg, foi observado o aumento após a administração de 10 e 100 pmol de ANG I, em relação ao período controle. Para o intervalo QT, foi observado que o extrato da *H. speciosa*, na dose de 100 mg/kg, amenizou o aumento após a administração de 10 pmol de ANG I em 9,0 %. Para o grupo tratado com 200 mg/kg do extrato, foi amenizado o aumento do

intervalo QT em 11,3 % e 8,1 % após as administrações de 10 e 100 pmol de ANG I, respectivamente.

O captopril amenizou o aumento do QTc, em relação ao grupo veículo, em 10,9% após a administração de 100 pmol de ANG I. O extrato, na dose de 200 mg/kg, também amenizou o aumento do QTc após as administrações de 10 e 100 pmol de ANG I em 13,0 e 14,0%, respectivamente.

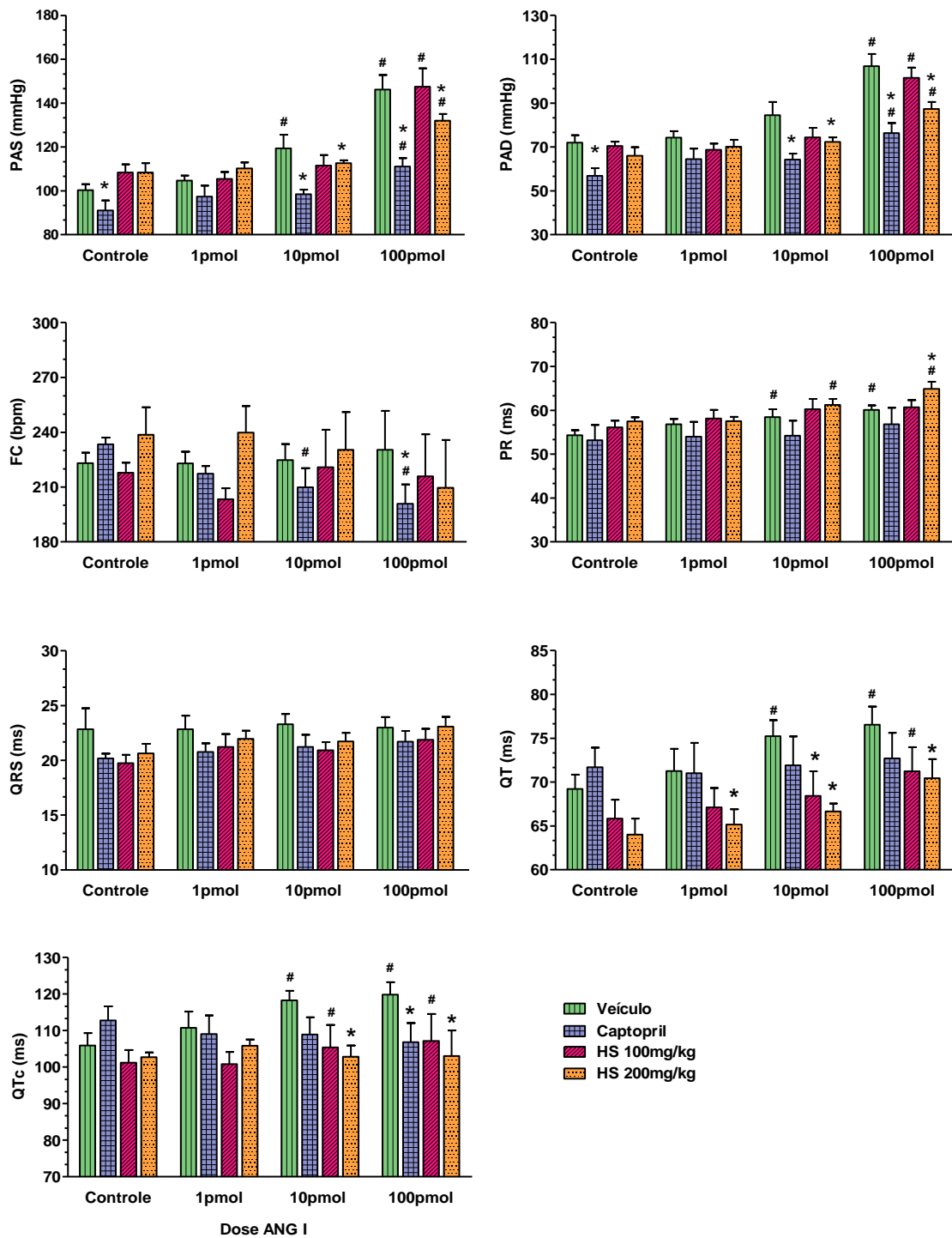


Figura 15 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos anestesiados que receberam veículo, captopril (50 mg/kg) e extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n = 5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de ANG I. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ($P \leq 0,05$, ANOVA one-way seguido de Bonferroni).

Tabela 5 – Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 1, 10 e 100 pmol de angiotensina I (ANG I) em ratos que receberam veículo, captopril (50 mg/kg) ou extrato da *H. speciosa* (100 ou 200 mg/kg) via oral, em relação ao período controle.

Parâmetro	Grupo	Dose de ANG I		
		1pmol	10pmol	100pmol
PAS (mmHg)	Veículo	4,6 ± 2,62	19,4 ± 6,80	46,0 ± 6,53
	Captopril	11,9 ± 6,34	13,3 ± 4,59	28,6 ± 8,88
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	-2,6 ± 1,31	3,0 ± 2,51	36,1 ± 5,60
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	4,2 ± 1,296	6,3 ± 3,27*	22,0 ± 3,22*
PAD (mmHg)	Veículo	4,2 ± 3,66	18,1 ± 8,83	48,3 ± 9,17
	Captopril	22,7 ± 8,37	22,6 ± 6,05	48,6 ± 11,61
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	2,8 ± 2,00	10,8 ± 1,87	56,6 ± 11,40
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	6,7 ± 2,42	10,5 ± 3,55	33,5 ± 5,23*
FC (bpm)	Veículo	0,5 ± 1,94	5,1 ± 6,89	5,0 ± 8,73
	Captopril	-6,9 ± 0,98	-10,1 ± 4,11*	-14,0 ± 3,97*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	-0,5 ± 0,92	0,2 ± 0,83	-5,0 ± 2,65
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	-0,5 ± 0,92	-3,7 ± 3,98	-13,0 ± 5,14*
QRS (ms)	Veículo	1,1 ± 2,54	3,6 ± 3,81	2,3 ± 4,26
	Captopril	2,9 ± 3,04	5,0 ± 4,20	7,6 ± 3,91
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	7,4 ± 3,26	6,1 ± 1,31	10,7 ± 2,10
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	6,5 ± 1,46	5,2 ± 1,22	11,9 ± 1,87*
QT (ms)	Veículo	4,4 ± 1,36	10,4 ± 1,55	12,4 ± 0,71
	Captopril	-1,1 ± 3,17	0,3 ± 3,45*	1,5 ± 3,44*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	2,1 ± 2,15	3,9 ± 1,98*	7,9 ± 1,66
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	1,9 ± 1,10	4,4 ± 2,58*	10,3 ± 3,40
QTc (ms)	Veículo	4,5 ± 1,63	11,9 ± 2,33	13,6 ± 3,12
	Captopril	-3,4 ± 2,82	-3,4 ± 2,83*	-5,2 ± 4,00*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	-0,2 ± 2,28	4,0 ± 3,76	5,3 ± 4,55
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	3,1 ± 1,28	0,0 ± 1,49*	0,2 ± 5,23*

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6).

* Diferença em relação ao grupo veículo ($P \leq 0,05$, ANOVA one-way seguido de Bonferroni).

5.4.2 Modelo de indução de alterações pressóricas pela angiotensina II

Para a avaliação da atividade cardiovascular do extrato de *H. speciosa* por meio do aumento da pressão arterial pela ANG II, os resultados estão apresentados como a média dos valores absolutos dos parâmetros cardiovasculares (figura 16) e variação percentual em relação ao período controle anterior às administrações de ANG II (tabela 6).

O extrato da *H. speciosa* na dose de 200 mg/kg (figura 16) foi capaz de atenuar o aumento da PAS em 11,1 %, 10,4 % e 8,6 % e, da PAD, em 8,9%, 8,6 % e 8,4 % , após 0,5; 5 e 50 pmol, respectivamente em relação ao grupo veículo. A losartana apresentou efeito semelhante ao extrato ao atenuar os aumentos pressóricos.

Não foram observadas alterações significativas na FC e nos intervalos PR e QRS do ECG entre o grupo veículo e os demais grupos avaliados após as doses de ANG II (figura 16), exceto para o grupo *H. speciosa* 200 mg/kg, em que foi observado a redução da FC em relação ao período controle, após a administração de 50 pmol.

Em relação ao intervalo QT, foi observado que o extrato de *H. speciosa*, na dose de 200 mg/kg, amenizou o aumento após a administração de 5 e 50 pmol de ANG II, em 13,8 e 11,5 %, respectivamente em relação ao grupo veículo.

A menor dose do extrato amenizou o aumento do QTc, em relação ao grupo veículo, em 34,4% após a administração de 50 pmol de ANG II. Para a dose de 200 mg/kg de extrato, o aumento do QTc foi amenizado em 13,7 % após a administração de 50 pmol de ANG II.

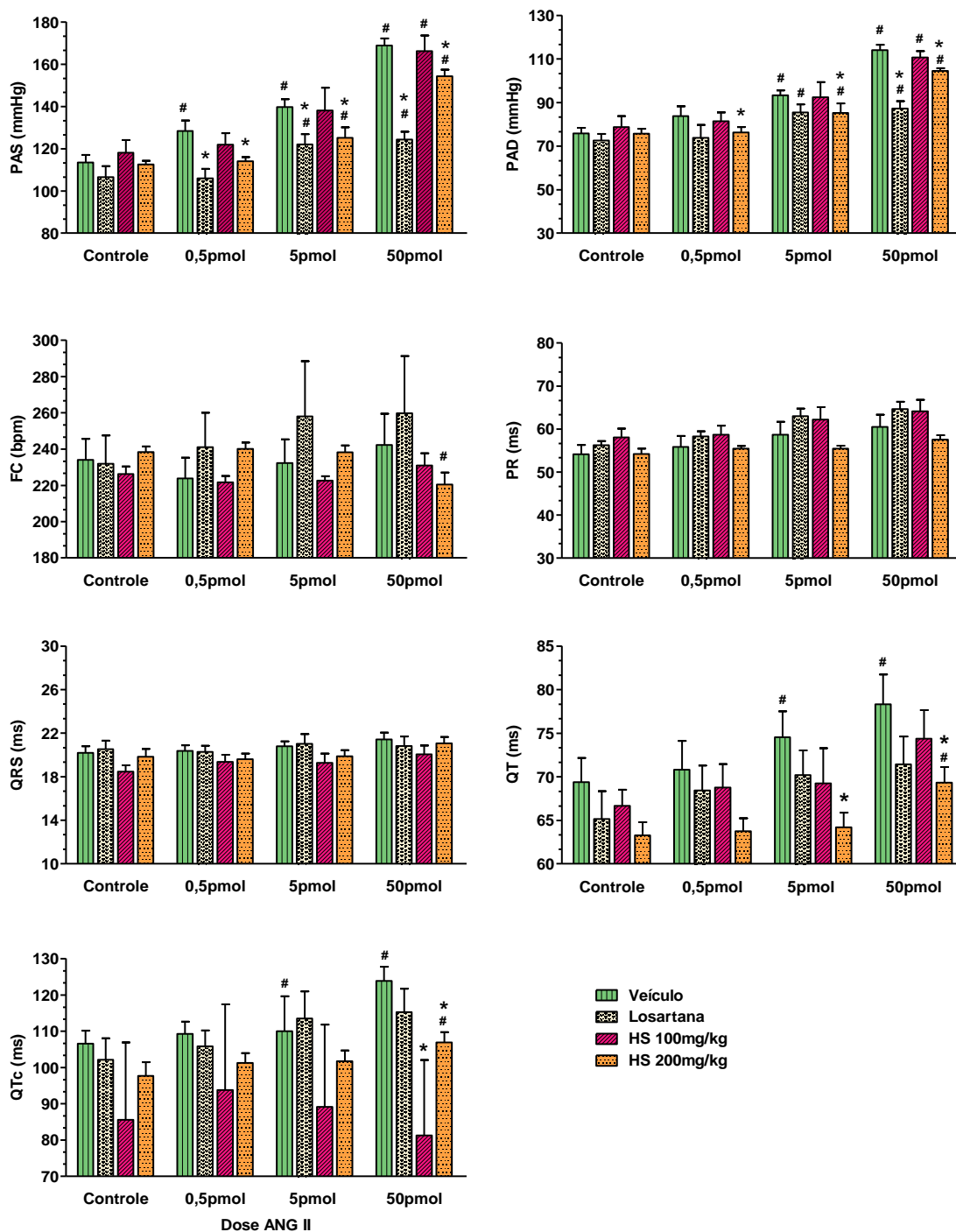


Figura 16 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos anestesiados que receberam veículo, losartana (30 mg/kg) e extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de ANG II. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ($P \leq 0,05$, ANOVA one-way seguido de Bonferroni).

Tabela 6 – Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 0,5; 5 e 50 pmol de angiotensina II (ANG II) em ratos que receberam veículo, losartana (30 mg/kg) e extrato da *H. speciosa* (100 e 200 mg/kg) via oral, em relação ao período controle.

Parâmetro	Grupo	Dose de ANG II		
		0,5 pmol	5 pmol	50 pmol
PAS (mmHg)	Veículo	13,0 ± 2,38	23,3 ± 3,00	49,3 ± 3,98
	Losartana	0,5 ± 5,87	15,3 ± 5,13*	17,8 ± 6,14*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	3,6 ± 3,34	16,6 ± 5,89	41,2 ± 4,02
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	1,4 ± 1,22*	11,1 ± 3,93*	37,2 ± 3,12*
PAD (mmHg)	Veículo	10,3 ± 2,19	23,4 ± 2,28	51,4 ± 5,42
	Losartana	-6,8 ± 4,10	12,9 ± 4,30	13,6 ± 5,44
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	4,9 ± 4,50	18,5 ± 8,28	44,9 ± 7,22
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	0,8 ± 1,41*	12,4 ± 3,63*	38,7 ± 4,81*
FC (bpm)	Veículo	-4,2 ± 1,81	-0,3 ± 4,99	3,7 ± 5,89
	Losartana	2,8 ± 3,07	15,1 ± 9,35	9,8 ± 10,66
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	-0,4 ± 2,56	2,9 ± 4,29	-3,1 ± 7,86
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	0,8 ± 0,70	-0,1 ± 1,01	-7,6 ± 2,06*
QRS (ms)	Veículo	-4,2 ± 1,81	-0,3 ± 4,99	3,7 ± 5,89
	Losartana	2,9 ± 2,61	6,7 ± 3,12	9,2 ± 2,99
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	5,0 ± 1,12	4,4 ± 1,81	8,6 ± 1,38
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	-0,9 ± 1,33	0,4 ± 2,21	6,5 ± 2,88
QT (ms)	Veículo	1,9 ± 0,92	7,6 ± 2,38	12,9 ± 1,95
	Losartana	4,7 ± 4,10	6,6 ± 3,99	9,1 ± 4,73
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	3,0 ± 1,34	3,5 ± 3,04	11,4 ± 2,50
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	0,8 ± 1,33	1,7 ± 3,34	9,9 ± 3,61
QTc (ms)	Veículo	2,7 ± 2,09	3,5 ± 9,07	16,5 ± 3,12
	Losartana	2,6 ± 4,36	10,2 ± 4,34	11,4 ± 5,09
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	2,6 ± 1,46	3,8 ± 2,56	6,6 ± 5,37
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	3,9 ± 1,63	4,6 ± 3,85	9,9 ± 3,04

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 5 - 6).

