

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Liane Santariano Sant'Anna

Efeitos do extrato da *Campomanesia xanthocarpa* sobre parâmetros cardiovasculares em ratos tratados com frutose.

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Uruguaiana
Setembro de 2012.

LIANE SANTARIANO SANT'ANNA

EFEITOS DO EXTRATO DA *Campomanesia xanthocarpa* SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES EM RATOS TRATADOS COM FRUTOSE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: prof^ª Dra. Cleci Menezes Moreira

Uruguaiiana
Setembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem me mostrado desde muito cedo o que realmente tem valor na vida, e que sonhos são para serem conquistados. Agradeço pelas oportunidades e pelo incentivo constante.

À Alexandre, o amor da minha vida, obrigada pela compreensão à minha falta de tempo e atenção, pela força e calma que me deu em cada momento difícil, por estar presente sempre, mesmo quando enfraqueci.

À minha orientadora, Cleci, pela qual, antes de mais nada, tenho amizade e admiração, agradeço pela oportunidade de crescimento, pelos conhecimentos, apoio, coragem, generosidade, compreensão e exemplo, e principalmente por acreditar em mim.

À minha amiga, Karina, com a qual sempre posso contar obrigada pelo companheirismo, por estar sempre disponível e pelas palavras de incentivo.

Ao colega e amigo Antônio, pelo auxílio com as lâminas histológicas.

À minha pequena Karol, obrigada pela troca de conhecimentos, pela companhia, amizade e ajuda incondicional, mas principalmente pela alegria que sempre me fez seguir adiante.

À professora Giulia, pela paciência e dinâmica para resolver todos os problemas, pelo conhecimento e apoio.

Ao professor Dalton, é um prazer inexplicável conhecê-lo, agradeço pelas palavras, pelo conhecimento compartilhado, com certeza é um exemplo de vida a ser seguido.

À todos amigos do GPFisCar, pelos muitos momentos de trabalho e descontração, é muito bom trabalhar com vocês.

A todos os amigos que de alguma maneira compartilharam comigo meus ideias, dificuldades e alegrias, minha gratidão e respeito. Obrigada!

“Tudo o que somos nasce com nossos pensamentos.

Em nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo.”

(Buda)

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam a primeira causa de morte no Brasil, sendo estas, atualmente, bastante associadas a distúrbios metabólicos. A Síndrome Metabólica é o exemplo mais comum destes distúrbios, sendo caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/diabetes do tipo 2, obesidade central e dislipidemia. No sul do Brasil, a *Campomanesia xanthocarpa*, conhecida como guabiroba, tem sido empiricamente usada por seu efeito potencial em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, sendo confirmado em estudo com pacientes hipercolesterolêmicos. Os relatos populares acerca do uso tradicional do chá de suas folhas revelam sua utilização para diversas doenças, incluindo inflamatórias, renais, digestórias, entre outras. Embora a confiança nesses medicamentos seja benéfica para algumas pessoas, a informação fidedigna é fundamental, a toxicidade de medicamentos preparados com plantas pode parecer trivial, quando comparada com os tratamentos convencionais, entretanto é um problema sério de saúde pública. Diante de tantos potenciais e necessidades de estudos, este trabalho avaliou os efeitos da *C. xanthocarpa* sobre parâmetros hemodinâmicos e de contratilidade cardíaca em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em frutose e sua toxicidade aguda. Utilizou-se extrato aquoso das folhas de *C. xanthocarpa* preparado por infusão. Para avaliação da toxicidade desta planta foram realizados dois procedimentos simultâneos, a determinação da dose letal 50% e o “*Screening Hipocrático*”. Para avaliação das funções hepáticas e renais, foram feitas determinações de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, uréia e creatinina. Também foram coletados rim e fígado para análise histológica. Os animais foram tratados por 30 dias, a pressão arterial foi avaliada por medida direta da carótida e a contratilidade através dos músculos papilares do ventrículo esquerdo, foram ainda determinados parâmetros bioquímicos para avaliação dos perfis lipídico e glicídico através de kits comerciais. Não houve mortalidade dos animais durante a observação de 48h para cálculo de DL50, impossibilitando determiná-la, e nenhuma mudança no comportamento dos animais, em todos os parâmetros, foi observada. O extrato foi capaz de reverter à hipertensão e taquicardia causada pela frutose e causar inotropismo positivo, também diminuiu os níveis de triglicérides e aumentou o colesterol-HDL, sem causar qualquer toxicidade renal ou hepática, podendo ser, portanto, ingerido com segurança até a dose de 5g/dia e tornando-se uma possível alternativa natural para indivíduos com síndrome metabólica.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Brazil, which are nowadays strongly associated with metabolic disorders. Metabolic syndrome is the most common of these disorders, it is characterized by the grouping of cardiovascular risk factors such as hypertension, insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance/type 2 diabetes, central obesity and dyslipidemia. In southern Brazil, the *Campomanesia xanthocarpa*, known as guabiroba, has been used empirically by its potential effect in reducing blood cholesterol levels, which was confirmed by Klafke *et al.*, (2010) studying hypercholesterolemic patients. The popular accounts about the traditional use of leaves tea reveal their use for various diseases, including inflammatory, renal, digestive, among others. Although the trust in these medicine is benefit for some people, the reliable information is essential, the toxicity of medicines prepared from plants may seem trivial when compared with conventional treatments, however, is a serious public health. Faced with so many needs and potential studies, this study evaluated the effects of *C. xanthocarpa* on hemodynamics and cardiac contractility in rats with metabolic syndrome induced by fructose-rich diet and its acute toxicity. We used aqueous extract of the leaves of *C. xanthocarpa* prepared by infusion. To evaluate the toxicity of these plant two simultaneous procedures were performed determination of lethal dose 50% and "*Hippocratic Screening*". For evaluation of hepatic and kidney functions, determination aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea and creatinine were made. Also kidney and liver were collected for histological analysis. The animals were treated for 30 days, blood pressure was assessed by direct measurement of carotid and contractility through isometric force of papillary muscles of the left ventricle, biochemical parameters were also determined to evaluate lipid and glucose profiles using commercial kits. There was no mortality of animals during the observation of 48 h for calculation of LD50, making impossible to determine it, and no change in the behavior of animals were registered in all parameters evaluated. The extract was able to reverse the hypertension and tachycardia caused by fructose and to cause positive inotropism. It also decreased the levels of triglycerides and increased HDL-cholesterol, without causing any renal or hepatic toxicity. So the extract can be ingested safely until the dose of 5g/day and may be a natural alternative for individuals with metabolic syndrome.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1. <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	9
1.2. <i>Toxicidade</i>	10
1.3. <i>Síndrome Metabólica</i>	12
1.4. <i>Hipertensão</i>	15
1.5. <i>Contratilidade Miocárdica</i>	18
2. Objetivos	22
2.1. <i>Objetivo geral</i>	22
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	22
3. Artigo I: <i>Ingestion of aqueous extract of <u>Campomanesia xanthocarpa</u> does not produce acute toxicity in rats.</i>	23
4. Artigo II: <i><u>Campomanesia xanthocarpa</u> reverses hypertension and improves contractility in rats with metabolic syndrome.</i>	37
5. Discussão	57
6. Conclusão	67
7. Referências	68

INTRODUÇÃO

1.1. *Campomanesia xanthocarpa*

O Brasil apresenta flora rica e diversificada em espécies, muitas delas com potencial tecnológico. *Campomanesia xanthocarpa* é uma planta medicinal e alimentícia popularmente conhecida e amplamente utilizada, pertence à família *Myrtaceae*, sendo nativa do Brasil e encontrada em quase todas as formações florestais, desde o estado de Minas Gerais até o extremo sul do Rio Grande do Sul. Esta árvore pode atingir 15 metros de altura, apresenta folhagem verde escura, floresce entre setembro e outubro e frutifica entre novembro e dezembro, suas flores são esbranquiçadas e os frutos apresentam-se em bagas arredondadas de coloração verde a amarela, quando maduros. Entre os nomes comuns da espécie destacam-se: guabiroba, guavirova, guabirobeira-do-mato e guabira (Lorenzi, 1992).

O fruto apresenta polpa abundante e succulenta, sendo apreciado regionalmente. É aproveitado na produção de refrescos, sorvetes e licores além da produção de doces caseiros, o que indica a presença de substâncias pécnicas em teores significativos. As pectinas são utilizadas nas indústrias alimentícia e farmacêutica, devido às suas propriedades geleificantes e estabilizantes. Os frutos de guabiroba apresentam propriedades nutricionais devido ao seu alto teor de vitamina C, sais minerais e compostos fenólicos, o que permite considerá-la alimento funcional (Santos *et al.*, 2009).

Os relatos populares acerca do uso tradicional do chá das folhas de guabiroba revelam a utilização da infusão das folhas de guabirobeira para diversas doenças, incluindo inflamatórias, renais, digestórias, entre outras (Alice *et al.*, 1995). No sul do Brasil, a *C. xanthocarpa* tem sido empiricamente usada por seu efeito potencial em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, sendo confirmado por Klafke *et al.*, (2010) em estudo com pacientes hipercolesterolêmicos.

Biavatti *et al.* (2004) avaliaram as propriedades farmacológicas da planta e verificaram que o extrato aquoso das folhas induziu significativa redução no ganho de peso em ratos submetidos à dieta hipercalórica, além de reduzir a glicemia. Markman *et al.* (2004) verificaram que o extrato hidroalcoólico das folhas foi efetivo na prevenção de úlcera gástrica em ratos. Estudos demonstraram ainda o uso da guabiroba no combate a certas condições associadas à obesidade, tais como hiperlipidemia, diabetes e sobrepeso (Dickel *et al.*, 2007; Vinagre *et al.*, 2010). Klafke *et al.* (2012) analisaram as propriedades antiplaquetárias, antitrombóticas e fibrinolíticas do extrato de guabiroba *in vivo* em camundongos e *in vitro* em sangue humano, confirmando essas atividades. Análise fitoquímica do extrato das folhas de

C. xanthocarpa indicou presença de flavonoides, saponinas, taninos e terpenos, os quais poderiam justificar estas propriedades (Markman *et al.*, 2004; Klafke *et al.*, 2010).

1.2. Toxicidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que, atualmente, a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial. (Pinto *et al.*, 2002). O aumento do consumo de fitoterápicos e chás naturais pode ser associado ao fato de que as populações estão questionando os perigos do uso abusivo e irracional de produtos farmacêuticos e procuram substituí-los por plantas medicinais. A comprovação da ação terapêutica também favorece essa dinâmica. Além disso, registra-se a insatisfação da população perante o sistema de saúde oficial e também a necessidade de poder controlar seu próprio corpo e recuperar sua saúde, assumindo essas práticas para si ou para sua família (Tomazzoni *et al.*, 2006).

Segundo Balbino e Dias (2010) as plantas medicinais e seus derivados são, comumente, a primeira opção de tratamento, geralmente feito sem acompanhamento de profissional de saúde. A toxicidade de medicamentos preparados com plantas pode parecer trivial, quando comparada com os tratamentos convencionais, entretanto é um problema sério de saúde pública. Plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, características genéticas, entre outras). Erros de diagnóstico, identificação incorreta de espécies de plantas e uso diferente da forma tradicional podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e reações adversas (Capazzo *et al.*, 2000).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (Veiga Jr. *et al.*, 2005).

A toxidez das plantas não é constante e uniforme, sendo afetada por diversos fatores (Cheeke, 1998; Tokarnia *et al.*, 2000). Algumas plantas apresentam toxidez apenas em certas condições de administração ou em certas épocas do ano. Há outras cuja ação tóxica é de efeito cumulativo; neste caso a ingestão de certa quantidade pode não causar danos, fazendo com

que o leigo julgue-a inofensiva, até que um dia apareça uma reação adversa por tê-la consumido em doses maiores (Cheeke, 1998; Tokarnia *et al.*, 2000).

Há uma grande variação no conteúdo do princípio tóxico nas diferentes partes da planta, geralmente sendo a concentração maior nas sementes. No entanto, a grande maioria das intoxicações ocorre por meio da ingestão das folhas. A secagem da planta pode fazer com que esta tenha sua toxicidade reduzida, no entanto há plantas que não a tem afetada. Desta forma, o processo de armazenamento da planta, como por exemplo, a secagem, pode tornar uma planta atóxica (Cheeke, 1998; Tokarnia *et al.*, 2000).