* Diferença em relação ao grupo veículo ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

5.4.3 Modelo de indução de alterações pressóricas pela noradrenalina

Para a avaliação da atividade cardiovascular do extrato de *H. speciosa* por meio da indução do aumento da pressão arterial pela NA, os resultados estão apresentados como a média dos valores absolutos dos parâmetros cardiovasculares (figura 16) e variação percentual em relação ao período controle anterior às administrações de NA (tabela 7).

O extrato de *H. speciosa* na dose de 200 mg/kg (figura 17), foi capaz de atenuar o aumento da PAS em 11,1 % e 7,8 % e, da PAD, em 15,1%, e 4,4 % , após 1 e 10 nmol, respectivamente em relação ao grupo veículo.

Foi observada alteração significativa na FC em todos os períodos avaliados para o grupo que recebeu o extrato na dose de 200 mg/kg e, para o grupo que recebeu o extrato na menor dose, foi observada alteração na FC apenas após a administração de 10 nmol de NA.

Não foram observadas alterações significativas nos intervalos PR e QRS do ECG entre o grupo veículo e os demais grupos avaliados após as doses de NA (figura 17). Em relação ao intervalo QT, foi observado que o extrato da *H. speciosa*, na dose de 100 mg/kg, amenizou o aumento após a administração de 10 pmol, 100 pmol, 1 e 10 nmol de NA, em 19,4%; 25,4%; 25,8% e 25,2%, respectivamente. Esta resposta foi superior à resposta obtida para o grupo que recebeu o extrato na dose de 200 mg/kg.

A menor dose do extrato amenizou o aumento do QTc em valores compreendidos entre 20 a 26%, em relação ao grupo veículo, após todas as administrações de NA. Para a dose de 200 mg/kg de extrato, o aumento do QTc foi amenizado em 34,1 % após a administração de 10 nmol de NA.

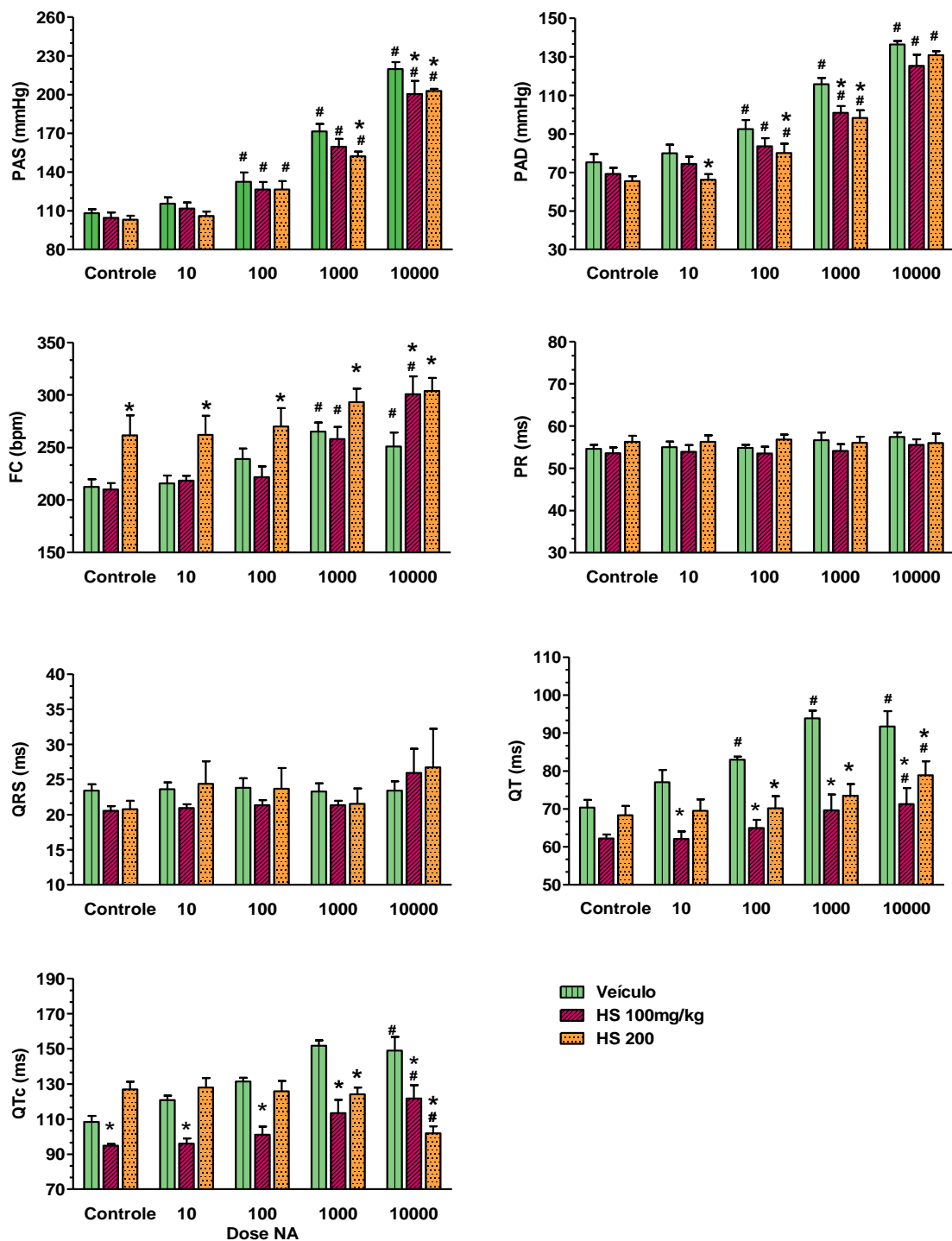


Figura 17 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e índice QTc antes (controle) e após administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos anestesiados que receberam veículo e extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 ou 200 mg/kg) via oral. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de NA. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo. ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

Tabela 7 – Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos que receberam veículo e extrato da *H. speciosa* (100 e 200 mg/kg) via oral, em relação ao período controle.

Parâmetro	Grupo	Dose de NA			
		10 pmol	100 pmol	1 nmol	10 nmol
PAS (mmHg)	Veículo	5,3 ± 1,61	19,0 ± 3,50*	55,9 ± 3,91*	100,9 ± 2,35*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	7,0 ± 2,38	21,1 ± 3,92	52,9 ± 4,53	92,5 ± 9,83
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	2,9 ± 0,90	22,8 ± 4,55	48,0 ± 1,66	97,4 ± 4,83
PAD (mmHg)	Veículo	5,6 ± 1,45	15,0 ± 2,01*	46,5 ± 4,14*	80,9 ± 7,82*
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	6,0 ± 3,17	21,5 ± 4,93	47,3 ± 4,02	85,2 ± 7,38
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	1,1 ± 0,95	22,7 ± 6,51	50,8 ± 5,91	101,3 ± 7,29*
FC (bpm)	Veículo	1,2 ± 0,43	7,3 ± 3,00	24,1 ± 4,61	20,1 ± 5,37
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	2,0 ± 0,80	-0,1 ± 1,73	19,4 ± 6,69	45,6 ± 8,90*
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	0,3 ± 0,61	2,7 ± 3,81	13,2 ± 5,21	16,9 ± 5,40
QRS (ms)	Veículo	-5,0 ± 2,50	-8,4 ± 7,82	-8,7 ± 6,96	-14,1 ± 5,71
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	0,0 ± 2,78	-0,6 ± 10,6	3,2 ± 2,39	23,2 ± 17,03*
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	1,0 ± 0,85	-2,5 ± 0,42	2,9 ± 3,48	31,7 ± 25,10*
QT (ms)	Veículo	7,1 ± 2,93	21,0 ± 5,14	30,8 ± 3,85	32,0 ± 5,74
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	1,1 ± 1,19	8,4 ± 2,38*	12,5 ± 5,85*	16,9 ± 5,14*
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	1,1 ± 1,19	8,4 ± 2,38*	12,5 ± 5,85*	16,9 ± 5,14*
QTc (ms)	Veículo	7,6 ± 2,88	24,0 ± 5,86	40,5 ± 4,40	40,4 ± 7,95
	<i>H. speciosa</i> 100mg/kg	2,5 ± 1,70	10,4 ± 3,24	20,6 ± 6,98*	31,7 ± 6,52
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	4,1 ± 1,15	6,3 ± 1,77*	15,1 ± 3,23*	24,5 ± 1,44*

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 5 - 6).

* Diferença em relação ao grupo veículo ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

Para a avaliação da atividade cardiovascular do extrato em associação com a prazosina 0,1 mg/kg, por meio da indução do aumento da pressão arterial pela NA, os resultados estão apresentados como a média dos valores absolutos dos parâmetros cardiovasculares (figura 18). É importante notar que os resultados dos grupos veículo e extrato 100 mg/kg estão novamente representados para fins de análise.

O tratamento prévio com prazosina (figura 18) foi capaz de atenuar significativamente o aumento da PA induzido pela NA, sendo para PAS de 24,7 e 35,6 %, e da PAD de 25,7 e 32,4 %, respectivamente após 1 e 10 nmol de NA, em relação ao grupo veículo. A associação do extrato e da prazosina, além de alterar por si só os níveis basais da PAD, atenuou o aumento da PAS em 35,3 e 57,1 %, e da

PAD em 39,1 e 42,9 %, respectivamente após 1 e 10 nmol de NA. A redução do aumento da PA, entre o grupo que recebeu apenas a prazosina e o grupo que recebeu a associação de prazosina e extrato, foi diferente após a administração de 100 pmol e 1 nmol de NA, evidenciando o potencial anti-hipertensivo e cardioprotetor do extrato na dose de 100 mg/kg.

Foi observado o aumento do intervalo PR para o grupo que recebeu o prazosina após a administração de 10 nmol de NA, em relação ao grupo veículo. Os grupos que receberam a prazosina e a associação (prazosina + extrato) apresentaram o intervalo PR maior do que o grupo que recebeu apenas o extrato, sem no entanto, ter influenciado a FC após as doses de 100 pmol e 1 nmol, que não apresentou diferenças entre estes grupos. Não foi observada alteração significativa do intervalo QRS do ECG. Em relação ao intervalo QT e QTc, a prazosina foi capaz de atenuar os aumentos induzidos pela NA 1 e 10 nmol. A associação (prazosina e extrato) foi capaz de atenuar os aumentos de QT e QTc de maneira semelhante ao extrato, após todas as doses de NA.

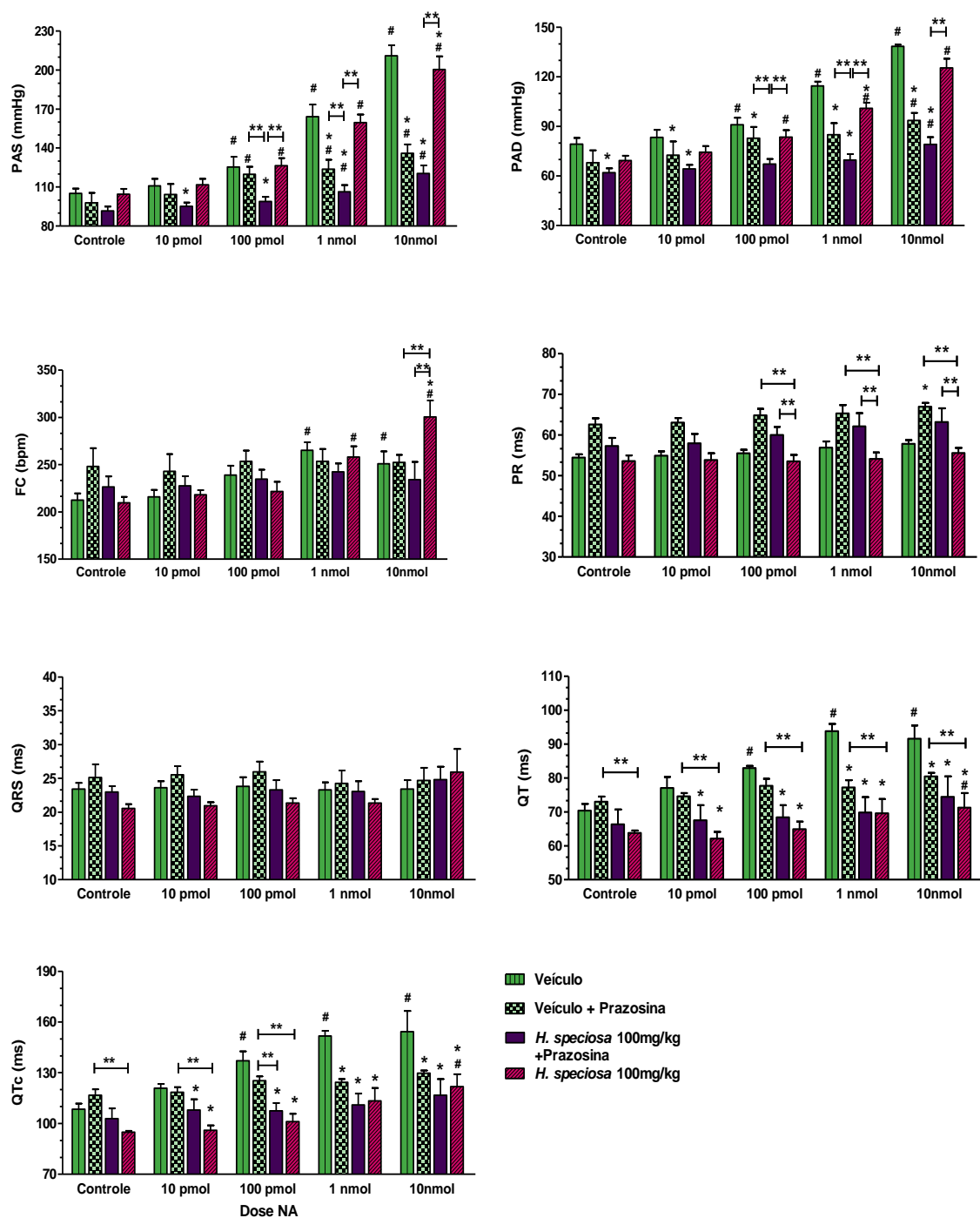


Figura 18: Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), freqüência cardíaca (FC) e intervalos do eletrocardiograma PR, QRS, QT e QTc antes (controle) e após a administração de 10 e 100 pmol, 1 e 10 nmol de noradrenalina (NA) em ratos anestesiados que receberam veículo (V.O.), extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 mg/kg, V.O.) e prazosina (0,1 mg/kg, I.V.). Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao grupo veículo para cada dose de NA. # Diferença em relação ao controle para mesmo grupo ** Diferença em relação ao grupo indicado. ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

5.4.4 Modelo de indução de alterações pressóricas pelo L-NAME

Para a avaliação da atividade hipotensiva do extrato de *H. speciosa* sobre o aumento da PA induzido pelo L-NAME, os resultados estão apresentados como variação da PA e FC durante 30 minutos após a administração I.V. do extrato, nas doses de 30 e 100 mg/kg (figuras 19 a 21).

Inicialmente, foi observado que a inibição aguda da síntese de NO pelo L-NAME induziu ao aumento da PA (figura 19) em 28% e 39% para PAS e PAD, respectivamente, acompanhado de bradicardia (redução de 9,9% da FC). A média dos valores basais de PAS e PAD alteraram de $124 \pm 2,1$ mmHg e $88 \pm 4,8$ mmHg, respectivamente, para $159 \pm 11,3$ mmHg e $122 \pm 8,4$ mmHg, em 20 minutos após a administração do inibidor da síntese de NO, momento imediatamente anterior à administração do extrato I.V.

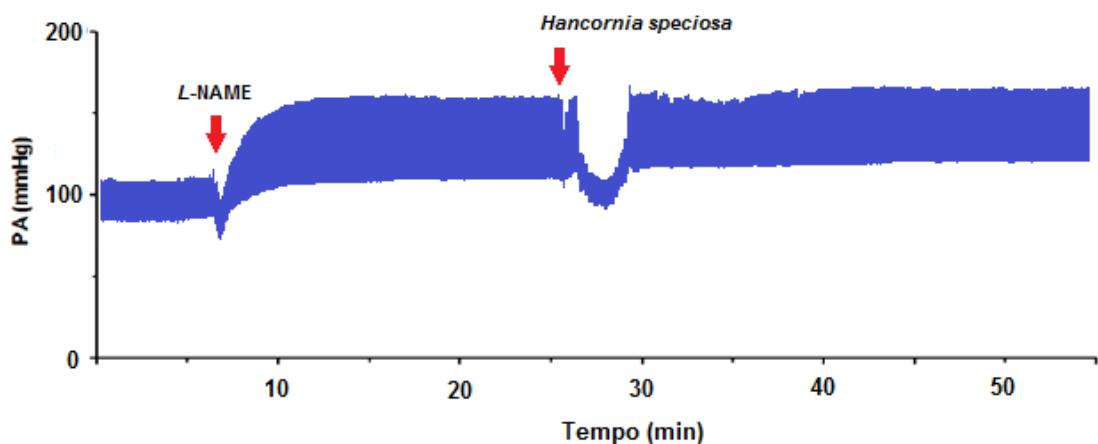


Figura 19: Registro do sinal da pressão arterial de rato anestesiado que recebeu por via intravenosa L-NAME (60 mg/kg) e extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 mg/kg).

O extrato da *H. speciosa* 100 mg/kg induziu a redução significativa da PAS durante os 20 segundos imediatamente após a sua administração e pontualmente aos 60 segundos, 2,5 e 5 minutos, sendo que o mesmo ocorreu para a PAD, exceto para a redução aos 5 minutos (figura 20 e 21). Para a menor dose do extrato, a redução ocorreu aos 10 e 20 segundos após a administração, com redução máxima de $154 \pm 8,5$ para $130 \pm 4,2$ mmHg da PAS e de $117 \pm 6,6$ para $97 \pm 6,3$. Para a maior dose (100 mg/kg), a redução máxima da PA ocorreu em 10 segundos, cujos

valores reduziram de $171 \pm 22,2$ mmHg para $129 \pm 19,5$ mmHg PAS e de 116 ± 11 mmHg para 90 ± 14 mmHg para a PAD. Foi observada a redução da FC após a administração do extrato na dose de 30 mg/kg, durante 20 segundos, com redução máxima de 34 bpm (figura 21). Para o grupo que recebeu o extrato na dose de 100 mg/kg, foi observado aumento da FC em 15 e 30 minutos, com variação máxima de 5 bpm aos 30 minutos.

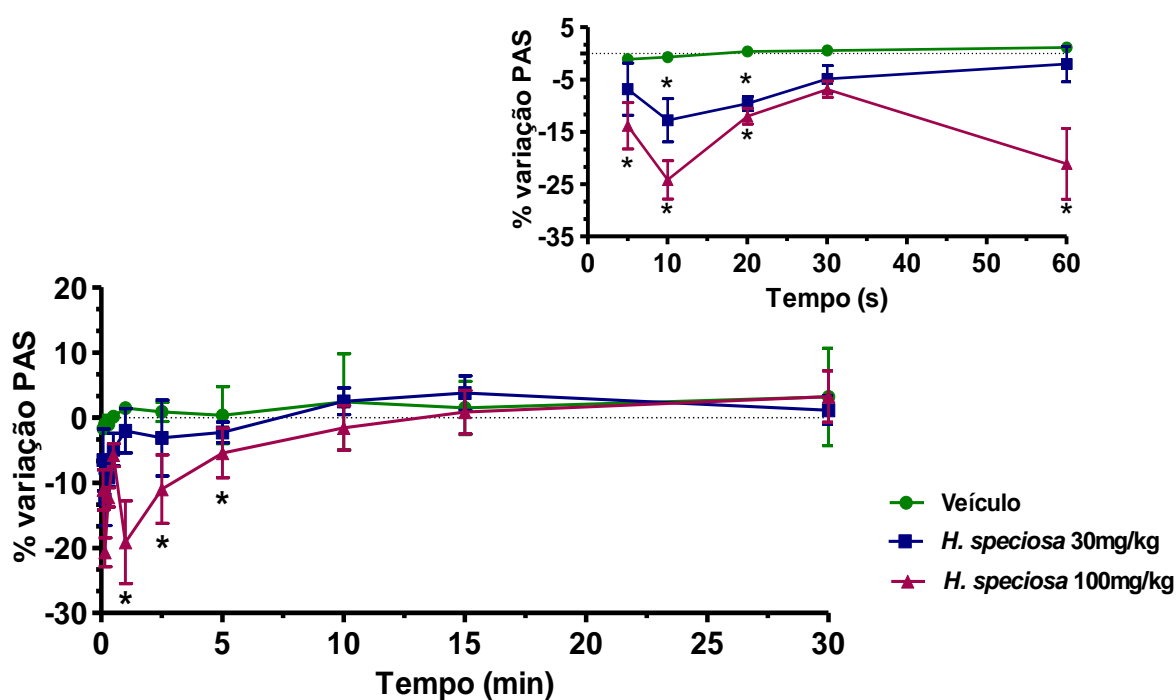


Figura 20 - Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS) após a administração do extrato etanólico de *Hancornia speciosa* 30 e 100 mg/kg por via intravenosa em ratos que receberam previamente L-NAME. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n = 6). * Diferença em relação ao grupo veiculo ($P \leq 0,05$, ANOVA one-way seguido de Bonferroni).

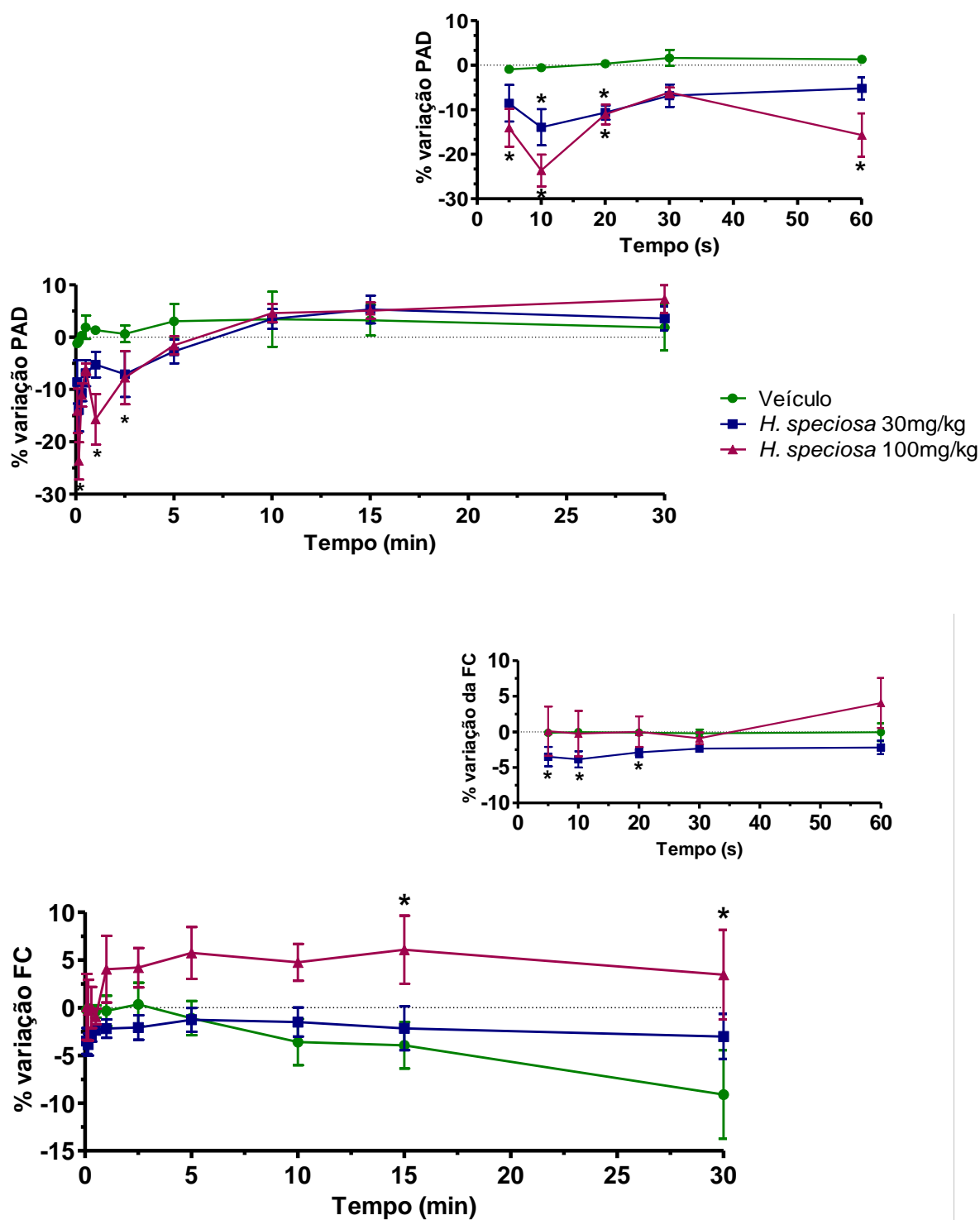


Figura 21 - Variação percentual da pressão arterial diastólica (PAD) e freqüência cardíaca (FC) após administração do extrato etanólico de *Hancornia speciosa* (30 ou 100 mg/kg) por via intravenosa em ratos que receberam previamente *L-NAME*. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n = 6).
 * Diferença em relação ao grupo veículo ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hancornia speciosa* EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Foi avaliada a atividade cardiovascular do extrato de *H. speciosa* (200 ou 400 mg/kg) em ratos SHR e WKY conscientes. O extrato ou veículo foram administrados V.O. e os sinais cardiovasculares obtidos imediatamente antes e por 6 horas após administração. A PA e FC foram mensurados a cada 15 minutos e os intervalos do ECG a cada 30 minutos (figuras 22 e 23).

Em relação ao período controle (tempo 0, figura 22), foi observado que o extrato da *H. speciosa* foi capaz de reduzir a PA significativamente, o que não ocorreu nos grupos que receberam o veículo (SHR veículo e WKY veículo). Para as doses de 200 e 400 mg/kg de extrato, foi observada a redução para a PAS de 8,4 e 9,8% e para a PAD, de 8,1 e 13,5 %, respectivamente. A redução máxima observada foi de 12,7% e 17,3 % para PAS e PAD, respectivamente, para a maior dose do extrato (400 mg/kg) em 180 minutos (tabela 8).

Comparando-se os diferentes grupos a cada tempo avaliado, foi observado que o extrato da *H. speciosa* 200 mg/kg reduziu a PA dos ratos SHR em média de 10,4% e 9,1% para PAS e PAD respectivamente, em relação ao grupo SHR veículo durante o período avaliado. Para a maior dose do extrato (400 mg/kg), houve redução de 7,4% e 8,6% para PAS e PAD, em relação ao grupo SHR veículo, sendo a redução máxima de 10,5% para PAS (de 181,8 mmHg para 162,8 mmHg) e de 18,5% para PAD (de 134 mmHg para 109 mmHg) em 165 minutos.

Foi observado diferença significativa (não apresentada na figura) para a PAS e PAD de ambos os grupos que receberam o extrato em relação ao grupo dos ratos WKY que recebeu o veículo, em todo o período avaliado. A PA dos ratos SHR que receberam o extrato nas doses de 200 e 400 mg/kg se manteve superior ao grupo veículo WKY em 29,6 e 34,0%, respectivamente para a PAS, e para a PAD, em 32,2 e 32,9%, respectivamente.

Em relação à FC (figura 22), houve redução significativa para o grupo que recebeu *H. speciosa* 400 mg/kg em cerca de 8,8% em relação ao tempo 0 (controle), sendo a redução máxima aos 180 minutos. Comparando-se os diferentes grupos, foi

observado que o extrato 400 mg/kg induziu a redução da FC em aproximadamente 3,0 e 7,5% para os grupos SHR veículo e WKY veículo, respectivamente.

Não foi observada alteração dos intervalos PR, QRS, QT e QTc dos grupos em relação aos respectivos controles (tempo 0). Foi observado que intervalo QRS no tempo 0 foi diferente entre os grupos SHR e o grupo WKY. Foi observada a redução do intervalo QT em aproximadamente 5,9% para o grupo que recebeu extrato na dose de 400 mg/kg, a partir de 270 minutos, em relação ao grupo SHR veículo, sendo a redução máxima de 10,3% em 330 minutos. Em relação ao QTc, foi observada a redução a partir de 210 minutos após a administração da *H. speciosa* 400 mg/kg, cuja redução máxima foi 10,8% em relação ao grupo SHR veículo.