As toxinas das plantas são produtos secundários de seu metabolismo, parecendo estar envolvidas como adjuvantes no mecanismo de sobrevivência da planta. Muitas toxinas são amargas ou induzem acentuadas alterações fisiológicas. As toxinas presentes nas plantas variam amplamente em estrutura e propriedades químicas (Osweiler, 1998). As classes químicas mais importantes de compostos tóxicos existentes nas plantas são: alcalóides, glicosídeos, lecitinas e ácidos orgânicos. Ainda, minerais absorvidos do solo e acumulados na planta, como por exemplo, selênio, bário, nitratos e oxalatos, podem ser responsáveis pela toxicidade de determinadas espécies vegetais (Cheeke, 1998).

A crença na “naturalidade inócua” dos fitoterápicos e plantas medicinais não é facilmente contradita, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso de plantas medicinais consistem em informações que dificilmente chegam ao alcance dos usuários atendidos nos serviços de saúde pública caracterizado como indivíduos de baixa escolaridade e acervo cultural (Silva *et al.*, 2006; Alexandre *et al.*, 2008).

Casos de intoxicações devido ao uso pouco cuidadoso de plantas medicinais como a utilização da planta errada foram registrados pelo Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (SINITOX), onde 1.728 casos de intoxicação humana por plantas no país foram registrados (ano base 2002), dos quais a Região Sul foi responsável por 35,7% destes casos. Entre os grandes centros, Porto Alegre destaca-se como a cidade com o maior número de registros, sendo a sua quase totalidade na zona urbana (Campesato, 2005).

Apesar da grande importância, não se conhece a toxicidade da maioria das plantas brasileiras, pois há poucos grupos de pesquisa envolvidos com este tipo de pesquisa. Assim, esta é uma área de pesquisa que necessita de incentivos. A condução de trabalhos que identifiquem e descrevam quadros de toxicoses por novas espécies deverão ser adequadamente conduzidos. Além disto, grandes esforços deverão ser despendidos na

elaboração de técnicas eficazes e viáveis que visem à prevenção das intoxicações (Barbosa *et al.*, 2007).

1.3. Síndrome Metabólica

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2009, aproximadamente 300 mil pessoas morreram de doenças cardiovasculares no Brasil, sendo a primeira causa de morte no país. Atualmente as doenças cardiovasculares (DCV) têm sido bastante associadas aos distúrbios metabólicos, como agravante (Ministério da Saúde, 2011).

Apesar da tendência de redução dos riscos de mortalidade por DCV no País e no mundo, algumas projeções indicam o aumento de sua importância relativa em países de baixa e média renda. A maior longevidade, associada ao possível aumento da incidência das DCV por adoção dos modos de vida com maior exposição a fatores de risco, são consideradas as principais razões deste incremento. Como fatores de risco estão o tabagismo e inatividade física, além de dieta rica em gorduras saturadas, com consequente aumento dos níveis de colesterol e hipertensão (Ishitani *et al.*, 2006).

A Síndrome Metabólica é o exemplo mais comum de distúrbio associado à DCV, sendo caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/diabetes do tipo 2, obesidade central e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicérides alto e HDL-colesterol baixo) (Ciolac e Guimarães, 2004). Pacientes com síndrome metabólica são considerados de risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas à aterosclerose, incluindo 2 a 4 vezes maior risco de derrame e 3 a 4 vezes maior risco de infarto do miocárdio comparado com aqueles que não possuem a disfunção (Hashemi *et al.*, 2010).

Mesmo sendo poucos os dados epidemiológicos existentes quanto à prevalência da SM, esta tem sido descrita em diferentes grupos étnicos e populações de diversos países. Pesquisas apontam que a prevalência da SM é estimada entre 20 a 25% da população geral, com comportamento crescente nas últimas décadas (Dunstan *et al.*, 2002). Estudos em algumas populações revelam uma variação de prevalência de 12,4% a 28,5% em homens e 10,7 a 40,5% em mulheres, dependendo do critério utilizado e da característica populacional (Mohan *et al.*, 2001; Ford, Giles e Dietz, 2002; Aguilar-Salinas *et al.*, 2004). Esta prevalência é ainda maior entre homens e mulheres com idades avançadas, chegando a 42% entre indivíduos com idade superior a 60 anos (Ford, Giles e Dietz, 2002).

Entretanto, investigações constatam que a prevalência da SM vem se elevando nos extratos mais jovens, o que deve ser objeto de preocupação social, pois indica agravamento

das epidemias de diabetes, hipertensão arterial e eventos cardiovasculares fatais e não fatais nos anos futuros (Salaroli *et al.*, 2007).

A hipertensão arterial (HA) constitui atualmente o distúrbio clínico crônico mais comum no mundo. Dependendo dos critérios para diagnóstico, pode-se afirmar que a HA está presente em 20-30% da população adulta, tornando-se rapidamente um problema de suma importância em saúde pública. A HA não deve ser considerada tão somente como uma doença, mas como um dos mais significativo e importante fator de risco modificável de morte prematura decorrente de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Desde a década de 50 já se reconhecia que para indivíduos de mesma faixa etária quanto maior o nível pressórico menor a expectativa de vida (Beevers e McGregor, 2000).

O estresse oxidativo emergiu como um fator patogênico fundamental no desenvolvimento da hipertensão. A produção exagerada de ânions superóxido (O_2^-) pela parede vascular tem sido observada em diferentes modelos animais de hipertensão incluindo ratos alimentados com frutose. Crescem as evidências da possibilidade de que o aumento da inativação oxidativa do óxido nítrico (NO) pelo excesso do superóxido possa contar para a diminuição na disponibilidade de NO e disfunção endotelial contribuindo para a evolução da pressão sanguínea (Unger e Patil, 2009).

O mecanismo pelo qual se desenvolve o processo hipertensivo é de ordem multifatorial e diretamente ligado a alterações metabólicas crônicas. Sabe-se que a hipertensão é um fator de risco independente para as doenças cardiovasculares apresentando importante associação com os demais elementos inerentes à SM, tais como diabetes mellitus tipo 2, obesidade central e hiperinsulinemia (Grundy *et al.*, 2004). Porém, vários são os outros estudos que demonstram que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória são comuns em pacientes com hipertensão, apesar de as alterações no perfil glicêmico não se normalizarem quando os níveis pressóricos são controlados (Lopes *et al.*, 2003; Lopes, 2003).

Entre hipertensos com SM, uma alta prevalência de lesões de órgãos-alvo com impacto prognóstico adverso tem sido descrita. Estudos recentes indicam, dentre as lesões identificadas, elevada prevalência de hipertrofia de ventrículo esquerdo, disfunção diastólica, aterosclerose de carótida, alterações na distensibilidade aórtica, retinopatia hipertensiva e microalbuminúria, quando comparados portadores de hipertensão arterial associada à SM com hipertensos sem outras manifestações características da síndrome. A elevada ocorrência de sinais precoces de lesões de órgãos-alvo, muitos dos quais reconhecidos como preditores independentes de eventos cardiovasculares, podem parcialmente explicar a associação da SM com significativo risco cardiovascular (Redon e Cifková, 2007; Mulè *et al.*, 2005 e 2006).

Outro importante sintoma da SM é o diabetes tipo 2 (DM2), que já atinge 135 milhões de pessoas no mundo, estimando-se crescimento para 300 milhões em 2025, principalmente nos países desenvolvidos (Salles *et al.*, 2004). A DM2 é caracterizada pela resistência à insulina, que é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e gordurosas. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina no pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina e, portanto, a situação de resistência à insulina se acompanha de hiperinsulinemia (Pessin e Saltiel, 2000).

Nas últimas décadas tem havido rápido e crescente aumento no número de pessoas obesas, o que tornou a obesidade um problema de saúde pública. Essa doença tem sido classificada como uma desordem primariamente de alta ingestão energética. No entanto, evidências sugerem que grande parte da obesidade é mais devida ao baixo gasto energético que ao alto consumo de comida, enquanto a inatividade física da vida moderna parece ser o maior fator etiológico do crescimento dessa doença nas sociedades industrializadas (Ciolac e Guimarães, 2004).

A obesidade é o maior fator de risco para desenvolvimento da diabetes tipo 1 (insulina-dependente) e tipo 2 (insulina-resistente). Anormalidades relacionadas a obesidade levam a acúmulo excessivo de triglicerídeos e ácidos graxos nas fibras musculares esqueléticas na forma de lipídeos intramiocelulares (IMCL). O acúmulo de IMCL é fortemente associado com a deficiência no metabolismo da glicose, estresse oxidativo, perda na produção de energia, resistência a insulina e eventualmente desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Clark *et al.*, 2011).

Estudos mostraram que a dieta do brasileiro vem sendo modificada com uma tendência para redução do consumo de leguminosas, hortaliças e frutas e aumento do consumo de açúcares simples e conseqüentemente de frutose, principalmente a proveniente da sacarose. Essa mudança nos hábitos alimentares poderá repercutir no metabolismo lipídico e ocasionar aumento dos lipídeos totais e triglicerídeos na circulação, levando a riscos cardíacos (Barreiros *et al.*, 2005).

O aumento no consumo alimentar de frutose coincide com a crescente prevalência de obesidade e síndrome metabólica nas duas últimas décadas. Foi demonstrado que uma dieta rica em frutose em humanos e animais de laboratório pode afetar o metabolismo de carboidratos e lipídios. Essas alterações provocam distúrbios característicos da SM, a qual foi primeiramente descrita por Reaven em 1988. A ocorrência dos componentes dessa patologia

aumenta o risco de desenvolvimento de DM2, aterosclerose, doenças cardiovasculares e renais (Moura *et al.*, 2008).

A indução de resistência à insulina pode ser obtida por mudança no padrão dietético. A administração de uma dieta rica em frutose (35% na dieta), que vem sendo amplamente utilizada como adoçante de bebidas, em doces no lugar da sacarose, inicia uma cadeia de eventos metabólicos, o que pode levar a hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e promover elevação da pressão arterial. A fisiopatologia dos distúrbios metabólicos induzidos por sobrecarga de frutose deve-se principalmente à inibição da enzima fosfofrutoquinase, o que leva à inibição da via glicolítica. Ratos da cepa espontaneamente hipertensos (SHR) parecem ter maior suscetibilidade a este modelo experimental, enquanto ratos Wistar apresentam menor suscetibilidade, porém são um bom modelo. A administração de vitaminas, antioxidantes e extratos fenólicos tem conseguido, de maneira eficaz, reverter à hipertensão arterial e o distúrbio metabólico induzido por excesso de frutose (Vasdev *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos em diversos países demonstraram a influência da composição da dieta na ação da insulina e nos níveis de glicose plasmática. Entre estes estudos, foi reportado que a ingestão de frutose causa resistência à insulina, hiperglicemia e hipertrigliceridemia em ratos (Barros *et al.*, 2007). Foi provado que o consumo de frutose diminui a sensibilidade à insulina, aumenta inflamações, e promove dislipidemia, e assim aumentando os riscos de desenvolvimento de *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2). Também foi demonstrado que a frutose aumenta o estresse oxidativo, o qual contribui na resistência a insulina, disfunções nas ilhotas e desenvolve DM2 (Cummings *et al.*, 2010).

Uma vez que, os modelos animais mimetizam diversas respostas fisiológicas humanas, ratos alimentados com frutose têm sido utilizados como modelo experimental da síndrome metabólica humana. O modelo de SM induzida em ratos caracteriza-se pela hipertensão, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e resistência à insulina. (Moura *et al.*, 2008).

1.4. Hipertensão

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma entidade clínica de origem multifatorial caracterizada por níveis de pressão arterial sistólica (PAS) e/ou diastólica (PAD) elevados, sendo classificada em HAS primária e secundária. A HAS primária é poligênica, de etiologia desconhecida e parece improvável que uma única causa explique suas diversas alterações hemodinâmicas e fisiopatológicas. Quaisquer que sejam os mecanismos patogênicos envolvidos, eles podem acarretar um aumento da resistência periférica total vascular induzindo vasoconstrição ou a um aumento do débito cardíaco ou ambos (Castro,

1999), razão pela qual participam dessa gênese, os aspectos genéticos, vasculares, humorais, renais e neurais, podendo ser modificáveis (tabagismo, sedentarismo, alimentação, alcoolismo, obesidade) e não modificáveis (raça, sexo, faixa etária, hereditariedade) (Nobre *et al.*, 1998). Por outro lado a HAS secundária está associada a uma causa específica que pode ser renal ou não (Castro, 1999).

A HAS pode ser entendida como uma síndrome, o que lhe confere um caráter multidisciplinar. Nesta síndrome, por exemplo, são contemplados aspectos cardiológicos, nefrológicos, endocrinológicos, neurológicos, vasculares, epidemiológicos, nutricionais e psicossociais, o que justifica a recomendação para o atendimento multiprofissional do portador de hipertensão com envolvimento de diferentes categorias da área de saúde (Kohlmann Jr, 2000).