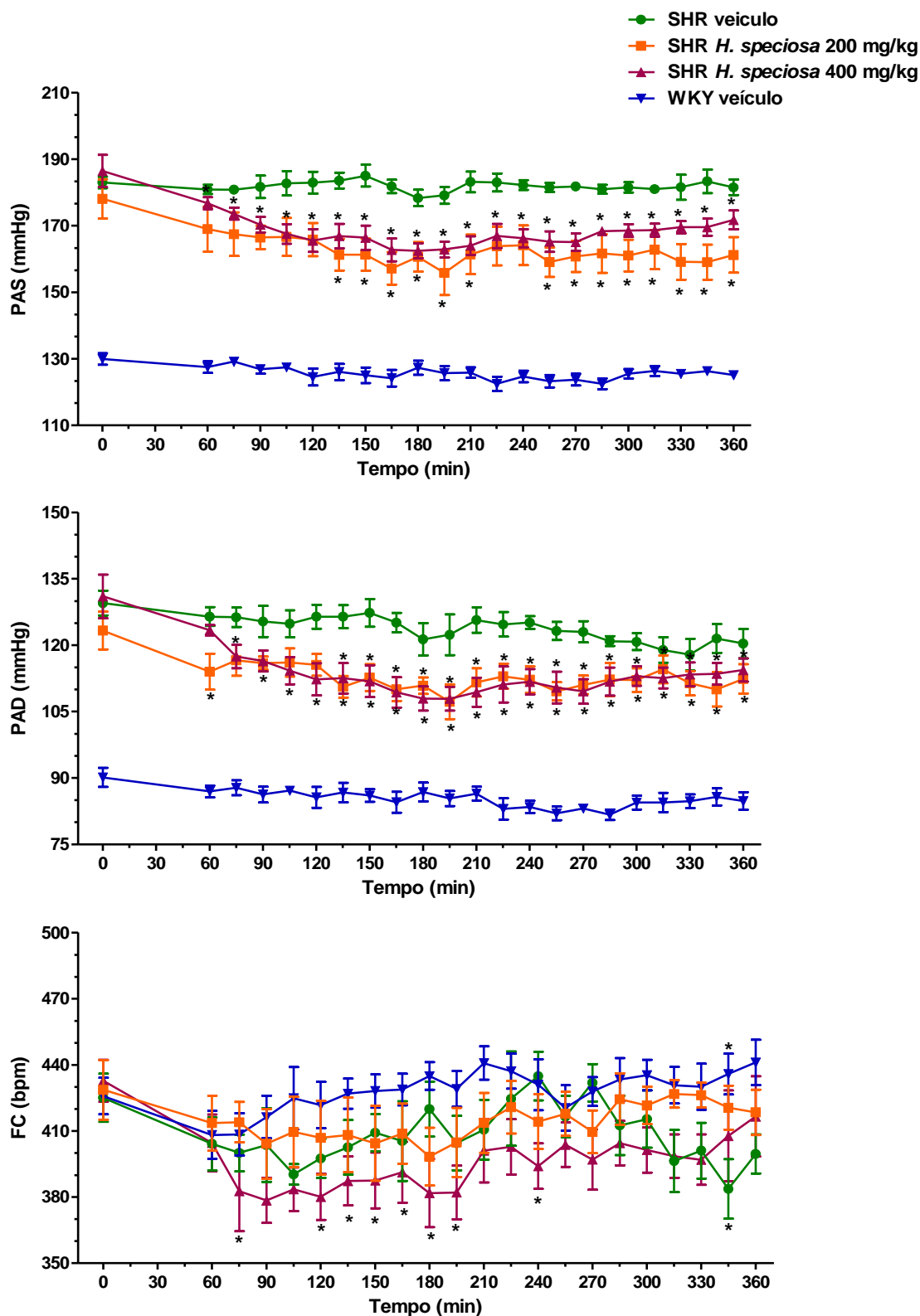


Figura 22 - Valor absoluto da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), diastólica (PAD, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) antes e em 360 minutos após a administração de veículo ou extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (200 ou 400 mg/kg, V.O.) a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou ratos *Wistar Kyoto* (WKY) conscientes. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao tempo 0 ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

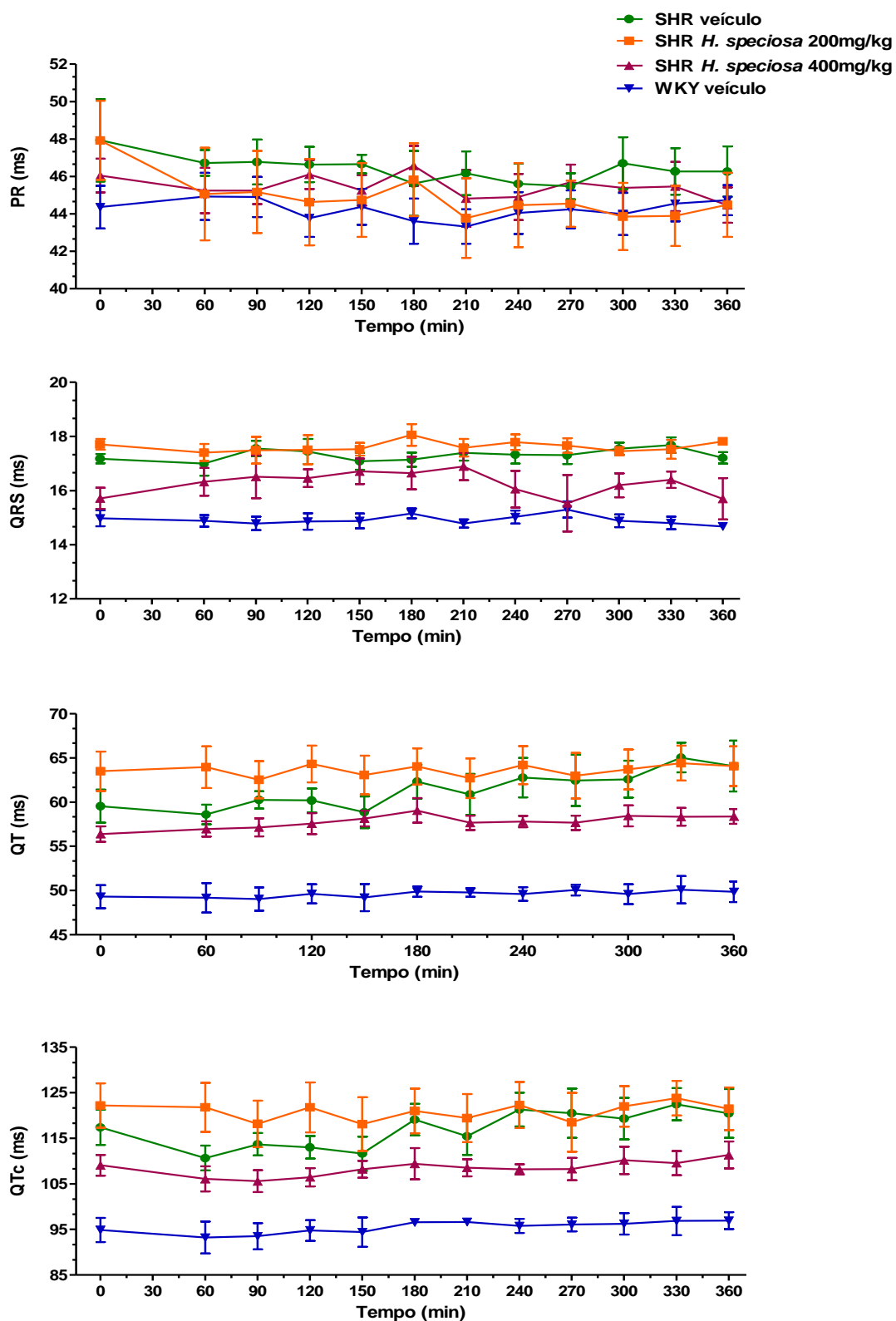


Figura 23 - Valor absoluto dos intervalos PR, QRS e QT do eletrocardiograma (ECG, ms) e QTc antes e em 360 minutos após a administração de veículo ou extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (200 e 400 mg/kg, V.O.) a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou ratos *Wistar Kyoto* (WKY) conscientes. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=5 - 6). * Diferença em relação ao tempo 0. ($P \leq 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

Tabela 8 – Variação percentual da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS, QT e QTc do ECG, antes e por seis horas após a administração de veículo ou extrato da *Hancornia speciosa* (200 e 400 mg/kg) via oral em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou *Wistar Kyoto* (WKY).

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		60 min	120min	180min	240min	300min	360min
PAS (mmHg)	Veículo SHR	-1,1 ± 0,41	0,0 ± 0,99	-2,5 ± 0,96	-0,4 ± 1,25	-0,8 ± 1,03	-0,8 ± 1,36
	Veículo WKY	-1,9 ± 1,29	-4,2 ± 1,56	-2,0 ± 1,27	-2,0 ± 1,27	-2,0 ± 1,27	-3,7 ± 1,09
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	-5,2 ± 1,58*	-6,8 ± 0,76*	-9,7 ± 1,70* [#]	-7,8 ± 1,49*	-9,4 ± 2,04* [#]	-9,4 ± 1,33* [#]
	<i>H. speciosa</i> 400mg/kg	-5,0 ± 2,16	-11,0 ± 2,57* [#]	-12,7 ± 1,97* [#]	-10,5 ± 2,93* [#]	-9,3 ± 3,04* [#]	-7,6 ± 3,12*
PAD (mmHg)	Veículo	-2,3 ± 1,50	-2,3 ± 1,58	-6,1 ± 3,43	-3,2 ± 1,48	-6,6 ± 1,73	-6,9 ± 2,52
	Veículo WKY	-3,4 ± 1,71	-5,0 ± 1,44	-3,6 ± 1,26	-7,3 ± 1,04	-6,2 ± 1,14	-5,9 ± 1,03
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	-7,1 ± 4,47	-6,1 ± 1,96	-9,7 ± 2,83	-8,7 ± 2,51	-8,6 ± 3,90	-8,7 ± 2,27
	<i>H. speciosa</i> 400mg/kg	-5,3 ± 3,09	-13,9 ± 3,50* [#]	-17,3 ± 2,68* [#]	-14,2 ± 3,76*	-13,2 ± 3,73	-12,1 ± 3,79
FC (bpm)	Veículo	-4,9 ± 1,84	-6,4 ± 1,57	-1,1 ± 2,71	2,4 ± 1,88	-2,1 ± 3,42	-5,9 ± 1,44
	Veículo WKY	-4,2 ± 0,76	-1,0 ± 0,69	2,2 ± 1,64	1,2 ± 1,75	2,3 ± 1,62	3,6 ± 1,14
	<i>H. speciosa</i> 200mg/kg	-3,2 ± 3,51	-4,9 ± 3,90	-6,9 ± 2,44* [#]	-3,2 ± 2,24*	-1,2 ± 3,90	-2,3 ± 1,28
	<i>H. speciosa</i> 400mg/kg	-6,5 ± 2,62	-12,2 ± 2,14* [#]	-11,8 ± 3,33* [#]	-8,8 ± 2,97* [#]	-7,2 ± 2,35* [#]	-3,8 ± 3,45* [#]

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 5 - 6).

* Diferença em relação ao grupo veículo SHR, [#] Diferença em relação ao grupo veículo WKY ($P < 0,05$, ANOVA *one-way* seguido de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

6.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hancornia speciosa*

A análise foi realizada no cromatógrafo Waters Alliance 2695, com detector de arranjo de diodos (DAD, 2996) e obteve-se *on-line* os espectros no ultra-violeta (U.V.) dos picos referentes às diferentes substâncias. Para os cromatogramas obtidos no U.V., a intensidade dos picos relaciona-se à concentração e absorvidade molar do composto. Dessa forma, a maior intensidade do pico não indica necessariamente um composto majoritário (PAVIA *et al.*, 2001).

O perfil obtido para o extrato bruto da *H. speciosa* indica o predomínio de substâncias polares, cujo o tempo de retenção dos picos foi de 0 a 20 minutos, semelhante ao descrito por Endringer *et al.* (2007). Tal semelhança se justifica pelo material vegetal ter sido coletado no mesmo local e período do ano, além do preparo do extrato seguir os mesmos procedimentos. Considerando estudos descritos na literatura sobre a *H. speciosa*, pode-se associar o maior pico do perfil cromatográfico (14,5 minutos) ao flavonóide rutina e outros flavonoides existentes em concentrações inferiores. Os picos menores observados nos tempos de 15 a 20 minutos são referentes à triglicosídeos e os picos verificados após 55 minutos são referentes à triterpenos esterificados (ENDRINGER, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007b). O L-(+)-borsenitol, que é um dos princípios ativos do extrato (CASTRO BRAGA *et al.*, 2009), não foi observado no perfil cromatográfico por se tratar de uma substância que não absorve no ultravioleta, devido à ausência de grupos cromóforos.

6.2 PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS DE INDUÇÃO DE RESPOSTA PRESSÓRIA PELA ANGIOTENSINA I E ANGIOTENSINA II

O modelo de indução das alterações pressóricas pela administração de ANG I foi utilizado neste trabalho devido às evidências existentes sobre a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) para o extrato de *H. speciosa*. Serra *et al.* (2005) foram os primeiros a demonstrar essa atividade em ensaio *in vitro*, no qual o extrato apresentou atividade inibitória da ECA $\geq 50\%$ na concentração de 0,33 mg/ml,

avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência, além de atividade vasodilatadora em anéis de aorta contraídos com ANG I (SERRA, 2004). A atividade inibidora da ECA foi demonstrada *in vivo* por Silva *et al.* (2011) em camundongos normotensos tratado com o extrato da *H.speciosa*, por meio do doseamento dos níveis plasmáticos de ECA.

Quando administrada por via intravenosa (I.V.), a ANG I é convertida imediatamente em ANG II (ROBINSON *et al.*, 1999) e, na presença de um inibidor da ECA, a conversão dos peptídeos não é realizada (CHRYSANT, 2010; PERAZELLA, SETARO, 2003; CAT, TOUYZ, 2011), não sendo observada a resposta pressora. Dessa forma, a utilização do protocolo de indução da HA pela ANG I objetivou avaliar a atividade inibitória da ECA *in vivo*, comparativamente ao captopril, um inibidor da ECA tradicionalmente utilizado na terapêutica anti-hipertensiva (WHO, 2003; BRASIL, 2004; (SBC, SBH, SBN, 2010).

A administração I.V. de ANG II é um modelo clássico que induz ao aumento dose-dependente da PA após dose única *in bolus* (SCHEUER, PERRONE, 1993; COWLEY, McCAA, 1976; KANE, 2010). Este modelo foi utilizado para avaliar a atividade do extrato em inibir o aumento da PA independente da inibição da ECA, comparativamente à losartana, um anti-hipertensivo antagonista dos receptores AT₁ para a ANG II utilizado na terapêutica (WHO, 2003; BRASIL, 2004; (SBC, SBH, SBN, 2010).

Apesar da utilização experimental de ANG I e ANG II como modelos de indução de alterações pressóricas para demonstrar a atividade anti-hipertensiva de substâncias ser extensamente descrita (BADYAL *et al.*, 2003; GARDINER *et al.*, 1993, 1999; JUNIOR *et al.*, 2011; KIMURA *et al.*, 2004), este estudo foi o primeiro a caracterizar as alterações no eletrocardiograma (ECG) induzidas por esses peptídeos angiotensinérgicos como modelo de busca de fármacos cardioprotetores.

As doses de ANG I utilizadas para indução da HA foram baseadas em estudos prévios. Gardiner *et al.* (1993), para induzir a hipertensão em ratos, utilizaram a ANG I por via I.V. *in bolus* na dose de 250 pmol/kg, o que ocasionou aumento da PA média em 56 ±2 mmHg. Gasparoto Junior *et al.* (2010), para avaliar a capacidade do extrato de *Tropaeolum majus* L. em inibir a ECA, utilizaram 10 pmol/kg I.V. de ANG I e

verificou o aumento de 50 mmHg na PA média. As respostas das administrações de doses equimolares de ANG I e ANG II são maiores em amplitude e duração para a ANG II, possivelmente pelo fato da ANG I não ser totalmente convertida em ANG II devido ao efeito de primeira passagem nos pulmões reduzir a quantidade do peptídeo vasoativo presente inicialmente (HELLER, MOHRMAN, 1997). Dessa forma, as doses de ANG II foram determinadas como a metade da dose de ANG I, proporção utilizada por Leite e Salgado (1992) em estudo com ratos, cujas doses foram 20 pmol para ANG I e 10 pmol para ANG II, por via I.V. A mesma proporção foi utilizada por Gardiner *et al.* (1999) em ratos, que receberam por via I.V. *in bolus* as doses de 1,25; 12,5 e 125 pmol/kg de ANG I e 2,5; 25 e 250 pmol/kg de ANG II.

Entre as doses avaliadas, foram selecionadas 3 doses de cada vasoconstritor para compor o protocolo de avaliação da atividade cardiovascular do extrato etanólico de *H. speciosa*, sendo 1, 10 e 100 pmol para ANG I; 0,5; 5 e 50 pmol para ANG II. A seleção destas doses foi baseada na resposta pressora significativa em relação à dose anteriormente administrada.

A dose de captopril (50 mg/kg) V.O. foi a mesma utilizada por Ninahuaman *et al.* (2007) em tratamento agudo em ratos e por Cienfuegos-Jovellanos *et al.* (2009) em ratos SHR, em ambos estudos para comparação a produtos naturais com atividade hipotensiva. Neste trabalho o captopril, por si só, reduziu os níveis pressóricos dos ratos, o que provavelmente não seria verificado se utilizado doses inferiores. Este fármaco foi eficaz em impedir o aumento da PA pela ANG I, conforme esperado ao considerar seu mecanismo de ação. A dose de losartana (30 mg/kg), utilizada em estudos para tratamento agudo via oral (OZAKI, ALMEIDA, 2009; BOSHRA *et al.*, 2011) também foi eficaz em impedir o aumento dos níveis pressóricos induzida pela ANG II.

Em relação às alterações induzidas pela ANG I e ANG II no ECG, foi verificado o prolongamento do intervalo QT e QTc, parâmetros que caracterizam taquiarritmias ventriculares polimórficas (*Torsade de Pointes*) e consequente morte súbita (NETZER, 2001; CRUMB, CAVERO, 1999; CAVERO, CRUMB, 2005, 2006). Estudos demonstram a que ANG II exerce ação direta sobre as células cardíacas, induzindo disfunção eletro-mecânica (FISCHER *et al.*, 2007). A ANG II modula a repolarização ventricular por ação direta sobre os canais de íons dos miócitos ventriculares,

possibilitando alteração dos parâmetros de repolarização (DE MELLO, CRESPO, 1999; DOMENIGHETTI *et al*, 2007). Domenighetti *et al.* (2007), utilizando camundongos transgênicos que apresentam superprodução de ANG II cardíaca-específica, observaram o aumento da incidência de arritmias ventriculares e prolongamento do intervalo QT. Estes eventos foram associados ao prolongamento do potencial de ação de repolarização dos cardiomiócitos e diminuição da densidade das correntes dos canais de potássio retificadores (IK1). Paralelamente, há redução na codificação de RNAm das subunidades Kir2.1 e Kir2.2 que compõem o os canais IK1. Outro experimento que demonstra a atividade da ANG II sobre a repolarização ventricular foi realizado por Rivard *et al* (2008) em camundongos transgênicos que superexpressam o receptor humano AT₁ cardíaco. Foi observado o prolongamento da duração do potencial de ação, atraso na repolarização, alteração em várias correntes e canais de K⁺ e conseqüente aumento da incidência de arritmias. Estudo realizado com camundongos jovens, antes de desenvolver hipertrofia celular, indica que as alterações elétricas precedem os distúrbios anatômicos, sugerindo que as alterações arritmogênicas não ocorrem como conseqüência do remodelamento cardíaco, mas estão associadas diretamente a super-estimulação do receptor AT₁ (RIVARD *et al.*, 2008). Além disso, já foi demonstrado que o efeito da ANG II sobre as correntes iônicas pode ser revertido quando a produção ou ação da ANG II for bloqueada com inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores AT₁, respectivamente, ocorrendo efeitos benéficos na prevenção da mortalidade por arritmias (GONZALEZ-JUANATEY *et al.*, 1998; BAILLARD, 2000; DIAS DA SILVA, 2002; SACCO *et al.*, 2009). No entanto, as atividades do captopril e losartana sobre o intervalo QT não foi observado neste estudo devido ao caráter agudo do tratamento, possibilitando verificar apenas a atividade destes fármacos sobre a pressão arterial.

Dessa forma, os protocolos padronizados foram eficazes para induzir as respostas pressóricas, pois foram estabelecidas doses de ANG I e ANG II capazes de induzir aumentos significativos da PA. Além do mais, o captopril e a losartana foram eficazes em impedir ou amenizar o aumento da PA após as administrações de ANG I e ANG II, respectivamente, o que permite comparar à atividade do extrato em avaliação. Este protocolo também é útil para avaliar a atividade cardioprotetora de candidatos a fármacos, uma vez que o intervalo QT pode ser usado para demonstrar

a capacidade de uma substância em restaurar ou preservar as propriedades eletrofisiológicas dos cardiomiócitos (KOMPA, SUMMERS, 2001).

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hancornia speciosa*

6.3.1 Participação do sistema renina-angiotensina na resposta do extrato de *Hancornia speciosa*

Os resultados observados para os ratos que receberam extrato e ANG I demonstram a atividade da *H. speciosa* (200 mg/kg) em impedir os aumentos pressóricos, sugerindo assim a atividade de inibição da ECA, semelhante ao captopril. No entanto, o extrato foi mais eficaz em reduzir o tempo de resposta a ANG I do que o captopril (50 mg/kg). Os resultados condizem com os trabalhos *in vitro* realizados por Serra *et al.* (2005) e Endringer *et al.* (2007), assim como os trabalhos *in vivo* descritos por Silva *et al.* (2011) e Castro Braga *et al.* (2009). A fração ativa do extrato da *H. speciosa* contendo a rutina, L-(+)-bornesitol e o ácido quínico foi identificada como responsável pela atividade inibitória da ECA, conforme descrito por Endringer *et al.* (2007). Vários flavonóides exibem atividade inibitória da ECA *in vitro* (LACAILLE *et al.*, 2001; WU, MUIR, 2008), além de propriedades farmacológicas relevantes, como antioxidante e cardioprotetora (WU, MUIR, 2008). Ferreira *et al.* (2007a) verificou que o extrato da *H. speciosa* induz a vasodilatação em anéis de aorta com o endotélio funcional superior à vasodilatação induzida pela rutina, sugerindo a participação de outro composto na atividade vasodilatadora do extrato. No entanto, os efeitos cardiovasculares do ácido quínico e do borsenitol necessitam ainda de maiores investigações (SILVA *et al.*, 2011).

Estudos com o extrato bruto da *H. speciosa*, como já citado, demonstraram atividade vasodilatadora dependente do endotélio e por um mecanismo dependente da liberação de NO via ativação do PI3K (Ferreira *et al.*, 2007b). Silva *et al.* (2011) verificaram a redução da atividade da ECA e aumento dos níveis plasmáticos de nitrito em camundongos normotensos que receberam fração do extrato da *H. speciosa* contendo a rutina, borsenitol e ácido quínico. Assim, no presente estudo, a atenuação dos valores pressóricos pelo extrato frente à estimulação do SRA se

deve, provavelmente, à atividade inibitória da ECA, à atividade vasodilatadora dependente do NO e à atividade anti-oxidante.

Em relação às alterações eletrocardiográficas, foi verificado que o extrato, na dose de 200 mg/kg, induziu ao aumento do intervalo PR, indicando o aumento do tempo de despolarização atrial. No entanto, não consta na literatura associação entre o prolongamento do intervalo PR induzido por fármacos e condições patológicas. Considerando a associação entre o prolongamento do intervalo QT e a ocorrência de arritmias ventriculares (CRUMB, CAVERO,1999; CAVERO *et al.*, 2000), o extrato apresentou potencial efeito cardioprotetor no que diz respeito à capacidade de impedir o aumento do intervalo QT. Tal observação condiz com a atividade cardioprotetora observada em tratamentos crônicos com inibidores da ECA (GONZALEZ-JUANATEY *et al.*,1998; BAILLARD, 2000; DIAS DA SILVA, 2002; SACCO *et al.*, 2009). Vários mecanismos tem sido propostos para explicar a atividade cardioprotetora dos inibidores da ECA (SACCO *et al.*, 2009): a modulação direta do SRA pela inibição da formação de ANG II, reduzindo a resistência vascular e a pós-carga miocárdica, prevenção da fibrose miocárdica, efeito anti-trófico na proliferação dos miócitos cardíacos (CHRYSANT, 2010; PERAZELLA, SETARO, 2003; CAT, TOUYZ, 2011); e modulação indireta, pela inibição da degradação de bradicinina através da inibição da quininase II e conseqüente aumento da síntese de NO (KITAKASE *et al.*, 2000) e atenuação da sobrecarga de Ca^{2+} (NODE *et al.*, 1998). A atividade cardioprotetora de outros produtos naturais já foi relatada, como para a *Trichosanthes cucumerina*, cujo extrato etanólico, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, apresentou atividade cardioprotetora ao reduzir os intervalos QT e QRS do ECG de ratos pré- tratados com doxorrubicina (SHAH ET AL., 2012).

Os resultados observados também demonstraram a atividade da *H. speciosa* em inibir os aumentos pressóricos induzidos pela ANG II, assim como a losartana. Esses resultados confirmam que o efeito hipotensor do extrato não é somente por meio da inibição da ECA, conforme descrito por Ferreira *et al.* (2007a,b), Silva *et al.* (2011), Castro Braga *et al.*, (2009). Estes estudos demonstraram que o extrato apresenta efeito vasodilatador dependente de óxido nítrico (NO) e liberação do fator hiperpolarizante do endotélio, induz ao aumento dos níveis plasmáticos de nitrito em camundongos e possui atividade anti-oxidante, como já descrito.

Diante do resultado obtido para o extrato, comparativamente a losartana, é possível a existência de atividade antagonista sobre os receptores AT₁. No entanto é necessário a realização de estudos complementares. Foi demonstrado que bloqueio crônico dos receptores AT₁ ocasiona o aumento da secreção de renina, por meio do *feedback* negativo dos receptores AT₁ às células justa-glomerulares de secreção de renina. Dessa forma ocorre o aumento dos níveis de ANG II que, devido ao bloqueio dos receptores AT₁, estimula os receptores AT₂ com conseqüentes efeitos benéficos, via bradicinina, óxido nítrico e a via do GMPc (CAREY, SIRAGY, 2003; ATLAS, 2007), o que pode ser considerado um efeito adicional dos antagonistas do receptor AT₁ em relação aos inibidores da ECA (CAREY, SIRAGY, 2003).

Neste protocolo também foi observado o potencial efeito cardioprotetor do extrato no que diz respeito à capacidade de impedir os aumentos do intervalo QT e QTc (KOMPA, SUMMERS, 2001). Tal observação condiz com a atividade cardioprotetora observada em tratamentos crônicos com inibidores da ECA (GONZALEZ-JUANATEY *et al.*, 1998; BAILLARD, 2000; DIAS DA SILVA, 2002; SACCO *et al.*, 2009) e antagonistas dos receptores AT₁ (BROOKSBY *et al.*, 1999; OIKARINEN *et al.*, 2003; 2004).

6.3.2 Participação do sistema nervoso simpático na resposta do extrato de *Hancornia speciosa*

O modelo de indução de alterações pressóricas pela administração I.V. de NA *in bolus* foi utilizado no presente trabalho por induzir a alterações significativas da PA (ATKINS; NICOLOSI, 1979; MACHO, VATNER, 1982; VIDAL *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2011) e por ser um modelo clássico de indução de arritmias (HASHIMOTO, 2007; SHIMIZU, 2002), como foi demonstrado no presente trabalho o prolongamento do intervalo QT do ECG.

Para a determinação das doses de NA foram considerados os resultados obtidos por Vidal *et al.* (2010) com 1 µg e 3 µg de NA que induziu o aumento da PA em 55 e 76%, respectivamente. Essas doses correspondem a 4,8 nmol e 14,6 nmol e foram utilizadas como referência para as doses de 10; 100 pmol, 1 e 10 nmol utilizadas neste estudo.

A atividade cardiovascular do extrato foi comparada, em associação ou não, a prazosina, um fármaco antagonista dos receptores alfa-adrenérgicos (GRAHAM *et al.*, 1977), utilizado na terapêutica da HA (SBC, SBH, SBN, 2010). A dose de prazosina (0,1 mg/kg) utilizada foi baseada em estudos que realizaram a administração por via I.V. (GRAHAM, PETTINGER, 1979; ORALLO, 2004).