A hipertensão é o fator principal ou coadjuvante em mais de 200.000 mortes ao ano. A sua elevada prevalência na população brasileira situa-se em média 15% da população geral adulta variando conforme o estado e a localidade pesquisada de 9 a 30%. Inquéritos de base populacional realizados em algumas cidades do Brasil mostram prevalência de hipertensão arterial (PA \geq 140/90 mmHg) de 22,3% a 43,9%, como em Araraquara, São Paulo, Piracicaba, Porto Alegre, Cotia, Catanduva e Cavenge (Ayres, 1991; Freitas *et al.*, 2001).

Um indivíduo hipertenso não tratado está em grande risco para desenvolver insuficiência ventricular esquerda incapacitante ou fatal, infarto do miocárdio, hemorragia ou infarto cerebral ou ainda insuficiência renal em estágio precoce. A HAS é o fator de risco mais importante para o acidente vascular encefálico (AVE). É também um forte fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose coronária (Castro, 1999).

O revestimento endotelial dos vasos sanguíneos é crítico para a saúde vascular e constitui uma das principais defesas contra a hipertensão. A disfunção endotelial se caracteriza pela liberação alterada de fatores relaxadores derivados do endotélio (por exemplo, óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e aumenta a liberação de fatores constritores, pró-inflamatórios, pró-trombóticos e de crescimento derivados do endotélio. Estes últimos incluem a endotelina, o tromboxano e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). O endotélio de todos os vasos sanguíneos possui a enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser ativada por bradicinina ou acetilcolina, ou pela força de cisalhamento que acompanha a hipertensão decorrente do aumento da pressão de pulso. Uma vez ativada, a NOS converte L-arginina em citrulina, uma substância inerte, e em óxido

nítrico (NO), um gás volátil que se difunde para a musculatura vascular lisa adjacente e ativa uma série de quinase G que culminam em vasodilatação (Libby *et al.*, 2010).

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

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

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

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

Geralmente, a primeira forma de tratamento da hipertensão é a tentativa de modificação do estilo de vida, incluindo a interrupção do tabagismo, a moderação de ingestão de álcool e a redução de peso, quando aplicável, além de exercício programado e redução na ingestão de sal. Quando apenas a modificação do estilo de vida não é suficiente, várias drogas podem ser prescritas, mais comumente drogas diuréticas, que aumentam o volume urinário e, por conseguinte, diminuem o volume sanguíneo e a pressão arterial. Também são prescritas, muitas vezes, drogas que bloqueiam receptores β -adrenérgicos (como o atenolol) que reduzem a pressão arterial diminuindo a frequência cardíaca. Os inibidores da ECA, antagonistas do cálcio e vários vasodilatadores também podem ser utilizados em situações específicas (Fox, 2007).

1.5. *Contratilidade Miocárdica*

As proteínas que realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, sendo denominadas proteínas contráteis, enquanto que a tropomiosina e a troponina, modulam a sua interação, daí a denominação de proteínas moduladoras da contração (Vassallo *et al.*, 2008).

Os filamentos finos são compostos, basicamente, por 3 proteínas: actina, tropomiosina e troponina. A actina apresenta sítios ativos capazes de interagir com a miosina e, durante esta interação, a ATPase miosínica é ativada hidrolizando ATP. Deste modo ocorre a liberação de energia necessária à contração. Em repouso este sítio de interação é bloqueado pela tropomiosina, a qual, por sua vez, liga-se à troponina (Vassallo *et al.*, 2008).

A troponina é formada por 3 subunidades; a subunidade I (TnI) que, quando interage com a tropomiosina, provoca a inibição do sítio ativo da actina; a subunidade C (TnC), que possui grande afinidade pelo íon Ca^{2+} ; e a subunidade T (TnT), que se liga à tropomiosina quando o Ca^{2+} interage com a troponina. Nesta última situação a tropomiosina desloca-se liberando os sítios ativos da actina, garantindo a interação actino-miosina (Vassallo *et al.*, 2008).

Os filamentos finos e grossos possuem, em suas composições, outras proteínas, algumas das quais ainda não têm suas funções perfeitamente definidas. Dentre estas proteínas

estão: Proteína C; Proteína M e miomesina; Titina; Tropomodulina; e Nebulina (Vassallo *et al.*, 2008).

O mecanismo de acoplamento excitação-contração cardíaco compreende os processos de ativação elétrica dos miócitos que desencadeiam a contração do coração. O cálcio é um íon intimamente envolvido na atividade elétrica cardíaca e, por interagir diretamente com os miofilamentos, na contração muscular (Bers, 2002).

Durante o potencial de ação cardíaco o cálcio entra na célula através dos canais de cálcio ativados por despolarização e gera a corrente de cálcio, chamada I_{Ca} , que geralmente se refere à entrada através dos canais de cálcio do tipo L. A entrada de cálcio pelo sarcolema desencadeia a liberação de cálcio-cálcio induzida do retículo sarcoplasmático (RS), pelos canais de rianodina. A combinação entre o influxo e a liberação de cálcio aumenta a concentração de cálcio intracelular ($[Ca]_i$), possibilitando a ligação do cálcio com a TnC, e desta forma, desencadeia o processo contrátil (Bers, 2002).

O relaxamento do cardiomiócito ocorre com o desprendimento do cálcio da TnC e a posterior redução da $[Ca]_i$. Esta redução é possibilitada por ação de 4 mecanismos, envolvendo: a bomba de cálcio do RS (SERCA ou Ca^{2+} -ATPase do RS), a qual recapta ativamente este íon para seu interior; a Ca^{2+} -ATPase do sarcolema; o trocador Na^+ / Ca^{2+} (NCX) do sarcolema; e o uniporte de cálcio na mitocôndria (Bers, 2002).

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

Outra forma de controlar a atividade do NCX, além das mudanças do potencial de membrana, consiste nas alterações na disponibilidade destes íons para o transporte. A elevação do Na^+_i dificulta, rápida e intensamente, a troca Na/Ca no estado de repouso, basicamente porque o aumento do Na^+_i diminui o gradiente difusional do Na^+ através da membrana. Além disso, o trocador possui 2 sítios intracelulares onde se ligam Na^+ e Ca^{2+} . A ligação do Na^+ provoca redução da atividade da troca, enquanto a ligação com o Ca^{2+} a

estimula. Desta forma, condições que promovem elevação dos níveis de Na^+_i , tais como os digitálicos, dificultam a extrusão do Ca^{2+} via troca Na/Ca, aumentando a força de contração (Blaustein *et al.*, 1991).

Uma série de informações pode ser obtida de registros de contrações isométricas, referentes às variações da amplitude da contração e de seus parâmetros temporais. A amplitude da contração traduz a quantidade de força desenvolvida pelo músculo e os parâmetros temporais fornecem informações sobre a cinética de ativação e relaxamento da contração muscular. O tempo de ativação é o tempo despendido do início da contração até seu pico máximo e traduz a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, processos que aumentam a concentração e a cinética de entrada de cálcio no mioplasma. Já o tempo de relaxamento é medido do pico máximo até o término da contração e reflete a cinética dos processos envolvidos no relaxamento ou diminuição do cálcio mioplasmático (Vassallo *et al.*, 2008).

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

Outra manobra realizada com músculos papilares pode ser as potenciações-pós-pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica. Sabe-se que em músculos cardíacos de mamíferos a primeira contração após curto período de pausa é potencializada (Vassallo e Mill, 1988; Leite *et al.*, 1991; Mill *et al.*, 1992). As contrações obtidas após pausas têm maior dependência da liberação de cálcio pelos seus estoques intracelulares do que pelo influxo de cálcio pelo sarcolema. Desta forma, as mensurações das PPP visam avaliar a atividade do Retículo Sarcoplasmático (RS), tanto a magnitude de liberação de cálcio ativador quanto, a capacidade de recaptar cálcio (Wussling *et al.*, 1980; Wussling *et al.*, 1986; Leite *et al.*, 1988; Leite *et al.*, 1991; Mill *et al.*, 1992; Mill *et al.*, 1994).

Os músculos papilares podem ser avaliados no protocolo de “post rest contraction” (PCR), onde o tratamento com cafeína e exposição à solução sem cálcio visam avaliar o influxo de cálcio pelo sarcolema. No músculo cardíaco de ratos, a extrusão de cálcio para o meio extracelular é dependente do transporte de cálcio para estoques intracelulares e da extrusão através do sarcolema. A cafeína depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995) e a exposição a solução sem cálcio na sua composição facilita a extrusão de cálcio pelo

sarcolema (Vassallo *et al.*, 2008). Diferente do que ocorre nas PPP, que são dependentes da liberação de cálcio pelo RS e são potencializadas pela duração da pausa, as contrações desenvolvidas após repouso são dependentes, principalmente, do influxo de cálcio pelo sarcolema (Leite *et al.*, 1991).

Durante o potencial de ação cardíaco, o cálcio entra na célula via canais ativado por despolarização, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. O influxo de cálcio promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares, sendo essa liberação denominada liberação de cálcio induzida por cálcio. A $[Ca^{2+}]_i$ resulta da combinação do influxo de cálcio pelo sarcolema e a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (o principal reservatório intracelular de cálcio) e é o íon que, por ligação direta aos miofilamentos, será o responsável pela gênese da força e encurtamento muscular (Bers, 2002).

O músculo cardíaco possui um potencial de ação (PA) longo, isso previne que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização. Portanto, o tétano não pode ser obtido em condições normais, nas quais é impossível a fusão das contrações. Por esse motivo, utiliza-se a cafeína (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994) e aumento da frequência de estimulação elétrica (10 Hz) para se produzir a ativação máxima da maquinaria contrátil em músculos papilares (Leite *et al.*, 1995).

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

Embora a amplitude do desenvolvimento de força seja um determinante importante da função cardíaca, a cinética em que as contrações têm lugar também é importante. Sabe-se que em várias patologias cardíacas a força da contração é relativamente bem preservada, resultando em uma preservada fração de ejeção (Borloag e Kass, 2008). No entanto, nestas patologias, a cinética de relaxamento é lenta, resultando em um baixo volume ventricular diastólico final, que, então, mesmo com uma contração vigorosa priva o corpo do débito cardíaco suficiente (Grossman, 1990).

Portanto, ressalta-se a necessidade de estudos acerca de possíveis fármacos para utilização no combate as doenças de risco para doenças cardiovasculares, como o estudo da *C. xanthocarpa*, a qual se pretende avaliar quanto a sua toxicidade, e seus possíveis efeitos cardiovasculares.

2. OBJETIVO

A espécie *Campomanesia xanthocarpa* é bastante utilizada na medicina popular, dentre seus usos destaca-se a diminuição dos níveis de colesterol (Alice *et al.*, 1995). Alguns estudos vêm sendo feitos com ela para comprovar seus efeitos cientificamente, tais como o tratamento crônico da obesidade em ratos, com a infusão das folhas, que levou a um decréscimo significativo na massa corpórea, bem como reduziu a glicemia (Biavatti *et al.*, 2004). Os resultados dos estudos de Vinagre *et al.*(2010), apenas sugerem que o tratamento com decocto das folhas de *C. xanthocarpa* pode ser útil para o manejo do diabete melito, porém ressaltam que estudos farmacológicos e toxicológicos ainda são necessários. Devido a alguns dos usos e efeitos comprovados da guabiroba estarem relacionados a sintomas da síndrome metabólica neste trabalho, se avaliou os possíveis efeitos desta planta sobre parâmetros desta patologia.

2.1. *Objetivo Geral*

Determinar a toxicidade do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* bem como avaliar a hemodinâmica e o desempenho mecânico cardíaco em ratos tratados com frutose.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* em ratas;
- Determinar os efeitos do extrato aquoso sobre a hemodinâmica através da pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca de ratos tratados com frutose;
- Avaliar os efeitos do extrato aquoso na função mecânica cardíaca através da medida de força isométrica dos músculos papilares de VE, bem como a potenciação pós-pausa, curva de cálcio, *pos rest contraction* e tensão tetânica em ratos tratados com frutose;
- Quantificar parâmetros bioquímicos como glicose, colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos sob efeito do extrato aquoso em ratos tratados com frutose;
- Avaliar a toxicidade do extrato aquoso no fígado e nos rins através da determinação de AST, ALT e uréia e creatinina respectivamente, bem como a histologia hepática e renal de ratos tratados com frutose.