Foi observado que o extrato da *H. speciosa*, em ambas as doses, foi capaz de amenizar as respostas pressóricas induzidas pela NA, assim como a prazosina. Foi observado que a associação (prazosina + extrato) apresentou atividade sinérgica sobre a PA após as administrações de NA. Tal atividade pode ser relacionada com a capacidade do extrato em inibir a ECA, como relatado por Serra *et al.* (2005), Ferreira *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2011), cujos estudos já foram detalhados no presente trabalho, e a existência de interação entre o SRA e o sistema nervoso simpático (ZIMMERMANN, 1978; BRASH *et al.*, 1993, PAUL *et al.*, 2006). A ANG II interage com o sistema nervoso simpático, facilitando a liberação de NA nas fendas pré-sinápticas via ativação do receptor AT₁ e de adrenalina das células cromafins da medula adrenal, aumento do tônus vascular por meio do segundo mensageiro inositoltrifosfato, aumentando assim os efeitos das catecolaminas sobre a musculatura lisa vascular. Conseqüentemente, a inibição dos efeitos da ANG II pode levar a redução da liberação de NA e adrenalina, e conseqüente diminuição do efeito vasoconstritor (ZIMMERMANN, 1978; BRASH *et al.*, 1993; COX, *et al.*, 1999). Segundo Hong *et al.* (2011), a hipertensão aguda induzida pela NA induz a redução na resposta à estimulação simpática devido à diminuição da liberação de NA dos terminais simpáticos, em resposta à ativação dos α_2 -adrenoceptores e conseqüente inibição da liberação de NA. Outro potencial mecanismo é o aumento da produção dos fatores de relaxamento derivado do endotélio, como um mecanismo compensatório para redução da PA e estimulação da produção de NO pelas células endoteliais, sendo estas atividades já relatadas para o extrato da *H. speciosa* (Ferreira *et al.*, 2007 a,b). Dessa forma, pode-se também sugerir a participação da atividade vasodilatadora do extrato da *H. speciosa* dependente de óxido nítrico (NO) na redução da PA neste modelo.

A NA induziu ao aumento na FC para as doses utilizadas, o que não foi observado para o grupo tratado com a prazosina, conforme demonstrado em vários

estudos para o aumento da atividade simpática (BENFEY *et al.*, 1984; KLEIJANS *et al.*, 1984; MACHO, VATNER, 1982; HONG *et al.*, 2011), não sendo alterada pela administração do extrato. No entanto, o grupo que recebeu extrato na dose de 200 mg/kg apresentou taquicardia superior ao grupo que recebeu veículo, inclusive no período controle, anterior a administração da NA, o que não foi observado para os grupos que receberam o extrato nos outros protocolos. Foi realizada a análise estatística comparando todos os animais que receberam veículo ou extrato, em ambas as doses, e não foi observada diferença entre os grupos. Dessa forma, pode-se considerar que a taquicardia não está relacionada necessariamente ao extrato da *H. speciosa*.

O extrato, em ambas as doses, foi capaz de atenuar o prolongamento do intervalo QT induzido pela NA. A arritmogenicidade produzida pela estimulação simpática é devida, em parte, à facilidade de condução e automaticidade, além de heterogenicidade da repolarização ventricular ou refratariedade (KAUFMAN *et al.*, 2000; PALLETA *et al.*, 1989). Dessa forma, o extrato também apresentou potencial efeito cardioprotetor, o que condiz com a atividade cardioprotetora observada em tratamentos crônicos com inibidores da ECA (GONZALEZ-JUANATEY *et al.*, 1998; BAILLARD, 2000; DIAS DA SILVA, 2002; SACCO *et al.*, 2009). A associação do extrato e a prazosina impediu o prolongamento do intervalo QT de forma semelhante ao extrato, e a prazosina reduziu o intervalo QT após a administração de 1 e 10 nmol de NA. A prazosina, um anti-hipertensivo bloqueador α -adrenérgico, não está associada a alterações do intervalo QT, ao contrário dos β -bloqueadores, que são cardioprotetores bem descritos na literatura (BONNAR *et al.*, 1999; EGAN *et al.*, 2005). No entanto, já foi demonstrado que o prazosin reduz a incidência de arritmia ventricular em cães utilizando a metodologia de oclusão da artéria coronária (BENFEY *et al.*, 1984).

O extrato da *H. speciosa*, em ambas as doses e em associação com a prazosina foi capaz de atenuar o prolongamento do intervalo QTc induzido pela NA. É importante considerar que, para substâncias que aumentam a duração do intervalo RR do ECG, como a NA, deve-se utilizar o índice QTc para avaliação das alterações sobre o intervalo QT uma vez que o aumento do intervalo RR potencialmente aumentaria também outras variáveis eletrocardiográficas, como o segmento PR e o

intervalo QT e, dependendo da magnitude destes aumentos, eles poderiam significar, respectivamente, lentificação patológica da condução atrioventricular (bloqueios atrioventriculares dos diferentes graus) ou aumento da duração da repolarização ventricular (CASTRO *et al.*, 2000).

6.3.4 Participação do óxido nítrico na resposta hipotensora do extrato de *Hancornia speciosa*

A indução de resposta pressórica pela inibição da síntese do óxido nítrico através da administração I.V. de L-NAME 60 mg/kg, dose consistente com trabalhos existente na literatura (GARDINER *et al.*, 1990; SARRI-SARAF *et al.*, 2008), foi eficaz para avaliar a atividade hipotensora do extrato, sendo que esta ocorreu por aproximadamente 20 segundos após a administração I.V., de maneira dose-dependente.

A atividade hipotensora do extrato dependente do óxido nítrico já foi demonstrada por Ferreira *et al.* (2007b) e Silva *et al.* (2011). No primeiro estudo, o extrato da *H. speciosa* apresentou atividade vasodilatadora em anéis de aorta mesentérica por um mecanismo dependente da liberação de NO, ativação dos canais de potássio e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Silva *et al.* (2011) observou o aumento dos níveis plasmáticos de nitrito em camundongos normotensos que receberam fração do extrato da *H. speciosa*. No presente trabalho, mesmo com a inibição da síntese do óxido nítrico, o extrato apresentou efeito vasodilatador.

O tratamento crônico com captopril, administrado simultaneamente ao L-NAME, previne a HA (MOURA, LEÃO, 1997), por meio da redução do tônus simpático, associada à regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo (BERNÁTOVÁ *et al.*, 2000). Estudo realizado por Moura e Leão (1997) demonstrou que a administração do captopril, durante o efeito pressor do L-NAME, por via I.V. *in bolus*, reduziu significativamente o aumento da PA, sem abolir completamente a resposta do L-NAME, como ocorre no tratamento crônico com o captopril. Esta diferença é devido a atividade dos inibidores da quininase II presente apenas no tratamento a longo prazo, assim como a redução do efeito da vasopressina e liberação de fator hiperpolarizante derivado do endotélio.

Considerando que neste modelo a vasodilatação dependente do NO é inibida, sugere-se que a atividade hipotensora do extrato da *H. speciosa* ocorre neste modelo devido à capacidade do extrato em inibir a ECA e à atividade anti-oxidante. A resposta rápida do extrato após a administração I.V., sem abolir completamente a resposta do L-NAME condiz com os resultados obtidos por Moura e Leão (1997) já descritos.

6.3.5 Atividade anti-hipertensiva do extrato de *Hancornia speciosa* em ratos espontaneamente hipertensos

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) constituem o modelo de hipertensão experimental que mimetiza a hipertensão essencial humana e tem sido extensivamente utilizados na pesquisa farmacológica e na avaliação da atividade de candidatos a fármacos anti-hipertensivos (BAILLARD *et al.*, 2000; BADYAL *et al.*, 2003; KUNDU, RAO, 2008), motivo pelo qual foi utilizado para avaliar a atividade anti-hipertensiva do extrato da *H. speciosa*. Foi utilizada a dose de 200 mg/kg, para a qual foi observada a atividade do extrato em inibir a pressão arterial no modelos utilizando a ANG I, ANG II e NA, e o dobro desta dose, 400 mg/kg.

Os ratos SHR utilizados, com 12 a 14 semanas de vida, são caracterizados pela HA severa (BADYAL *et al.*, 2003; KUNDU, RAO, 2008; NG *et al.*, 2011), com valores de PA superiores ao grupo controle *Wistar Kyoto* (WKY) (SHIMOMURA *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010), como observado no presente estudo. A administração oral do extrato da *H. speciosa* 400 mg/kg foi capaz de reduzir a PAS em aproximadamente 9,8%, sendo que a resposta máxima observada correspondeu à redução de $186 \pm 4,8$ mmHg para $163 \pm 2,2$ mmHg. A PAD reduziu cerca de 13,5 %, sendo que a resposta máxima correspondeu à redução de $131 \pm 4,9$ mmHg para $109 \pm 3,3$ mmHg. No entanto, os valores pressóricos não foram reduzidos ao nível considerado como normal ou seja, inferiores a 140 e 90 mmHg para PAS e PAD, respectivamente (SBC, SBH, SBN, 2010). Baillard *et al.* (2000) administrou tandolapril 1 mg/kg/dia, um inibidor da ECA, durante 60 dias em ratos SHR. Foi observada a redução da PAS de 26%, o que em valores absolutos correspondeu a redução de 230 mmHg para 170 mmHg. Dessa forma, mesmo sendo um tratamento crônico, não houve a redução da PAS para o nível recomendado, como observado no presente estudo.

Os intervalos QT e QTc dos ratos SHR são aumentados em relação aos WKY, sendo estes parâmetros associados a ocorrência de arritmias (CRUMB, CAVERO, 1999; CAVERO *et al.*, 2000), inclusive em ratos SHR (LU *et al.*, 1999). Desta forma, os ratos SHR são um modelo para o estudo dos efeitos da terapia anti-hipertensiva sobre a repolarização e arritmias (LU *et al.*, 1999; BAILLARD *et al.* 2000). Baillard *et al.* (2000) relatou redução do intervalo QT e da massa do ventrículo esquerdo de ratos SHR submetidos ao tratamento crônico (2 meses) com trandolapril. No presente trabalho, não foi observada a redução do intervalo QT e QTc após a administração do extrato da *H. speciosa*, provavelmente devido ao caráter agudo do tratamento, uma vez que a capacidade do extrato em reduzir o intervalo QT foi demonstrada nos modelos de indução de aumento pressóricos pela ANG I, ANG II e NA.

A patogênese da HA nos ratos SHR é heterogênea e está relacionada alterações vasculares e neurais (LERMAN *et al.*, 2005). Os rins estão relacionados diretamente um a pato-fisiologia SHR (KUNDU, RAO, 2008) uma vez que o transplante renal de um rato SHR para WKY aumenta a pressão do animal receptor, assim como a transferência de um rim do WKY para SHR normaliza os valores pressóricos (KAWABE *et al.*, 1978). Os ratos SHR são considerados um modelo renina-normal (SARIKONDA *et al.*, 2009) uma vez que o aumento na atividade da renina plasmática e das concentrações de renina no plasma desenvolvem como consequência do estado hipertensivo *per se* devido a doença vascular nefrosclerótica (BAGBY *et al.*, 1979). Vários estudos reportam que a atividade do sistema nervoso simpático é aumentada nos ratos SHR em comparação aos WKY (JUDY *et al.*, 1996; LI *et al.*; 1997; NAGASE *et al.*, 1996) e Shimomura *et al.* (2010) confirmou que os níveis plasmáticos de NA estão significativamente aumentados nos ratos SHR, como ocorre na hipertensão essencial humana.

A atividade anti-hipertensiva de produtos naturais em ratos SHR já foi demonstrada em vários estudos (SHIMOMURA *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2011), inclusive com atividade inibidora da ECA (HOE *et al.*, 2007; GASPAROTO *et al.*, 2011) e atividade vasodilatadora endotélio-dependente via abertura de canais de Kir, Kv, K_{ATP} (NG *et al.*, 2011).

Desta forma, considerando os outros estudos realizados com o extrato da *H. speciosa* já citados neste trabalho (CASTRO BRAGA *et al.*, 2009, ENDRINGER *et al.*, FERREIRA *et al.* 2007, 2007SERRA *et al.* 2005, , SILVA *et al.*, 2011), sugere-se que atividade anti-hipertensiva do extrato nos ratos SHR é por meio da inibição da ECA e vasodilatação dependente da liberação de NO, além da atividade antioxidante. Pode-se hipotetizar também, baseando em estudos com inibidores da ECA (GONZALEZ-JUANATEY *et al.*,1998; BAILLARD, 2000; DIAS DA SILVA, 2002) a longo prazo e os resultados obtidos, a atividade cardioprotetora do extrato em tratamento crônico. Considerando ainda a atividade observada para o extrato em inibir os aumentos pressóricos induzidos pela ANG II e NA, pode-se supor a atividade antagonista dos receptores AT₁ de ANG II e até mesmo atividade sobre os receptores adrenérgicos dos ratos SHR, sendo necessária a realização de estudos complementares.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1 O extrato etanólico da *Hancornia speciosa* 200 mg/kg, administrado por via oral, foi capaz de amenizar o aumento da PA nos modelos de indução de resposta pressória pela administração I.V. de diferentes doses de ANG I, ANG II e noradrenalina (NA), com resposta semelhante ao captopril (60 mg/kg, V.O.), losartana (30 mg/kg, V.O.) e prazosina (0,1 mg/kg, I.V.), respectivamente;
- 2 O extrato etanólico da *Hancornia speciosa* (100 e 200 mg/kg, V.O.) apresentou atividade cardioprotetora sobre o intervalo QT do ECG nos modelos de indução de resposta pressória pela administração de ANG I, ANG II e NA;
- 3 O extrato etanólico da *H. speciosa* (30 e 100 mg/kg, I.V.) foi capaz de induzir resposta hipotensora no modelo de indução de aumento pressóricos pela administração L-NAME (60 mg/kg I.V.).
- 4 O extrato etanólico da *H. speciosa* 200 e 400 mg/kg, administrado por via oral, apresentou atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos;
- 5 Os resultados descritos são evidências que sustentam a espécie como promissora para o tratamento das doenças cardiovasculares, necessitando de outros estudos para avaliar a perspectiva da *H. speciosa* como medicamento fitoterápico.

8. REFERÊNCIAS

ANTZELEVITCH, C. Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. **The European Journal of Pacing, Arrhythmias and Cardiac Electrophysiology of the European Heart Rhythm.** 2007; 4: 4–15.

ARAFAT H.A., GONG Q., CHIPITSYNA G., RIZVI A., SAA C.T., YEO C.J. Antihypertensives as Novel Antineoplastics: Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Journal of the American College of Surgeons.** 2007; 204:996-1005.

ATKINS, F.L., NICOLOSI, G.L. Alpha-adrenergic blocking activity of prazosin effect on catecholamine levels and catecholamine synthetic enzymes. **Biochemical Pharmacology.** 1979; 28: 1233-1237.

ATLAS, S.A. The rennin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy.** 2007; 13: 9-20.

BADYAL, D.K., LATA, H., DADHICH, A.P. Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs. **Indian Journal of Pharmacology.**, 2003; 35: 349-362.