3. ARTIGO I

Ingestion of aqueous extract of *Campomanesia xanthocarpa* does not produce acute toxicity in rats.

Sant'Anna, L.S.*; Santos, K.T.; Torres, J.G.; Grecco, G.A.; Moreira, C.M.
Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585, Urugaiana, RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel +55 55 99625117.

Email address lianesantariano@gmail.com

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The toxicity of medicines prepared from plants may seem to be trivial when compared with conventional treatments. However, is a serious public health (Capazzo *et al.*, 2000). *Campomanesia xanthocarpa* is a medicinal plant popularly known as guabiroba and widely used as purgative, anti-diarrheal, anti-rheumatic, anti-inflammatory diseases of the urinary tract and for lowering cholesterol levels, among others (Alice *et al.*, 1995).

Materials and Methods: To evaluate the toxicity of these plant two simultaneous procedures were performed for determination of lethal dose 50% and "*Hippocratic Screening*". For evaluation of hepatic and kidney functions, determination of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea and creatinine were performed. Also kidney and liver were collected for histological analysis.

Results: There was no mortality of animals during the observation of 48 h for calculation of LD50, making it impossible to determine it, and no change in the behavior of animals in all parameters were registered. There were no changes in biochemistry and histological parameters.

Conclusions: Results suggest that the ingestion of aqueous extract of *C. xanthocarpa* may be not toxic to the dose of 5g/kg.

1. INTRODUCTION

Medicinal plants and their derivatives are commonly the first choice of treatment, usually done without accompanying health professional (Balbino and Dias, 2010). The toxicity of medicines prepared from plants may seem trivial when compared with conventional treatments, however, is a serious public health problem. Medicinal plants may trigger adverse reactions by their own constituents, due to interactions with other medicines or

food, or related to patient characteristics (age, sex, physiological condition, genetic characteristics, among others). Diagnostic errors, misidentification of plant species and different use of the traditional way can be dangerous, leading to overdose, therapeutic ineffectiveness and adverse reactions (Capazzo et al., 2000).

Campomanesia xanthocarpa is a food and medicinal plant popularly known as guabiroba and widely used, belonging to the Myrtaceae family, native in Brazil and found in nearly all forest, from the state of Minas Gerais to southern Rio Grande do Sul (Lorenzi 1992). Infusions prepared with its leaves are used empirically as purgative, anti-diarrheal anti-rheumatic, anti-inflammatory diseases of the urinary tract and for lowering cholesterol levels, among others (Alice et al., 1995). Biavatti et al. (2004) evaluated the pharmacological properties of this plant and found that the aqueous extract of the leaves induced a significant reduction in weight gain in rats subjected to caloric diet, and reduce blood glucose. Markman et al. (2004) found that the hydro alcoholic extract of leaves was effective in preventing gastric ulcers in rats. More recently reports have also shown the use of guabiroba for obesity treatment, its effectiveness against diabetes and ulcer (Dickel et al., 2007, Vinagre et al., 2010, Markman et al., 2004). Phytochemical screening of extract of *C. xanthocarpa* indicated the presence of flavonoids, saponins, tannins and terpenes, which could explain these properties (Markman et al., 2004; Klafke et al., 2010).

Even though many popular uses of *C. xanthocarpa*, and some scientific evidence of different effects and properties, there are no information of this plant about its toxicology. Therefore, this study evaluates the safe use of infusion of the leaves of guabiroba in different doses, through a toxicology study in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

It was used female Wistar rats (*Rattus norvegicus*, N= 18, 200g) with 60 days of age, acquired the vivarium of Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brazil). They were kept in appropriate cages in a controlled environment with temperature between 20 and 22 °C and 12 light hours daily, with food and water *ad libitum*.

Every procedure were conducted in accordance with the International Principles for Research involving Animals (Geneva), and with the Brazilian legislation prepared by Law No. 11.794/2008 (Procedures for scientific use of animals) and Decree 24.645/34 (The

Animal Rights). It was approved by the Committee of Animal Use Unipampa under No. 003/2011.

2.2. *Botanical material*

The *Campomanesia xanthocarpa* leaves were collected in São Marcos, 5th district of Uruguaiana, RS-Brazil, in October 2010. The botanical identification was carried out in Unipampa, Campus São Gabriel, RS-Brazil, where a voucher specimen deposited in its herbarium.

To prepare the extract, fresh leaves were subjected to washing with a solution of 0.4% sodium hypochlorite for 1 hour, after they were washed under running water for 15 minutes, dried at 37 ° C for about 72 hours, until they reached a constant weight, while maintaining less than 10% humidity (Klafke *et al.*, 2010). After they were ground in a cutting mill, resulting into a powder, the aqueous extract was prepared by infusion for 10 minutes and subsequently cooled, filtered and dried at 40°C (Vinagre *et al.*, 2010).

2.3. *Evaluation of Toxicity*

Two procedures were carried out simultaneously, the determination of lethal dose 50% (LD50) and the "*Hippocratic Screening*," according to the methodology of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) for testing of Chemicals 423 (2001) and according to Malone and Robichaud (1983).

To test the LD50 animals were treated with increasing doses of extract of *Campomanesia xanthocarpa* (5, 50, 300, 2000 and 5000 mg/kg) administered orally using 3 rats for each dose. After treatment, the animals were observed for a period of 48 hours.

Concomitantly with the testing of LD50, the observation of animals in times of 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours and daily until day 14 was made, in order to quantify the effects of the extract on the parameters: 1. State of consciousness and disposition (general appearance, vocalization, irritability), 2. Coordination (general activity, touch response, response to the tightening of the tail, writhing, gait, righting reflex), 3. Muscle tone (tonus of the legs, body, strength to grab, ataxy), 4. Reflexes (corneal and headset), 5. Central nervous system activity (tremors, convulsions, stimulation, a phenomenon of "Straub", sedation, hypnosis, anesthesia), 6. Activity of the Autonomic Nervous System (lacrimation, ptosis, defecation, urination, piloerection, hypothermia, breathing) and 7. Changes in body weight (water and food intake, fecal production) (Malone and Robichaud, 1983).

At the end of these tests, animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg *ip*) and xylazine (10 mg/kg *ip*) and blood sample collected by cardiac puncture. To evaluate hepatic and kidney functions, serum enzymes AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), urea and creatinine were determined (Labtest Kits). Also kidney and liver were collected for histological analysis, performed according to methodology of Tolosa *et al.* (2003).

2.4. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). One-way ANOVA was used and the Tukey post hoc test to compare means when ANOVA was significant. P values <0.05 were considered significant.

3. RESULTS

No mortality of animals was observed during 48 h to calculate LD50, making it impossible to be determined, suggesting that the ingestion of aqueous extract of *C. xanthocarpa* is not toxic to the dose up to 5g/kg.

In the *Hippocratic Screening* tests, 14 days observations were made after administration of different doses of the extract and no change in the animals' behavior in all parameters were registered (Table 1 e 2).

Table 1. Parameters related to the *Hippocratic Screening*, evaluated until 24 hours, after oral administration of the extract of *C. xanthocarpa*.

Evaluated Parameters	Groups	Time (hours)					
		1	2	4	8	12	24
Consciousness state and disposition	control	3	3	3	2	2	2
	5mg/kg	2	2	2	2	2	2
	50mg/kg	2	2	2	1	1	1
	300mg/kg	2	2	2	2	1	1
	2000mg/kg	2	2	2	1	1	1
	5000mg/kg	2	2	2	1	1	1
Coordenation	control	3	3	3	3	2	2
	5mg/kg	2	2	2	2	2	2
	50mg/kg	2	2	2	2	2	2
	300mg/kg	2	2	2	2	2	2

disposition	50mg/kg	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300mg/kg	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000mg/kg	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5000mg/kg	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coordenation	control	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	5mg/kg	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	50mg/kg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	300mg/kg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2000mg/kg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	5000mg/kg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Muscle tone	control	2	2	3	3	3	2	2	3	2	3	2	2	2
	5mg/kg	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2
	50mg/kg	2	2	3	3	2	3	2	3	3	2	3	2	2
	300mg/kg	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	2
	2000mg/kg	2	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3	2	2
	5000mg/kg	2	2	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2
Reflexes	control	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	5mg/kg	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
	50mg/kg	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	300mg/kg	0	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2000mg/kg	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	5000mg/kg	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Central Nervous System Activity	control	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	50mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	300mg/kg	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2000mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5000mg/kg	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Autonomic Nervous System Activity	control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5mg/kg	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	50mg/kg	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	300mg/kg	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1

2000mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5000mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Scale used: 4 - Intense, 3 - Moderate, 2 - Little, 1 - Rare and 0 - Absent. n = 3 per group / dose.

Table 3 shows values of biochemical parameters, which were not significant, except for the value of AST for the group 5000mg/kg when compared to groups 50mg/kg, 300mg/kg and 2000mg/kg. All groups showed an increase of weight between 4-12 g after 14 days of the aqueous' extract administration (Table 4) but during the first three days of observation there was no weight gain in any group with normal food and water consumption (data not shown).

Table 3. Biochemical parameters after 14 days of administration of the extract.

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
control	42.1 ± 10.0	28.29 ± 3.6	65.46 ± 0.3	1 ± 0.4
5mg/kg	32.7 ± 6.8	30.77 ± 5.0	68.95 ± 3.6	0.48 ± 0.07
50mg/kg	19.84 ± 7.7	39.21 ± 2.7	57.44 ± 2.1	0.7 ± 0.08
300mg/kg	18.32 ± 5.3	29.01 ± 3.7	62.48 ± 3.1	0.9 ± 0.3
2000mg/kg	20.37 ± 6.7	37.89 ± 5.0	65.27 ± 8.8	0.59 ± 0.1
5000mg/kg	61.17 ± 9.2*	32.74 ± 5.7	53.06 ± 1.4	0.78 ± 0.3

Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)

* p < 0.05 vs. 50mg/kg, 300mg/kg and 2000mg/kg.

Table 4. Weights of animals before and after 14 days of observation *Hippocratic Screening* parameters.

Groups	Body weight	
	Initial (g)	Final (g)
control	257 ± 5.4	265 ± 10.5
5mg/kg	244 ± 6.3	248 ± 8.0
50mg/kg	240 ± 3.3	245 ± 7.5
300mg/kg	264 ± 4.3	277 ± 9.5
2000mg/kg	253 ± 20.1	261 ± 19.4
5000mg/kg	234 ± 18.6	246 ± 20.1

When a substance is toxic it can often affect the liver and kidney, as these are organs of detoxification, causing histological changes as nuclei and indistinct cell boundary, vascular

congestion, degeneration and necrosis (Rhoden *et al.*, 2000; Atangwho *et al.*, 2012). Figure 1 shows kidney sections of different groups, where there were no histological alterations as well as in liver cells, shown in Figure 2, suggesting a hepatic and renal safety consumption of this plant.

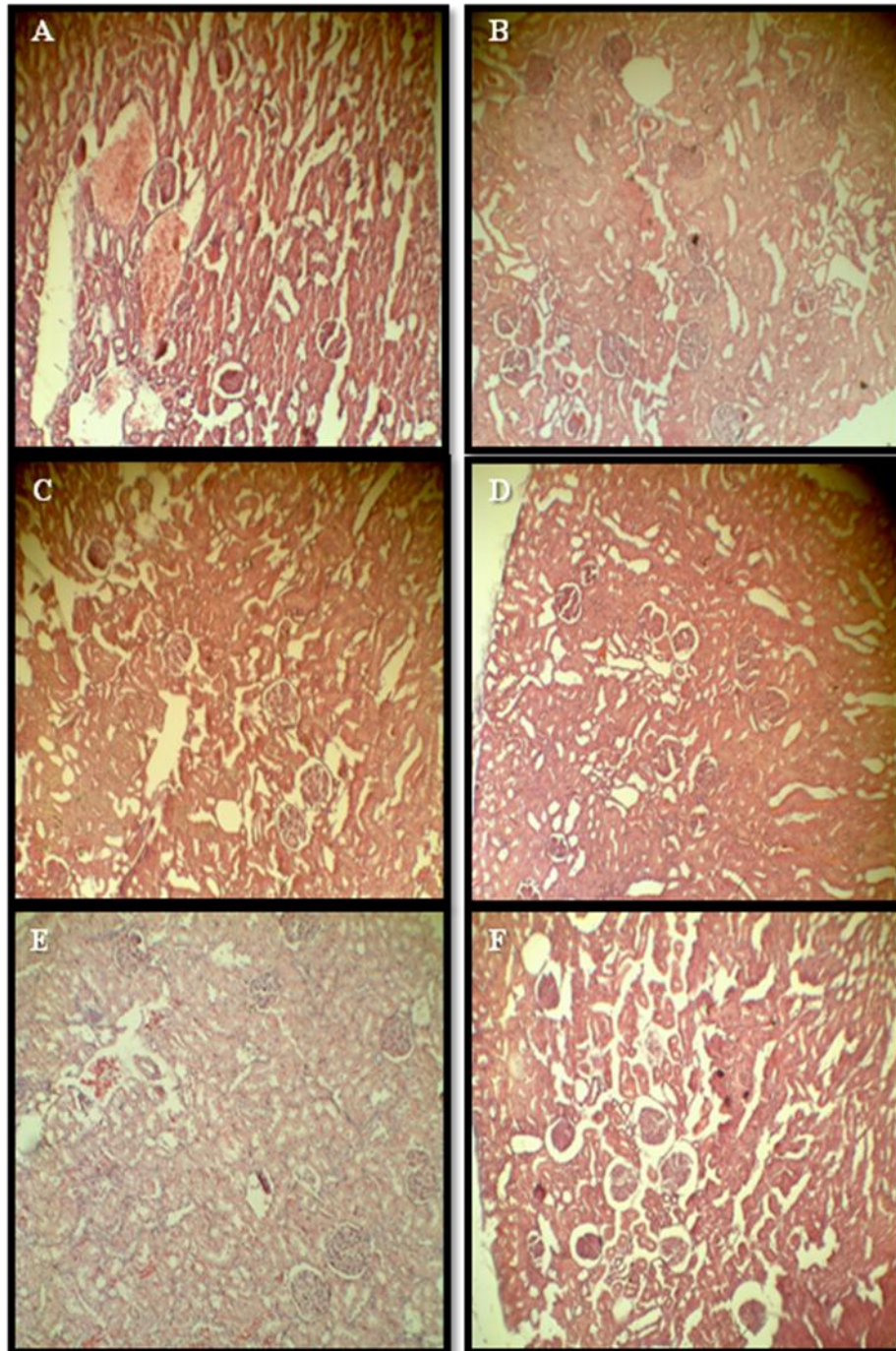


Figure 1. Photomicrograph of kidney's histology sections after staining with Hematoxylin-Eosin (HE, x.100). (A) Kidney section of control group. (B) Kidney section of 5mg/Kg dose group. (C) Kidney section of 50mg/Kg dose group. (D) Kidney section of 300mg/Kg dose group. (E) Kidney section of 2000mg/Kg dose group. (F) Kidney section of 5000mg/Kg dose group. All pictures showing normal architecture.

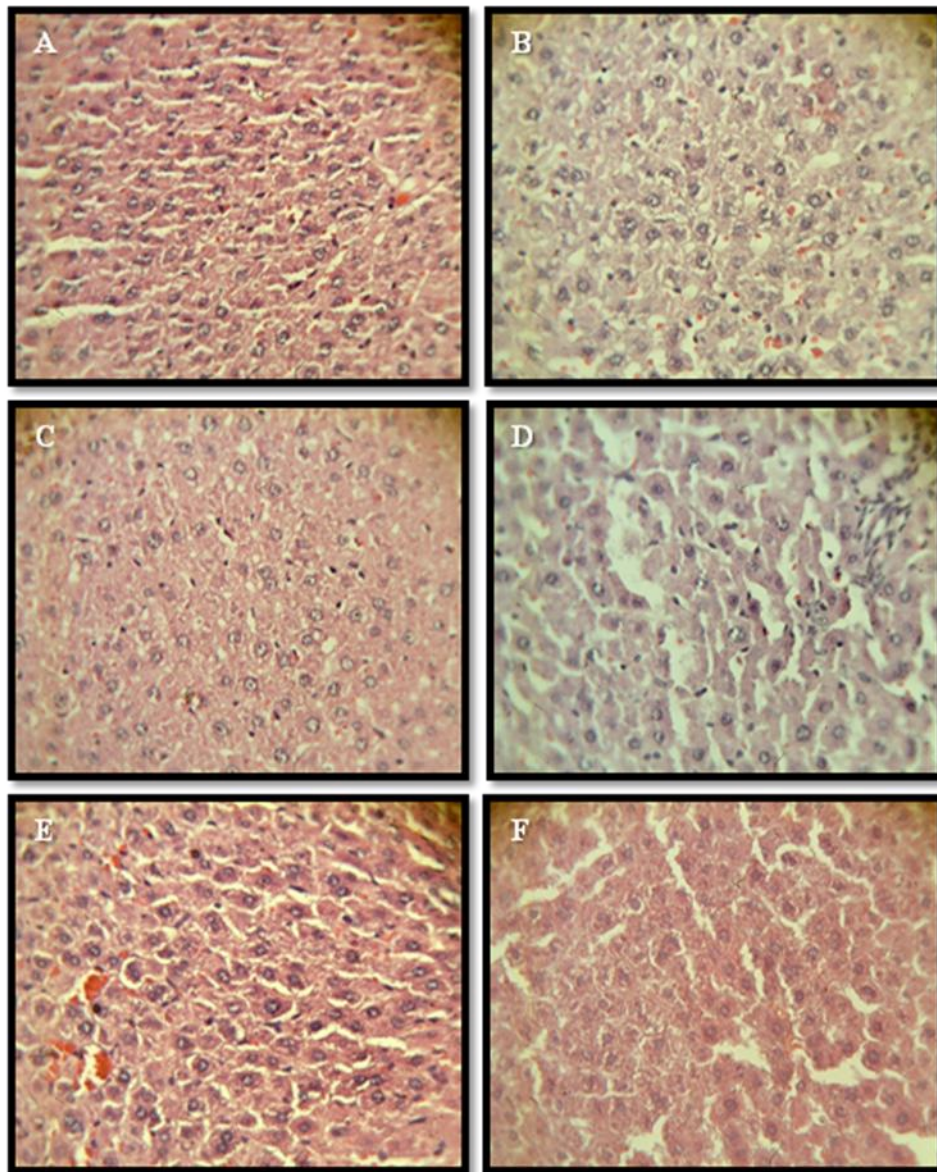


Figure 2. Photomicrograph of liver's histology sections after staining with Hematoxylin-Eosin (HE, x.400). (A) Liver section of control group. (B) Liver section of 5mg/Kg dose group. (C) Liver section of 50mg/Kg dose group. (D) Liver section of 300mg/Kg dose group. (E) Liver section of 2000mg/Kg dose group. (F) Liver section of 5000mg/Kg dose group. All pictures showing normal architecture of the hepatic cells.

4. DISCUSSION

The leaves of this plant appears to have no toxicity. According to Pires *et. al.* (2004), substances with estimated values of LD50 greater than 5 mg/kg may be considered non toxic and the calculations resulting from the results above this value are inaccurate. So the results of this study did not show toxicity to the aqueous extract of *Campomanesia xanthocarpa*. The World Health Organization (WHO) believes that currently the practice of using medicinal plants is regarded as the main treatment option for approximately 80% of the world

population (Pinto *et al.*, 2002). It is therefore very important that there are scientific studies proving the safety in the empirical use of these plants.

The evaluation of *Hippocratic Screening* provides an overall estimate of pharmacological and toxicological nature of an unknown substance (Lucio *et. al.*, 2000). The observation of no change in the rats' behavior 14 days after administration of the extract doses (Table 1 e 2) may suggest that there is no adverse effect on ingestion of the guabiroba's tea leaves.

Lucio *et al.* (2000) with the same protocols used in this study, evaluated epiisopilosina, an alkaloid derived from *Pilocarpus microphyllus*, where from observations of the *Hippocratic Screening* it could be concluded that this compound reduced the state of awareness and willingness of rats and even at doses above 300mg/kg caused tremors, turns of head, and knocking teeth itch. These data indicated a probable action of the substance in the activation of central cholinergic receptors. Pires *et al.* (2004), evaluated the acute toxicity of two species of pepper, *Schinus terebinthifolius* and *Piper nigrum*, concluding that the toxicity would be greater than 5g/kg orally and 3.5 g/kg intraperitoneally, suggesting that the route of administration of the extract can vary the lethal dose and the intraperitoneal route would be more sensitive. The observations of the *Hippocratic Screening* during the first 24 hours showed changes in the parameters of state of consciousness and muscle motor system, which disappeared after 12 hours of administration.

Serum quantification of AST and ALT as excretion of the metabolites, and of creatinine and urea, are well used to evaluate possible changes in the liver and kidney, respectively (Rosidah *et al.*, 2009, Mohamed *et al.*, 2011; Atsamo *et al.*, 2011). For a confirmation of the absence of liver and kidney damage, serum levels of AST, ALT, creatinine, and urea (Table 3) were analyzed. Only significant difference was found for AST, an enzyme that is released in large quantities in the blood when there is damage to the membrane of hepatocytes. However, no tissue necrosis have to occur for this enzyme to be increased, not having a established relationship between the damage and AST levels. In this study, although AST of the group 5000 mg/kg increased two times that of the other groups (300, 500, 2000 mg/kg) it was not different from control, supporting with this finding the histological analyzes that revealed no liver lesion (Figure 2). Analyzing the kidneys histologically it was observed no kidney injury (Figure 1) and no difference in biochemical markers of renal function (Table 3).

Despite the widespread use of medicinal plants, the studies evaluating the toxicity of these are scarce. For a better understanding of the use of plants, it is necessary to evaluate the

risk/benefit ratio of its use through pharmacodynamic and toxicological studies. The difficulty of finding data in the literature to discuss evaluation results reinforce the need for toxicity studies of this nature that will bring great contribution to safely use these products for human and animal population. Therefore, the use in folk medicine based on traditional knowledge is not sufficient to validate herbal medicines as safe and effective (Turola and Nascimento, 2006).

5. CONCLUSION

However, although further studies are needed to better understand the mechanisms of action of this plant and its use with longer times results suggest that consumption of the aqueous extract of *Campomanesia xanthocarpa* is not toxic and has no collateral effects in kidney, liver and behavioral, to the highest dose tested. Therefore, the population may have security in tea consumption of up to 5g daily.

6. REFERENCES

Alice CB; Siqueira NCS; Mentz LA; Brasil e Silva GAA; José KFD. *Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico*, 1995. Ed. Ulbra. Canoas. 211p.

Almeida, A.C.; Sobrinho, E.M.; Pinho, L.; Souza, P.N.S.; Martins, E.R.; Duarte, E.R.; Santos, H.O.; Brandi, I.V.; Cangussu, A.S.; Costa, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural*, 2009.

Atagwho, I.J.; Ebong, P.E.; Eyong, E.U.; Asmawi, M.Z.; Ahmad, M. Synergistic antidiabetic activity of *Vernonia amygdalifolia* and *Azadirachta indica*: biochemical effects and possible mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 141: 878-887.

Atsamo, Albert D.; Téléphore B. Nguélefack; Jacques Y. Datt; Albert Kamanyi. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 134: 697-702.

Balbino, EE; Dias, MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20: 992-1000.

Biavatti, MV; Farias, C; Curtius, F; Brasil, LM; Hort, S; Schuster, L; Leite, SN; Prado, SRT. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 93: 385-389.

Capazzo, R; Izzo, AA; Pinto, L; Bifulco, T; Vitobello, C; Mascolo, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 2000; 71:58-65.

Dickel ML; Rates SMK; Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in POA, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 109: 60-71.

Klafke JZ; Silva MA; Panigas TF; Belli KC; Oliveira MF; Barichello MM; Rigo FK; Rossato MF; Santos ARS; Pizzolatti MG; Ferreira J; Viecili PRN. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 127:299-305.

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

Lucio, E.M.R. de A.; Rosalen, P.L.; Sharapin, N.; Souza Brito, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2000; 9/10: 23-35.

Malone, MH; Robichaud, RC. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J Ethnopharmacol*, 1983; 8:127-147.

Markman, BEO; Bacchi, EM; Kato, ETM. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 94: 55-57.
Mohamed, Elsnoussi Ali Hussin; Chung Pin Lim; Omar Saad Ebrika; Mohd. Zaini Asmawi; Amirin Sadikun; Mun Fei Yam. Toxicity evaluation of a standardised 50% ethanol extract of *Orthosiphon stamineus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133: 358-363.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, Guideline 423, 2001.

Pinto, CA; Silva, DHS; Bolzani, US; Lopes, NP; Epitânio, RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, 2002; 25: 45-61.

Pires, O.C.; Taquemasa, A.V.C.; Akisue, G.; Oliveira, F. de; Araujo, C.E.P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). *Acta Farm. Bonaerense*, 2004; 23: 176-182.