BAGBY, S.P., MACDONALD, W.J., MASS, R.D. Serial reining-angiotensin studies in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension. **Hypertension.** 1979; 1: 347-54.

BAILLARD, C., MANSIER, P., ENNEZAT, P.V., MANGIN, L., MEDIGUE, C., SWYNGHEDAUW, B. et al. Converting enzyme inhibition normalizes QT interval in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** 2000; 36: 350–4.

BERNÁTOVÁ, I., PECHÁNOVÁ, O., PELOUCH, V., SIMKO, F. Regression of chronic L-NAME treatment-induced left ventricular hypertrophy: effect of captopril. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** 2000; 32: 177-185.

BENFEY B.G., ELFELLAHL M.S., OGILVIE'R.I., VARMA D.R. Anti-arrhythmic effects of prazosin and propranolol during coronary artery occlusion and re-perfusion in dogs and pigs. **British Journal of Pharmacology.** 1984; 82: 717-725

BOESEN, E.I., ANDERSON, W.P., KETT, M.M., Role of endothelin in noradrenaline induced hypertension in rats, **Journal of Hypertension.**, 23:987–993, 2005.

BONNAR, C.E., DAVIE, A.P., CARUANA, L., FENN, L., OGSTON, S.A., MCMURRAY, J.J.V., STRUTHERS, A.D. QT dispersion in patients with chronic heart failure: β blockers are associated with reduction in QT dispersion. **Heart.** 1999; 81: 297-302.

BOSHRA, V., EL WAKEEL, G.A., NADER, M.A. Effect of celecoxib on the antihypertensive effect of losartan in a rat model of renovascular hypertension. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.** 2011; 89:103-107.

BRASCH, H., SIEROSLAWSKI, L., DOMINIAK, P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. **Hypertension** 1993; 22: 699-704.

BRASIL, Boletim Agropecuário, Cultura da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES), **Ministério da Agricultura**, Lavras, 2006; 67: 1-12.

BRASIL. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, **Avaliação do Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil**. Brasil. Brasília, 2004. 64p.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Saúde Brasil 2010: Uma análise as situação de saúde e evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Brasil. Brasília, 2010.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasil. Brasília, 2005. 42p.

BROOKSBY, P., Effects of losartan and captopril on QT dispersion in elderly patients with heart failure. **The Lancet** ,1999, 354: 395-396.

BUSSE, R., FLEMING, I., Molecular responses of endothelial tissue to kinins **Diabetes**, 1996; 45:S8-S13.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials, **Natural Products Report**. 2008; 25:475–516.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005; 100:131–134.

CAREY, R.M., SIRAGY, H.M. Newly recognized components of renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine Reviews**. 2003; 24: 261-271.

CASTRO BRAGA, FERNÃO. DE FRANÇA CÔRTEZ, STEYNER. CAROLINE DA SILVA, GRAZIELLE. COUTINHO ENDRINGER, DENISE. Extract of *Hacornia speciosa* and Pharmaceutical Composition thereof. BR. n PCT/BR2009/000142, 19 may 2009, 26 november 2009.

CASTRO R.R.T., SERRA S.M., NÓBREGA A.C.L. Reduction of Qtc interval dispersion. Potential mechanism of cardiac protection of pyridostigmine bromide. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2000; 75: 210-213.

CAT, A.N.D., TOUYZ, A. New look at the renin–angiotensin system—Focusing on the vascular system. **Peptides**., 2011; 32: 2141–2150.

CAVERO, I., CRUMB, W. Safety Pharmacology Society: 5th Annual Meeting. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 2006; 5: 181–185.

CAVERO, I., CRUMB, W. The use of electrocardiograms in clinical trials: a public discussion of the proposed ICH E14 regulatory guidance. **Expert Opinion on Drug Safety**. 2005; 4: 795-9.

CAVERO, I., MESTRE, M., GUILLON, J. M., CRUM, W. Drugs that prolong QT interval as an unwanted effect: assessing their likelihood of inducing hazardous cardiac dysrhythmias. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 2000; 5: 947-973.

CHOBANIAN, A.V. *et al.* Seventh Report of the Joint national Committee on prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood pressure. **Hypertension**. 2003; 42:1206 –1252.

CHORRO, F.J., SUCH-BELENGUER, L., LÓPEZ-MERINO, V. Animal Models of Cardiovascular Disease. **Revista Española de Cardiología**. 2009; 62: 69-84.

CHRYSANT, S.G., Current Status of Dual Renin Angiotensin Aldosterone System Blockade for the Treatment of Cardiovascular Diseases. **American Journal of Cardiology**. 2010; 105: 849-852.

CIENFUEGOS-JOVELLANOS E., QUIÑONES, M.D.M., MUGUERZA, B., MOULAY, L., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. Antihypertensive Effect of a Polyphenol-Rich Cocoa Powder Industrially Processed To Preserve the Original Flavonoids of the Cocoa Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2009, 57: 6156-6162.

CLELAND, J. G. F; SWEDBERG, K.; POOLE-WILSON, P. A. Successes and failure of current treatment of heart failure. **The Lancet**, 1998, 352, 19 – 28.

CORR, P.B., YAMADA, K.A., WITKOWSKI, F.X. Mechanisms controlling cardiac automatic function and their relationship to arrhythmogenesis. **The Heart and Cardiovascular System**. 1986; 1343-403.

COWLEY, A.W., McCAA, R.E. Acute and chronic dose-response relationships for angiotensin, aldosterone, and arterial pressure at varying levels of sodium intake. **Circulation Research**. 1976; 39: 788-797.

COX, S.L., TRENDELENBURG, A.U., STARKE, K. Prejunctional angiotensin receptors involved in the facilitation of noradrenaline release in mouse tissues. **British Journal of Pharmacology**. 1999; 127: 1256-1262.

CRUMB, W., CAVERO, I. QT interval prolongation by non cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. 1999; 2: 270-280.

DASGUPTA C., ZHANG L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. **Drug and Discovery Today**. 2011; 16: 22-34.

DE MELLO, W.C., CRESPO, M. J. Correlation between changes in morphology, electrical properties, and angiotensin-converting enzyme activity in the failing heart. **European Journal of Pharmacology**. . 1999; 378: 187–94.

DIAS DA SILVA, V.J., FERREIRA NETO, E., SALGADO, H.C., FAZAN, R. Chronic converting enzyme inhibition normalizes QT interval in aging rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. 2002; 35: 1025–31.

DOGGRELL, S.A., BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**. 1998; 39: 89–105.

DOMENIGHETTI, A., BOIXEL, C., CEFAL, D., ABRIEL, H., PEDRAZZINI, T. Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current down regulation. **The Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 2007; 42: 63–70.

DUARTE, J., PÉREZ-PALENCIA, R., VARGAS, F., OCETE, M.A., PÉREZ-VIZCAINO, F., ZARZUELO, A., TAMARGO, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**. 2001; 133: 117–124.

DZAU V. The cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone blockade. **Journal of Hypertension**. 2005, 23:9 –17.

EGAN, B.M., BASILE, J., CHILTON, R.J., COHEN, J.D. Cardioprotection: the role of β -blocker therapy. **The Journal of Clinical Hypertension**. 2005; 7: 409-416.

ENDRINGER, D.C., PEZZUTO, J.M., BRAGA, F.C. NF-Kb inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**. 2009; 16: 1064-1069.

ENDRINGER, Denise Coutinho. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. 2007. 258 p. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas. Belo Horizonte, 2007.

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

FERREIRA, H.C., SERRA, C.P., ENDRINGER, D.C., LEMOS, V.S., CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**. 2007; 14: 473–478b.

FERREIRA, H.C., SERRA, C.P., LEMOS, V.S., BRAGA, F.C., CORTES, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**. 2007; 109: 161–164a.

FISCHER, R. *et al*, Angiotensin II-induced sudden arrhythmic death and electrical remodeling. **American Journal of Physiology**. 2007; 293: 1242–1253.

FLORAS, S.J. Epinephrine and the Genesis of Hypertension. **Hypertension**. 1992; 19:1-18.

FOGLIO, M.A., QUEIROGA, L.M., SOUSA, I.M.O.S., RODRIGUES, A.F.R. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi Ciência**. 2006; 7.

FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 1980; 288: 373-376.

GARDINER, S. M. *et al.*, Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of N^ω-

nitro-*L*-arginine methyl ester. **British Journal of Pharmacology**. 1990; 101: 632-639 (b).

GARDINER, S.M. COMPTON, A.M., BENNETT, T., PALMER, R.M., MONCADA, S., Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. **Hypertension**. 1990; 15: 486-492.

GARDINER, S.M., COMPTON A.M., KEMP P.A., BENNETT T. Regional and cardiac haemodynamic effects of N^ω-nitro-*L*-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. **British Journal of Pharmacology**. 1990; 101: 625-631 (a).

GARDINER, S.M., KEMP, P. A., BENNETT, T. Differential effects of captopril on regional haemodynamic responses to angiotensin I and bradykinin in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**. 1993; 108: 769-775.

GARG, U.C., HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**. 1989; 83: 1774-1777.

GASPAROTO JUNIOR, A.G., GASPAROTTO, F.M., LOURENÇO, E.L., CRESTANI, S., STEFANELLO, M.E., SALVADOR, M.J., DA SILVA-SANTOS, J.E., MARQUES, M.C., KASSUYA, C.A. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011; 24:363-7.

GONZÁLEZ-BOSC, L.V., KURNJEK, M.L., MÜLLER, A., BASSO, N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the cardiovascular system of the normal rat. **The American Journal of Hypertension**. 2000; 13: 1301-1307.

GONZÁLEZ-JUANATEY, J.R., GARCÍA-ACUÑA, J.M., POSE, A., VARELA, A., CALVO, C., CABEZAS-CERRATO, J., DE LA PEÑA, M.G. Reduction of QT and QTc dispersion during long-term treatment of systemic hypertension with enalapril. **The American Journal of Cardiology**. 1998; 81: 170-174.

GOTTLIEB, O.R., BORIN, M.R.M.B. Biodiversity: modelling angiosperms as networks. **Phytochemistry**. 2000; 55: 559-565.

GRAHAM, R.M., OATES, H.F., STOKER, L.M., STOKES, G.S. Alpha blocking action of the antihypertensive agent, prazosin. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapy**. 1977; 201: 747-752.

GRAHAM, R.M., PETTINGER, W.A. Effects of prazosin and phentolamine on arterial pressure, heart rate and rennin activity: evidence in the conscious rat for the functional significance of the presynaptic α -receptor. **The Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 1979; 1: 497-502.

GRANDI, T.S. TRINDADE, J.A., FERREIRA, L.L., CATELLA, A.C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**. 1989; 3: 185-224.

GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. Biodiversidade, Fitoterápicos e Fitofármacos. p. 13-28. In: SIMÕES C.M.O. *et al.* (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora da UFSC:Florianópolis, 2003. 1102 p.

GUIMARÃES J.I. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. *Arq Bras Cardiol.*, 80, (suplemento II), 2003 **Hypertension**. 1992; 20: 298–303.

HASHIMOTO, K. Arrhythmia models for drug research: classification of antiarrhythmic drugs. **Journal of Pharmacological Sciences**. 2007; 103: 333–46.

HELLER, L.J., MOHRMAN, D.E. Comparison of Blood Pressure Responses to intra-arterial and intra-venous injections of angiotensin I, angiotensin II and bradikinin. **Life Sciences**. 1998; 62: 121-125.

HIRSCHMANN, G.S., ARIAS, A.R.A. Survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Jornal of Ethnopharmacology**. 1990; 29: 159–172.

HOE, S.Z., KAMARUDDIN, M.Y., LAM, S.K. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by a partially purified fraction of *Gynura procumbens* in spontaneously hypertensive rats. **Medical Principles and Practice**. 2007; 16: 203-8.

HONG, E., LARIOS, F., GÓMEZ-VIGUEZ N.L., HUANG F., BRAVO, G. Role of alpha adrenoceptors and nitric oxide on cardiovascular responses in acute and chronic hypertension. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 2011; 67: 427-435.

IANZER, D., KONNO, K., MARQUES-PORTO, R., VIEIRA PORTARO, F.C., STÖCKLIN R., MARTINS DE CAMARGO, A.C., PIMENTA, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**. 2004; 25: 1085-1092.

JIA, H., LIU, W.J., UFUR, H., HE, G.S., LIGIAN, H., CHEN, P. The antihypertensive effect of ethyl acetate extract from red raspberry fruit in hypertensive rats. **Pharmacognosy Magazine**. 2011, 7: 19-24.

JUDY, W.V., WATANABE, A.M., HENRY, D.P., BESCH JR, H.R., MURPHY, W.R., HOCKEL, G.M. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation Research**. 1976; 38: 21-29.

KANE, M.O., ETIENNE-SELLOUM, N., MADEIRA, S.V., SARR, M., WALTER, A., DAL-ROS, S., SCHOTT, C., CHATAIGNEAU, T., SCHINI-KERTH, V.B. Endothelium-derived contracting factors mediate the AngII-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. **European Journal of Physiology**. 2010; 459: 671-679.

KAUFMAN, E.S., MACKALL, J.A., JULKA, B., DRABEK, C., ROSENBAUM, D.S., VERRIER, R.L., et al. Influence of heart rate and sympathetic stimulation on arrhythmogenic T wave alternans Influence of heart rate and sympathetic stimulation on arrhythmogenic T wave alternans. **Journal of Applied Physiology**. 2000; 279: 1248-1255.

KAWABE, K., WATANABE, T. X., SHIONO, K., SOKABE, H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneous hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrid. **Japanese Heart Journal**. 1978; 19: 886-894.

KIMURA, S., ZHANG, G. X., ABE, Y. Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: oxidative stress of angiotensin II-induced hypertension: mitogen-activated protein kinases and blood pressure regulation. **Journal of Pharmacological Sciences**. 2004; 96: 406-410.

KITAKAZE, M., NODE, K., TAKASHIMA, S., MINAMINO, T., KUZUYA, Y., HORI, M. Cellular mechanisms of cardioprotection afforded by inhibitors of angiotensin converting enzyme in ischemic heart: role of bradykinin and nitric oxide. **Hypertension**. 2000; 23: 253-259.

KLEINJANS, J.C., SMITS, J.F., VAN ESSEN, H., KASBERGEN, C.M., STRUYKER BOUDIER, H.A. Hemodynamic characterization of hypertension induced by chronic intrarenal or intravenous infusion of norepinephrine in conscious rats. **Hypertension**. 1984; 6: 689-699.

KOMPA, A.R., SUMMERS, R.J. Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 2001; 43: 199-203.

KÜBLER, W., HAASS, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. **Heart**. 1996; 75: 330-333.

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

LACAILLE-DUBOIS, M.A., FRANCK, U., WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**. 2001; 8: 47-52.