Rhoden, E.L.; Pereira-Lima, L.; Rhoden, C.L.; Mauri, M.; Zettler, C.G. Análise das alterações histopatológicas dos fígados de ratos pré-tratados com alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2000; 27: 373-377.

Rosidah, Mun Fei Yam; Amirin Sadikun; Mariam Ahmad; Gabriel Akyirem Akowuah; Mohd. Zaini Asmawi. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 123: 244-249.

Tolosa EMC; Rodrigues CJ; Behmer AO; Neto AGF. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*, ed.2 Ed. Manole. São Paulo, 2003, 311p.

Turolla, M.S.R.; Nascimento, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2006; 42: 289-306, 2006.


Vinagre, AS; Rönnau, ADRO; Pereira, SF; Silveira, LU da; Wiiland, E de F; Suyenaga, ES. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 46: 169-177.

World Health Organization. *Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005*. Geneva: World Health Organization. 2002. 74p.

Submission Confirmation for your paper

Entrada x



 **Journal of Ethnopharmacology** jethnoph@chem.leidenuniv.nl
para mim ▾

19 out (3 dias atrás) ★



 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr. Sant'Anna,

Your submission entitled "Ingestion of aqueous extract of Campomanesia xanthocarpa does not produce acute toxicity in rats" has been received by **journal Journal** of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this **journal**.

Kind regards,


Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

A manuscript number has been assigned to your paper


Entrada x



 **Journal of Ethnopharmacology** jethnoph@chem.leidenuniv.nl
para mim ▾

19 out (3 dias atrás) ★



 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr. Sant'Anna,

Your submission entitled "Ingestion of aqueous extract of Campomanesia xanthocarpa does not produce acute toxicity in rats" has been been assigned the following manuscript number: JEP-D-12-02760.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your username is: lianesantariano

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/JEP/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this **journal**.

Kind regards,

Marianne Verberne, Ph.D.
Editorial Office
Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

4. ARTIGO II

***Campomanesia xanthocarpa* reverses hypertension and improves contractility in rats with metabolic syndrome.**

Sant'Anna, LS¹; Santos, KT¹; Bressa, PAC¹; Tietbohl, LC²; Vassalo, DV³; Moreira, CM¹.

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

²*Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil.*

³*Universidade Federal do Espírito Santo Vitória, ES, Brazil.*

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Brazil, which are nowadays strongly associated with metabolic disorders. Metabolic syndrome is the most common of these disorders, it is characterized by the grouping of cardiovascular risk factors such as hypertension, insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance/type 2 diabetes, central obesity and dyslipidemia. In southern Brazil, the *Campomanesia xanthocarpa*, known as guabiroba, has been used empirically because its potential effect in reducing blood cholesterol levels, which was confirmed by Klafke *et al.*, (2010) studying hypercholesterolemic patients. Popular beliefs about the traditional use of leaves tea reveal their use for various diseases, including inflammatory, renal, digestive, among others. Faced with so many needs and potential studies, this investigation evaluated the effects of *C. xanthocarpa* on hemodynamics and cardiac contractility in rats with metabolic syndrome induced by fructose-rich diet. It was used aqueous extract of the leaves of *C. xanthocarpa* prepared by infusion. Animals were treated for 30 days, blood pressure was assessed by direct measurement of carotid and contractility through isometric force generation by papillary muscles of the left ventricle. Biochemical parameters were also evaluated using commercial kits and histology of liver and kidney. The extract was able to reverse the hypertension and tachycardia caused by fructose and cause positive inotropism. It also decreased the levels of triglycerides and increased HDL-cholesterol, without causing any toxicity in renal or hepatic impairment suggesting that it might be a natural alternative for treatment of individuals with metabolic syndrome.

INTRODUCTION

According to the Ministry of Health, in 2009, approximately 300.000 people died of cardiovascular diseases in Brazil. Currently cardiovascular diseases have been strongly associated with metabolic disorders, as aggravating (Ministry of Health, 2011). The metabolic syndrome was initially described as the association of hypertension, dyslipidemia and hyperinsulinemia with hypertriglyceridemia, having insulin resistance action as a common

characteristic. However, it is known that there is a huge range of other changes such as disturbances of coagulation, hyperuricemia and microalbuminuria, all these related to central obesity (Timar *et al.*, 2000). Its worldwide prevalence is uncertain, but is estimated at about 20% to 25% in the general population, increasing in elderly men and postmenopausal women, reaching 42% in individuals older than 60 years (Ford *et al.*, 2002).

Studies have shown that the Brazilian diet has been modified with a tendency to reduce the consumption of vegetables and fruit, and increase in the consumption of simple sugars and therefore of fructose, primarily derived from sucrose (Barreiros *et al.*, 2005). The nutrients contained in the diet are linked to metabolic syndrome. It has been suggested that the consumption of fructose in the diet is an environmental factor that contributes to the development of obesity and abnormalities of metabolic syndrome. In fact a well-known experimental model of metabolic syndrome is the high consumption of fructose; this model leads to hypertension, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and insulin resistance in rats. Fructose is able to produce these effects because it is more lipogenic than glucose and usually causes severe elevations of triglyceride contained in skeletal muscle, causing insulin resistance (Elliot *et al.*, 2002).

The species of *Campomanesia xanthocarpa*, popularly known as guabiroba, is a medicinal plant and native food, found in Rio Grande do Sul. It has been empirically used to reduce blood cholesterol levels, which was confirmed by Klafke *et al.*, (2010) in a study with hypercholesterolemic patients, but also for diseases of the urinary tract, anti-diarrheal and anti-inflammatory. Other studies have also shown the use of guabiroba in weight loss, its effectiveness against diabetes, ulcer and antiplatelet activity, antithrombotic and fibrinolytic (Dickel *et al.*, 2007; Vinagre *et al.*, 2010; Markman *et al.*, 2004 , Klafke *et al.*, 2012). Phytochemical analysis of the extract of the leaves of *C. xanthocarpa* indicated the presence of flavonoids, saponins, tannins and terpenes which could justify these properties (Markman *et al.*, 2004; Klafke *et al.*, 2010).

Even though many popular uses of *C. xanthocarpa*, and there are some scientific evidence of different effects and properties, there is very little information available about this plant as divergent biological properties and mechanisms of action. Since it is reported its use in preventing diseases that may trigger cardiovascular alterations, this study evaluated the possible effects of this plant on this system.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats were used (*Rattus norvegicus*,) 60 days old purchased at the animal house of the Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brazil), kept in appropriate cages in a controlled environment with a temperature between 20 and 22 °C and light 12 hours a day, with water (when not in treatment) and feed *ad libitum*. All procedures performed in this study were in agreement with the International Principles for Research involving Animals (Geneva), and Brazilian law prepared by Law No. 11.794/2008 (Procedures for scientific use of animals) and Decree 24.645/34 (The Animal Rights) being approved by the Ethics Committee on Animal Use of Unipampa under No. 003/2011.

Botanical Material

The collections of leaves from *Campomanesia xanthocarpa* were made in the town of San Marcos, 5th district of Uruguaiana, RS, in October 2010. Botanical identification was performed in Unipampa, Campus Saint Gabriel, where a specimen was deposited in its herbarium.

To prepare the extract, fresh leaves were subjected to a washing with hypochlorite solution at 0.4% for 1 hour, after they were washed under running water for 15 minutes, dried at 37 °C for approximately 72 hours, until they reached a constant weight, keeping humidity below 10% (Klafke *et al.*, 2010). After they were grounded in a slicer, turning into a powder and the aqueous extract was prepared by infusion for 10 minutes, and subsequently cooled, filtered and dried at 40 °C (Vinagre *et al.*, 2010).

Experimental groups

The animals were treated for 30 days and divided into groups of 8 rats each:

Control group: received food and water freely;

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

Fructose group: received 30% of fructose in the drinking water;

Extract+Fructose group: received fructose and extract.

Hemodynamic

To evaluate the extract and fructose effectiveness while having the ability to modify the blood pressure, animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg *ip*) xylazine (10

mg/kg *ip*), the right carotid artery was catheterized and the catheter connected to a pressure transducer (MP150 Biopac Systems, Inc., CA) and measured diastolic blood pressure, systolic blood pressure and Heart Rate.

Biochemistry and Histology

After hemodynamic evaluation, blood was collected for determination of serum glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL, creatinine, urea, AST (aspartate aminotransaminase) and ALT (alanine aminotransaminase), using spectrophotometric methods for enzymatic diagnosis of Labtest kit. The HDL-cholesterol was separated by precipitation of other fractions. Also kidney and liver were collected for histological analysis, performed according to the methodology of Tolosa *et al.*, (2003).

Myocardial Contractility

The hearts were quickly removed and perfused via the aortic stump to allow a proper selection and dissection of the left ventricular papillary muscles. The preparations were mounted in a plexiglass chamber with a volume of 20 mL, containing Krebs-Henseleit solution, comprising: (in mM): 120 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl₂ 6H₂O, CaCl₂ 2H₂O 1.25; NaH₂PO₄ H₂O 2.0; Na₂SO₄ 1.2, NaHCO₃ 27, Glucose 11. To avoid the possibility of hypoxia, the experiments were performed at low temperature (29 ± 1 °C) as previously described (Vassallo *et al.*, 1994) and continually gassed with a carbogenic mixture containing 95% O₂ and 5% CO₂, keeping the pH stable in 7.4.

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

The following parameters were analyzed: isometric force peak (F); activation time (AT), relaxation time (TR); relative potentiation (PPP) obtained after pauses of 15, 30 and 60 seconds; Ca²⁺ concentrations curve of 0.62, 1.25, 2.5, 3.75 mM; rest contractions after pauses of 10 min (PRC) and tetanic contractions stimulated at 10 Hz.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). One-way ANOVA was used and the Tukey post hoc test to compare means when ANOVA was significant. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

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

The fructose group had their serum glucose and triglyceride levels significantly increased, HDL cholesterol and urea decreased. The extract group obtained reduced triglyceride levels compared to control. The group that ingested extract and fructose (extract + fructose) maintained the increased glucose caused by fructose but the triglycerides were reduced to values close to controls (Table 1).

Histological analyses of liver and kidney of the different groups showed no change, indicating the safety of extract ingestion continuously (Figures 1 and 2).

When comparing the initial weights and after 30 days treatment, there was a weight gain between 24 and 48g, having the groups who ingested extract a lower weight increase (Table 2). The groups who drank fructose consumed less food, reaching a reduction of 50% (Table 2).

Blood pressure measurements showed that the treatment with fructose increased both systolic and diastolic pressures by 20 and 30 mmHg, respectively. The treatment with the aqueous extract of *C. xanthocarpa* when administered simultaneously with fructose was able to reverse this increase (Figure 3). Regarding the heart rate, the administration of the extract of *C. xanthocarpa* together with fructose was able to reverse the tachycardia induced by the administration of fructose (Figure 4).

The treatment with extract+fructose doubled the isometric force exerted by the papillary muscles (Figure 5), indicating a potential cardiotoxic effect of the extract in animals with metabolic syndrome.

The groups treated with extract, fructose and extract + fructose presented activation and relaxation times greater than the control group (figure 6).

The protocol for post-pause potentiation was used to assess any possible effect of the extract, fructose and the association of both on the function of the sarcoplasmic reticulum (Mill, *et al.*, 1992; Leite *et al.*, 1991). No changes were observed since the values of pauses of 15, 30 and 60 seconds were similar (figure 7).

The post rest contraction protocol is used to evaluate the permeability of the plasma membrane to calcium. In figure 8 it can be observed no difference in the force developed by various groups.

Calcium plays a crucial role in regulating the phase of contraction and relaxation of cardiac muscle. The increase in the concentration of cytosolic calcium ions causes the interaction of calcium with troponin C that also increases and triggers the contractile process, in other words, the greater quantity of available calcium the greater force of contraction (Libby *et al.*, 2010). In Figure 9 there is an increasing dose-dependent force exerted by the papillary muscles of rats, having the fructose and extract+fructose groups different in all calcium concentrations, and extract and extract+fructose groups only in the two highest concentrations of calcium.

The treatment effect on cardiac contractile proteins was assessed indirectly by tetanic contractions induced by increased frequency of the electrical stimulation in the presence of caffeine. Tetanic tension time course shows an increase in strength occurs (peak) followed by a fall and plateau formation. Figure 10 show that the extract+fructose group doubled its strength relative to the control, both at the peak and in the plateau of tetanic contraction.

DISCUSSION

The results presented here suggest that the extract of *C. xanthocarpa* reverses the high blood pressure, normalize heart rate and cause positive inotropism in rats with metabolic syndrome. It also decreased serum triglycerides and increased HDL-cholesterol levels.

Fructose consumption has been identified as a risk factor for insulin resistance and heart disease independent of body mass index (Stanhope *et al.*, 2009). Experimental models have shown that a diet high in fructose causes disturbances in metabolism homeostasis and induces systemic insulin resistance, among other symptoms of metabolic syndrome in rodents (Barone *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 1994; Mellor *et al.*, 2010 and 2011). The most commonly treatments used for induction of metabolic syndrome in rodents by administration of a diet with high fructose content is 60% in ration and 10% in water for 8 to 12 weeks. However in

this study was used for the first time, a concentration of 30% in water solution for 4 weeks, showing the same efficacy of previous studies.

Among the symptoms of metabolic syndrome stand out the diabetes and dyslipidemia, which confirms that the model with the fructose cause it. It can be observed that glucose and triglycerides of animals that received fructose increased 2 and 4 times, respectively, compared to values from the control group (table 1). Moura *et al.* (2009) compared the methods of inducing metabolic syndrome with a high fructose diet, comparing groups of male Wistar rats fed with diets enriched in 60% fructose and 10% fructose in the drinking water, between 4 and 8 weeks. The group that received fructose in the diet had a significant increase in total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, while the group that drank fructose did not, which made the authors conclude that the administration in the diet would be the best method. However, the model used in this study obtained good results with administration of 30% fructose in water in 4 weeks, whereas animals had a significant increase in glucose levels, indicating a possible onset of diabetes. Barros *et al.* (2007) administered 10% and 20% fructose in water to hamsters for 2 months and obtained approximately 40% increase in glucose at both dosages. In several animal models, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and insulin resistance have been reported with a diet rich in fructose. In the present work there are some differences from those studies, such as the cholesterol levels were not altered while the glucose and triglycerides had an increase in 4 weeks greater than other authors have found, possibly due to higher concentration of fructose on the diet.

Levels of alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST), urea and creatinine were measured to evaluate a possible liver and kidney toxicity caused by the extract and damage from the administration of fructose. It can be observed that treatment with only fructose reduced the urea values (Table 1). According to Pedersen *et al.* (2004), in a study on the effect of fructose on the synthesis of urea, 1 mmol/L of fructose in human blood was able to reduce the capacity for synthesis of urea in 3.6 μmol , an effect that was related to non-insulin dependence of fructose metabolism. The AST values differ in every group from the ones mentioned in the literature as normal, 45-80U/l, however no cell damage was observed in the liver histology slides (Figure 1). AST is an enzyme released in large quantities in the blood when there is damage to the membrane of hepatocytes. However, there is no need of necrosis to occur for AST to be increased, having no established relationship between the damage and the levels of AST (Rhoden *et al.*, 2000).

Usually when a substance is toxic it can affect the liver and kidney, as these are organs of detoxification, causing histological changes as contour cell and nuclei indistinct, vascular

congestion, degeneration and necrosis (Rhoden *et al.*, 2000; Atangwho *et al.*, 2012). To confirm the absence of liver and kidney damage during the treatment, histological analyzes were performed where no cell changes were observed (Figures 1 and 2).

After 30 days of treatment fructose and control groups had a weight increase of 48g, the extract group increased 36g and extract+fructose group 24g (Table 2). Many factors can influence the weight of the animals, such as temperature, feed intake, stress, among others, however considering that the conditions were equally controlled for all groups, it is suspected that the aqueous extract of *C. xanthocarpa* might reduce weight gain. The *guabirobeira* was cited in a study by Dickel *et al.* (2007) as a plant used for weight loss; Biavatti *et al.* (2004) treated rats with a high calories diet, tested the aqueous extract of *C. xanthocarpa* checking weight loss in rats consuming the extract. Vinagre *et al.* (2010) tested the same plant as anti-diabetic and found that the group of diabetic rats had a lower weight gain when treated with the extract. However further studies on this property of *C. xanthocarpa* are needed.

In the group that drunk fructose, the feed intake was 50% lower than the group that drank only water (table 2), which can be attributed to the rapid metabolism of fructose and satiety that it provides (Barreiros *et al.*, 2005). The primary metabolism of fructose is in the liver, its rapid entry into hepatocytes is mediated by GLUT 2 and is independent of insulin and energy expenditure, after fructose is phosphorylated it is split into two trioses that can follow three paths: be part of the glycolytic pathway, be reduced to form glycerol and form glucose (Barreiros *et al.*, 2005). Since fructose intake of these animals was constant, it is believed that the rats have replaced the need to feed by water with fructose.

The use of medicinal plants in the form of teas, infusion, decoction, among others, to fight and/or prevention of hypertension is a very common and ancient practice among world population (Arnous *et al.*, 2005). In the last three decades, a number of efforts have been made to expand the research with plants with hypotensive and antihypertensive therapeutic values, and some of these were validated and refuted (Tabassum and Ahmad, 2011). Among the compounds found in medicinal plants, the flavonoids stand out. Experimental studies *in vitro* and *in vivo* clearly show a protective effect of flavonoids on the cardiovascular system. Such beneficial effects involve the inhibition of the oxidation of low density lipoprotein (LDL), activity antiplatelet and anti-inflammatory, and vasodilating direct hypotensive (Majewska-Czeczot and Wierzbicka, 2012). This study examined the effects of *guabiroba*, on the cardiovascular system in rats with metabolic syndrome induced by the intake of high-fructose. This plant is popularly used to reduce plasma levels of cholesterol and triglycerides, to perform glucose control in case of diabetes and to treat hypertension. However its chemical

composition is not well elucidated, some authors claim that the leaves of *C. xanthocarpa* would have the presence of saponins, tannins, terpenes and flavonoids, the latter being majority (Markman *et al.*, 2004; Klafke *et al.*, 2010).

Treatment results have shown that the aqueous extract of *C. xanthocarpa* presents anti-hypertensive potential. In 30 days it was able to reverse the hypertension induced by fructose consumption by 20 mmHg (Figure 3). Dimo *et al.* (2001), who studied methanolic and aqueous extract of *Bidens pilosa* in hypertensive rats induced by fructose, also achieved a normalization of blood pressure values, however in a 6-week treatment. Ayele *et al.* (2010) worked with a model of hypertension in rats with a clipped renal artery, examined the hypotensive effect of extract of *Syzygium guineense*, species belonging to the same family of plants studied in this work, obtaining a reduction of up to 40 mmHg in a single dose.

The evaluation of myocardial contractility can be performed by isometric force developed by the papillary muscle of the left ventricle of the heart. The amplitude of contraction reflects the amount of force developed by the muscle and the temporal parameters provide information about the kinetics of activation and relaxation of muscle contraction (Vassallo *et al.*, 2008). When myocardial contractility in rats with fructose-induced metabolic syndrome was evaluated, contractile strength of these animals is still preserved. However, when administered along with the aqueous extract of *C. xanthocarpa* the contractile force had a significant increase (Figure 5). This positive inotropic effect caused by the extract in animals with metabolic syndrome requires further study to unravel its mechanisms. Consolini and Sarubbio (2002) investigating the effects of *Eugenia uniflora*, belonging to the Myrtaceae family, in the rat heart by the Langendorff technique observed a positive inotropic effect, which they associate with a β -adrenergic compound present in the plant. Using the same protocol, Nie *et al.* (2012) evaluated the effects of hydroxysafflor, a compound extracted from *Carthamus tinctorius*, a Chinese herb commonly used to treat heart disease, in normotensive and hypertensive rats, where they found an improvement in contractile force due to this compound.

The activation time measures the kinetic processes which increase the amount of activator calcium or affect the myofilament sensitivity to this ion. The relaxation time measures the kinetic processes that remove the calcium from myoplasm. In general this time depends on the ability of the sarcoplasmic reticulum to uptake calcium, especially in rats, in which this organelle is responsible for removing approximately 90% of cytoplasmic calcium during relaxation (Bers, 2002). Thus, since the extract and/or fructose treatment may increase these time parameters and tetanic tension (figure 6 and 10), results suggest that these

compounds are intervening in the myofilament sensitivity and in the activity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Since our results showed no changes in the contraction potentiation for all pause, suggesting the absence of changes in RS when testing PPPs (Figure 7), and time parameters are increased the augmented myofilament sensitivity is likely.

Mellor *et al.* (2012) evaluated the effect of fructose on Ca²⁺ transient in isolated cardiomyocyte in mice, and they verified that the Ca²⁺ transient was lower in fructose groups than control, although the contractile cycle and shortening capacity of these cells were not different, what the authors related to a possible compensatory mechanism.

In post rest contraction protocol (PCR), caffeine treatment and exposure to calcium-free solution aimed at assessing the influx of calcium through the sarcolemma. In cardiac muscle of rats, a decrease in intracellular calcium is dependent on the transport of calcium into the intracellular stores and extrusion through the sarcolemma. Caffeine depletes intracellular calcium by binding to the ryanodine receptor (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995) and exposure to calcium-free solution, facilitate extrusion by sarcolemma calcium (Vassallo *et al.*, 2008). Exposure to extract and/or fructose caused no decrease in calcium influx transsarcolemal measured indirectly by PCR (figure 8).

It is well known increases in extracellular Ca²⁺ results in enhanced calcium influx through L-type Ca²⁺ channels triggering further Ca²⁺ release from Ca²⁺ stores within the SR. This in turn leads to a rise of intracellular free Ca²⁺ culminating in myofilament shortening and cell contraction (Bers and Perez-Reyes, 1999). It was measured the inotropic response to changes in extracellular calcium concentration (0.62 to 3.75 mM). As expected, increases in extracellular Ca²⁺ resulted in a positive inotropic response in all experimental groups, although the interaction between extract and fructose potentiated the positive inotropic effect caused by calcium (figure 9).

The heart muscle has a long action potential (AP). It prevents myocyte undergoes a re-stimulation and tetanization. Therefore, tetanus cannot be achieved under normal conditions, in which it is impossible the fusion of contractions. For this reason, we used caffeine, which depletes calcium from RS for binding to the ryanodine receptors (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994) and increased frequency of electrical stimulation (10 Hz) to produce maximal activation of the contractile machinery of the papillary muscles (Leite *et al.*, 1995).

In the rat myocardium, tetanic contractions obtained after treatment with caffeine are smaller than the contractions in stabilized condition. This suggests that the activation of the contractile machinery in tetanic contractions depends on the sarcolemma calcium entry and maintenance of contraction is dependent on the sensitivity of contractile proteins to calcium

(Leite *et al.* 1995). Only tetanic contractions obtained in preparations of isolated muscles of rats exposed for 30 days to extract and fructose, concurrent, showed increase in peak and plateau tension (Figure 10). This suggests that the interaction between fructose and *C. xanthocarpa* extract might promote a better interaction of contractile proteins.

CONCLUSION

The extract of *C. xanthocarpa* was able to reverse high blood pressure, normalize heart rate and cause positive inotropism, this, probably because it provide a better interaction of contractile proteins. Biochemical parameters indicate that the extract was also able to normalize the serum levels of triglycerides and increased HDL-cholesterol in rats with metabolic syndrome induced by fructose. In normotensive animals the extract does not alter hemodynamic and cardiac parameters. The aqueous extract of *C. xanthocarpa* shown to have anti-hypertensive and cardiogenic activity and may become an herbal alternative for individuals with metabolic syndrome.

REFERENCES

- Arnous, AH; Santos, AS; Beinner, RPC. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, 2005; 6: 1-6.
- Atagwho, I.J.; Ebong, P.E.; Eyong, E.U.; Asmawi, M.Z.; Ahmad, M. Synergistic antidiabetic activity of *Vernonia amygdalica* and *Azadirachta indica*: biochemical effects and possible mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 141: 878-887.
- Ayele, Y; Urga, K; Engidawork, E. Evaluation of *In Vivo* Antihypertensive and *In Vitro* Vasodepressor Activities of the Leaf Extract of *Syzygium guineense* (Willd) D.C. *Phytotherapy. Research.*, 2010; 24: 1457–1462.
- Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim C, Wu X, Yu Y, Amlal H, Seidler U, Zuo J, Soleimani M. Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem*, 2009; 284: 5056–5066.
- Barreiros, RC; Bossolan, G; Trindade, CRP. Fructose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev. de Nutrição*, 2005; 18: 377-389.
- Barros, CMMR; Lessa, RQ; Grechi, MP; Mouço, TLM; Souza, MGC; Wiernsperger, N; Bouskela, E. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *Clinics*, 2007; 62: 327-34.
- Bassani, RA; Bassani, JWN; Bers, DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 1992; 453: 591-608.