LAWES, C. M. M. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **The Lancet**. 2008; 371: 1513-1518

LEE, J., KIM, S., OH, Y., RYU, S.Y., KIM, S.W. Upregulation of vascular renin-angiotensin and endothelin systems in rats inhibited of nitric oxide synthesis. **Pharmacological Research**. 2002; 46: 383-87.

LEITE, R., SALGADO, M.C. Increased Vascular Formation of Angiotensin II in One-Kidney, One Clip Hypertension. **Hypertension**. 1992; 19: 6.

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

LI, S.G., LAWIER, J.E., RANDALL, D.C., BROWN, D.R. Sympathetic nervous activity and arterial pressure responses during rest and acute behavioral stress in SHR and WKY rats. **Journal of Autonomic Nervous System**. 1997; 62: 147-154.

LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T. *Screening* farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. 1996; 89.

LOPEZ, R.M., PÉREZ, T., CASTILLO, C., CASTILLO, M.C., CASTILLO, E.F. Acute intravenous injection and short-term oral administration of N^w-nitro-L-arginine methyl ester to the rat provoke increased pressor response to agonists and hypertension, but not inhibition of acetylcholine-induced hypertensive responses. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. 2011; 25: 333-342.

LOTZ, C., LIEM, D., PING, P. New frontiers in myocardial protection: a systems biology approach. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. 2011; 16: 285–289.

LU, H.R., YU, F., DAI, D.Z., REMEYSEN, P., DE CLERCK, F. Reduction in QT dispersion and ventricular arrhythmias by ischaemic preconditioning in anaesthetized, normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. 1999; 13: 445-454.

LUNA, J.S., DOS SANTOS, A.F., DE LIMA, M.R., DE OMENA, M.C., DE MENDONÇA, F.A., BIEBER, L.W., SANT'ANA, A.E. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005; 97: 199-206.

LUO, L.F., WU, W.H., ZHOU, Y.J., YAN, J., YANG, G.P., OUYANG, D.S. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 2010; 129: 238-43.

LÜSCHER, T.F., BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clinical Cardiology**. 1997; 20: 3-10.

MACHO, P., VATNER, S. F. Effects of prazosin on coronary and left ventricular dynamics in conscious dogs. **Circulation**. 1982; 65: 1186-1192. .

MAGHRANI, M., ZEGGWAGH, N. A., MICHEL, J. B., EDDOUKS, M. Antihypertensive effect of *Lepidium sativum* L. in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005; 100: 193-197.

MANGANELLI, R. E. U.; CHERICONI, S.; BARAGATTI, B. Ethonopharmacobotany in Tuscany: plants used as antihypertensives. **Fitoterapia**, v. 71, p. 595 - 510, 2000.

MOMBOULI, J. V., VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from pathophysiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 1999; 31: 61-74.

MORAES, T. M., RODRIGUES, C. M., KUSHIMA, H., BAUAB, M., VILLEGAS, W., PELLIZZON, C. H., BRITO, R. M. S., HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-Helicobacter pylori actions. **Journal of Ethnopharmacology**. 2008; 120: 161–168.

MOURA, R. S., LEÃO, M. C. Participation of kinins in the inhibitory action on captopril on acute hypertension induced by L-NAME in anesthetized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1997, 30: 1219-1223.

MOZOS, I., CRISTESCU, C. Angiotensin converting enzyme inhibitors effect on QT dispersion in chronic myocardial infarction patients. **Timisoara Medical Journal**. 2005; 14: 55.

MYLES, D. C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Current Opinion in Biotechnology**. 2003; 14: 627-633.

NAGASE, M., SHIMOSAWA, T., ANDO, K., FUJITA, T. Local renin-angiotensin system in sympathetic overactivity of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension Research**. 1996, 19:171- 177.

NAVARRO, J., SANCHEZ, A., SAIZ, J., RUILOPE, L.M., GARCIA-ESTAN, J., ROMERO, J.C., MONCADA, S., LAHERA, V. Hormonal, renal and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. **American Journal of Physiology**. 1994; 267: 1516-1521.

NETZER, R., EBNETH, A., BISCHOFF, U., PONGS, O., Screening lead compounds for QT interval prolongation. **Drug Discovery Today**. 2001; 6: 78-84.

NEWMAN, D. J. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. 2007, 70: 461-477.

NG, C. F., KOON, C. M., CHEUNG, D. W. S., LAM, M. Y., LEUNG, P. C., LAU, C. B. S., FUNG, K. P. The anti-hypertensive effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Gegen (*Pueraria lobata*) formula in rats and its underlying mechanisms of vasorelaxation. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011; 137: 1366-1372.

NGUELEFACK, T. B., MEKHFI, H., DONGMO, A.B., DIMO, T., WATCHO, P., ZOHEIR, J., LEGSSYER, A., KAMANYI, A., ZIYYAT, A. Hypertensive effects of oral administration of the aqueous extract of *Solanum torvum* fruits in L-NAME treated rats: Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. **Journal of Ethnopharmacology**. 2009; 124: 592–599.

NINAHUAMAN, M.F.M.L. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine** 2007; 14: 321–327.

NODE, K., KITAKAZE, M., KOSAKA, H., MINAMINO, T., MORI, H., HORI, M. Role of Ca^{+2} – activated K^{+} channels in the protective effect of ACE inhibition against ischemic myocardial injury. **Hypertension**. 1998; 31: 1290-1298.

OH, H., KANG, D. G., KWON, T. O.; JANG, K. K.; CHAI, K. Y.; YUN, Y. G.; CHUNG, H. T.; LEE, H. S. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. **Phytotherapy Research**. 2003; 17: 811-813.

OIKARINEN L., NIEMINEN M. S., TOIVONEN L. Relation of QT interval and QT dispersion to regression of echocardiographic and electrocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertensive patients: The Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) study. **The American Heart Journal**, 2003 (02).

OIKARINEN L., NIEMINEN, M.S., VIITASALO, M., TOIVONEN, L., JERN, S., DAHLÖF, B., DEVEREUX, R.B., OKIN, P.M. QRS duration and QT interval predict mortality in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. **Hypertension**. 2004, 43:1029–1034.

OLIVEIRA, L. M. Q., VALIO, I. F. M. Effects of moisture content on germination of seeds of *Hnacornia speciosa* Gom. (Apocynaceae) **Annals of Botany**. 1992; 69: 1-5.

OPARIL, S., SILFANI, T. N., WALKER, J. F. Role of Angiotensin Receptor Blockers as Monotherapy in Reaching Blood Pressure Goals. **American Journal of Hypertension**. 2005; 18: 287–294.

ORALLO, F. Acute cardiovascular effects of (+)-nantenine, an alkaloid isolated from *Platycapnos spicata*, in anaesthetised normotensive rats. **Planta Medica**. 2004 ; 70: 117-26.

OZAKI, M. R., ALMEIDA, E. A. Ação do lisinopril e do losartan na função endotelial após infarto agudo do miocárdio. Estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Clinica Medica**. 2009; 7: 100-103.

PALETTA, M.J., ABRAHAM, S., BEATCH, G, N., WALKER, M. J. Mechanisms underlying the antiarrhythmic properties of beta-adrenoceptor blockade against ischaemia-induced arrhythmias in acutely prepared rats. **British Journal of Pharmacology**. 1989; 98: 87–94.

PARENTE, T. V., BORGIO, L. A., MACHADO, J. W. B. Características físico-químicas de frutos de mangaba (*Hnacornia speciosa* Gomes.) do cerrado da região geoeconômica do Distrito Federal. **Ciencia e Cultura**. 1985; 37: 95-98.

PAUL, M., MEHR, A. P., KREUTZ, R. Physiology of local rennin-angiotensin system. **Physiological Reviews**. 2006; 747-803.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 3. ed. USA: Thomson Learning. 2001. 579 p.

PERAZELLA, M. A., SETARO, J. F. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. **Journal of Nuclear Cardiology**. 2003; 10: 184-196.

PERSSON, K., WHISS, P.A., NYHLÉN, K., JACOBSSON-STRIER, M., GLINDELL, M., ANDERSSON, R.G. Nitric oxide donors and angiotensin-converting enzyme inhibitors act in concert to inhibit human angiotensin-converting enzyme activity and platelet aggregation *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**. 2000; 406: 15-23.

POLITI, A., ZERVOU, M.V., TRIANTAFYLLIDI H., ZOUMPOULAKIS, P.G., MAVROMOUSTAKOS, T.M., ZOGA, A.A., MOUTEVELIS-MINAKAKIS, P., KOKOTOS, G., ILIODROMITIS, E.K., KREMASTINOS, D.T. Hypertension study in anaesthetized rabbits: protocol proposal for AT₁ antagonists screening. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**. 2010, 11: 103-110.

POLLOCK, D. M., POLAKOWSKI, J.S., DIVISH, B.J., OPGENORTH, T.J. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**. 1993, 21:660-666

PORTER, T. M., ECKBERG, D. L., FRITSCH, J.M., REA, R.F., BEIGHTOL, L.A., SCHMEDTJE J.F.JR., MOHANTY, P.K. Autonomic pathophysiology in heart failure patients: sympathetic-cholinergic interrelations. **The Journal of Clinical Investigation**. 1990; 85: 1362-1371.

RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. J., MONCADA, S. An *L*-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.1990; 87: 5193-5197.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 2001, 39: 603-613.

RECKELHOFF, J. F., ROMERO, J. C. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. **American Journal of Physiology**. 2003, 284: 893–912,

REES, D. D., PALMER, R. M., MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.1989; 86: 3375-3378.

RIBEIRO, M.O., ANTNES, E., NUCCI, G., LOVISOLO, S.M., ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. **Hypertension**. 1992; 20: 298-303.

RIVARD, K., PARADIS, P., NEMER, M., FISET, C. Cardiac-specific over expression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. **Cardiovascular Research**.. 2008; 78: 53–62.

ROBINSON, M.M., MCLENNAN, G.P., THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Interactions of the systemic and brain renin–angiotensin systems in the control of drinking and the central mediation of pressor responses. **Brain Research**. 1999; 842: 55-61.

RODRIGUES, V. E. G., CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**. 2001; 25: 102-123.

ROGER V.L. *et al*. Heart disease and stroke statistics 2011 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**. 2010; 123: e18–e209.

SACCO, G., BIGIONI, M., LOPEZ, G., EVANGELISTA, E., MANZINI, S., MAGGI, C. A. ACE inhibition and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity rat. **Vascular Pharmacology**. 2009; 50: 166-170.

SAMUELSSON, G. G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy. **Swedish Pharmaceutical Press**. 2004.

SANTOS, R. A., CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J., ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory Peptides**. 2000; 91: 45-62.

SARIKONDA, K.V., WATSON, R.E., OPARA, O.C., DIPETTE, D.J. Experimental animal models of hypertension. **Journal of American Society of Hypertension**. 2009; 3: 158-165.

SARRI-SARAF, F., POMPOSIELLO, S., LAURENT, D. Acute impairment of rat renal function by L-NAME as measured using dynamic MRI. **Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine**. 2008; 21: 291-297.

SCHEUER, D. A., PERRONE, M. H. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. **The American Journal of Physiology**. 1993; 264: 917-923.

SERRA, C.P., CÔRTEZ, S.F., LOMBARDI, J.A., BRAGA DE OLIVEIRA, A., BRAGA, F.C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**. 2005; 12: 424-432.

SERRA, Carla Penido. Estudo de espécies vegetais com potencial atividade anti-hipertensiva: desenvolvimento e validação de ensaio in vitro de inibição da enzima conversora de angiotensina e avaliação da atividade vasodilatadora. 2004. 123p. Tese de doutorado em ciências farmacêuticas. Belo Horizonte, 2004.

SHAH S.L., MALI V.R., ZAMBARE G.N., BODHANKAR S.L. Cardioprotective Activity of Methanol Extract of fruit of *Trichosanthes cucumerina* on Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Wistar Rats. **Toxicology International**. 2012; 19, 167–172.

SHIMIZU, W. Effects of sympathetic stimulation on various repolarization indices in the congenital long QT syndrome. **Annals of noninvasive electrocardiology: the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc.** 2002; 7: 332–42.

SHIMOMURA, M., USHIKOSHI, H., HATTORI, A., MURATA, I., OHNO, Y., AOYAMA, T., KAWASAKI, M., NISHIGAKI, K., TAKEMURA, G., FUJIWARA, T., FUJIWARA, H., MINATOBUCHI, S. Treatment with *Lindera strychnifolia* reduces blood pressure by decreasing sympathetic nerve activity in spontaneous hypertension rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. 2010; 38: 561-568.

SHUSTERMAN, V., AYSIN, B., GOTTIPATY, V., WEISS, R., BRODE, S., SCHWARSTZMAN, D., ANDERSON, K. P. Autonomic nervous system activity and the spontaneous initiation of ventricular tachycardia. **Journal of the American College of Cardiology**. 1998; 32: 1891-9.

SILVA, C. G., BRAGA, F.C., LIMA, M.P., PESQUERO, J.L., LEMOS, V.S., CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011.

SLISH, D. S.; UEDA, H.; ARVIGO, R.; BALICK, M. J. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**. 1999; 66: 159 – 165.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 2010; 95: 1-51.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH), A Campanha: Sociedade Brasileira de Hipertensão faz campanha de combate à doença que atinge 30% dos brasileiros, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/medica/acampanha-002.asp>>. Acesso em 27 maio 2010.

STEIN, C. M., NELSON, R., HE, H.B., WOOD, M., WOOD, A.J. Norepinephrine Release in the Human Forearm. **Hypertension**. 1997; 30: 1078-1084.

VANHOUTTE P. M., BOULANGER, C.M. Endothelium responses in hypertension. **Hypertension Research**., 1995, 18: 87-98.

VERARDO, S. M. S. Levantamento preliminar de plantas medicinais em Juiz de Fora e São João Nepomuceno (MG). **Oréades**. 1982; 8: 93-115.

VIDAL, A. T., GUIMARÃES, H.N., DE PAULA, D.C., FREZARD, F., SILVA-BARCELLOS, N.M., GRABE-GUIMARÃES, A. Prolonged cardioprotective effect of pyridostigmine encapsulated in liposomes. **Life Sciences**. 2010; 86: 17-23.

WHO. World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy 2002 - 2005**. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.

WHO. World Health Organization/ International Society of Hypertension risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. **Journal of Hypertension**. 2007, 8: 1578 – 1582.

WHO. World Health Organization/International Society of Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. **Journal of Hypertension**. 2003; 21: 1983 – 1992.

WU, J.; MUIR, A. D. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soy bean Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2008; 56: 9899–9904.

ZAPPELLINI, A. MORENO JÚNIOR, H., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 1997; 29: 45-48.

ZIMMERMANN, B. G. Actions of angiotensin on adrenergic nerve endings. **Federation Proceedings**. 1978; 37: 199–202.