- Bassani, JWN; Bassani, RA; Bers, DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology*, 1994; 476: 279-293.
- Bers, DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002; 415: 198-205.
- Bers, DM; Perez-Reyes, E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research*, 1999; 42: 339-360.
- Biavatti, MW; Farias, C; Curtius, F; Brasil, LM; Hort, S; Schuster, L; Leite, SN; Prado, SRT. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 93: 385-389.
- Consolini, AE; Sarubbio, MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 81: 57-63.
- Dickel ML; Rates SMK; Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in POA, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 109: 60-71.
- Dimo, T; Azay, J; Tan, PV; Pellecuer, J; Cros, G; Bopelet, M; Serrano, JJ. Effects of the aqueous and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* leaf on fructose-hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 76: 215-21.
- Elliot, SS; Keim, NL; Stern, JS; Teff, K; Havel, PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 911-922.
- Ford, ES; Giles, WH; Dietz, WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama*, 2002; 287: 356-359.
- Klafke JZ; Silva MA; Panigas TF; Belli KC; Oliveira MF; Barichello MM; Rigo FK; Rossato MF; Santos ARS; Pizzolatti MG; Ferreira J; Viecili PRN. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 127: 299-305.
- Klafke JZ, Arnoldi da Silva M, Fortes Rossato M, Trevisan G, Banderó Walker CI, Martins Leal CA, Olschowsky Borges D, Chitolina Schetinger MR, Noal Moresco R, Medeiros Frescura Duarte MM, Soares Dos Santos AR, Nazário Viecili PR, Ferreira J. Antiplatelet, antithrombotic and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012 : 9547-48.
- Lee MK, Miles PD, Khoursheed M, Gao KM, Moossa AR, Olefsky JM. Metabolic effects of troglitazone on fructose-induced insulin resistance in the rat. *Diabetes*, 1994; 43: 1435-1439.
- Leite, CM; Vassallo, DV; Mill, JG. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1991; 24: 843-846.
- Leite, CM; Vassallo, DV; Mill, JG. Characteristics of titanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1995; 73: 638-643.
- Libby, P; Bonow, PO; Mann, DL; Zipes, DP. Tratado de doenças cardiovasculares. 2010. Elsevier, RJ, 8ª ed., 2v.

- Majewska-Wierzbicka M, Czeczot H. Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Pol Merkur Lekarski*, 2012; 32: 50-4.
- Markman, BEO; Bacchi, EM; Kato, ETM. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 94: 55-57.
- Mellor KM, Ritchie RH, Davidoff AJ, Delbridge LMD. Elevated dietary sugar and the heart: experimental models and myocardial remodeling. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010; 88: 525–540.
- Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LM. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 50: 1035–1043.
- Mellor, KM; Wendt, IR; Ritchie, RH; Delbridge, LMD. Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca^{2+} handling and myofilament responsiveness. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, 2012; 302: 964-972.
- Mill, JG; Vassallo, DV; Leite, CM. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1992; 25: 399-408.
- Ministério da Saúde. Disponível in: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>; acessado em 14/05/2011 às 12:45.
- Moura, RF; Ribeiro, C; Oliveira, JA; Stevanato, E; Mello, MAR. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high fructose ingestion protocols. *British Journal of Nutrition*, 2009; 101: 1178-1184.
- Nie, P; Zhang, L; Zhang, W; Rong, W; Zhi, J. The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 139: 746– 750.
- Pedersen, JH; Alnor, D; Vilstrup, H; Hansen, BA. Effect of fructose on the capacity of urea-N synthesis in rats. *Clinical Nutrition*, 2004; 13: 243-246.
- Rhoden, E.L.; Pereira-Lima, L.; Rhoden, C.L.; Mauri, M.; Zettler, C.G. Análise das alterações histopatológicas dos fígados de ratos pré-tratados com alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2000; 27: 373-377.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*, 2009; 119: 1322–1334.
- Tabassum, N; Ahmad, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn Rev.*, 2011; 5: 30-40.
- Timar, O; Sestier, F; Levy, E. Metabolic syndrome X: a review. *Can J Cardiol*, 2000; 25: 829-834.

Tolosa EMC; Rodrigues CJ; Behmer AO; Neto AGF. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*, ed.2 Ed. Manole. São Paulo, 2003, 311p.

Vassallo DV; Lima EQ; Campagnaro P; Stefanon I; Leite CM; Mill JG. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat rates in various calcium concentrations. *Pharmacology Research*, 1994; 29: 251-260.

Vassallo, DV; Oliveira, EM; Stefanon, I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires, MM; *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008; 435-469.

Vinagre, AS; Rönnau, ADRO; Pereira, SF; Silveira, LU da; Wiiland, E de F; Suyenaga, ES. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 46: 169-177.

Table 1. Biochemical parameters analyzed after 30 days of treatment.

Parameters	Groups			
	Control (C)	Extract (E)	Fructose (F)	Extratc+Fructose (E+F)
Glucose (mg/dL)	129.3±9.1	147.6±4.5	275.3±28.9*	221.7±21.8*
Total Cholesterol (mg/dL)	84.6±5.3	101.4±17.5	91.9±12.0	88.9±6.6
HDL-Cholesterol (mg/dL)	33.5±1.9	47.9±7.0	27.3±2.4*	41.1±3.5§
Triglycerides (mg/dL)	58.2±24.9	23.1±3.0	220.3±20.33*	68.6±17.8§
AST (U/L)	127.1±18.8	161.3±0.01	136.9±17.4	132.3±16.0
ALT (U/L)	67.5±18.3	79.2±15.3	70.9±15.9	99.0±16.0
Ureia (mg/dL)	74.3±5.4	73.6±9.6	46.4±3.1*	68.8±8.9§
Creatinine (mg/dL)	1.36±0.7	1.02±0.05	0.48±0.08	0.73±0.04

*p<0,05 vs C; §p<0,05 vs F. N = 4.

Table 2. Weights of animals before and after 30 days of treatment and average feed intake.

Parameters	Groups			
	Control (C)	Extract (E)	Fructose (F)	Extract+Fructose (E+F)
Initial weights (g)	295±12.3	243±5.2	246±19.0	287±16.2
Final weights (g)	343±12.3	279±7.6	294±23.0	311±19.8
Weight gain (g)	48±8.4	36±9.2	48±4	24±3.7*§
Feed consumption (g)	84±1.8	75±1.4*	39±1.8*	40±1.5*

*p<0,05 vs C; §p<0,05 vs F. N = 4.

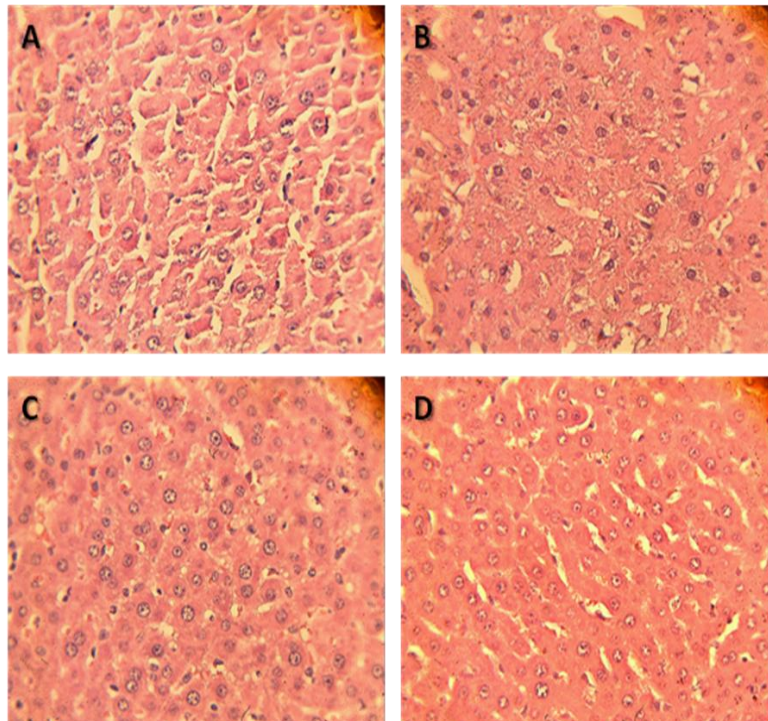


Figure 1. Photomicrograph of histology of liver sections stained with hematoxylin-eosin (HE, X.400). (A) Cut the liver of the control group. (B) Cut the liver of the extract group. (C) Cut the liver of the fructose group. (D) Cut liver of the extract + fructose group. All photos show the normal structure of liver cells.

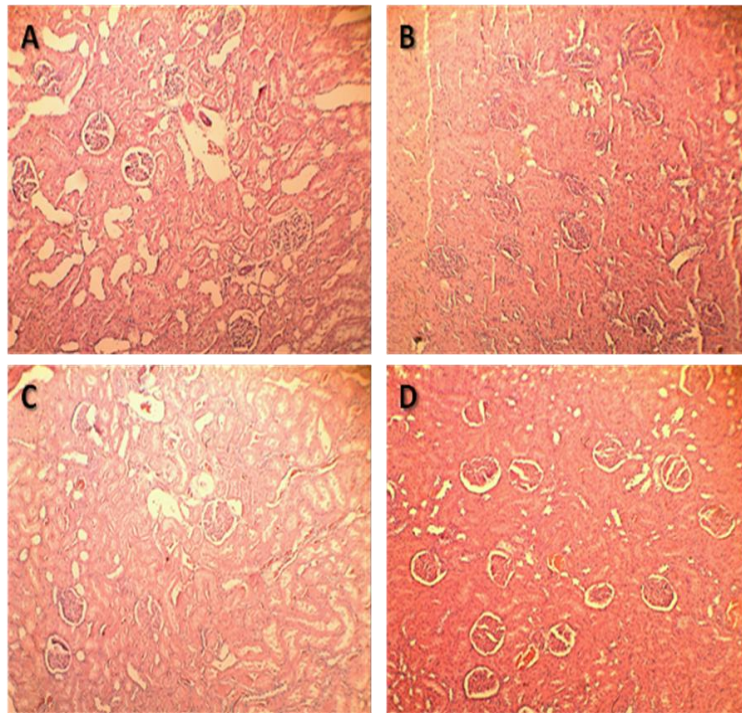


Figure 2. Photomicrograph of histology sections of kidney stained with hematoxylin-eosin (HE, X.100). (A) Cut kidney of the control group. (B) Cut the kidney of the extract group. (C) Cut kidney of the fructose group. (D) Cut kidney of the extract+fructose group. All photos show the normal structure of the renal glomeruli.

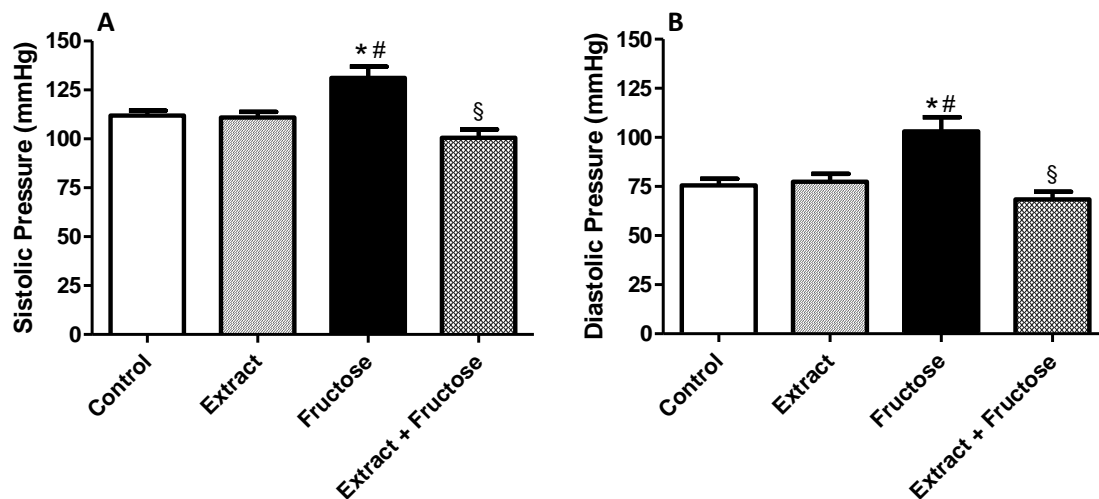


Figure 3. A) Systolic blood pressure of different groups. B) Diastolic blood pressure. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs extract, § $p < 0.05$ vs fructose. N = 8.

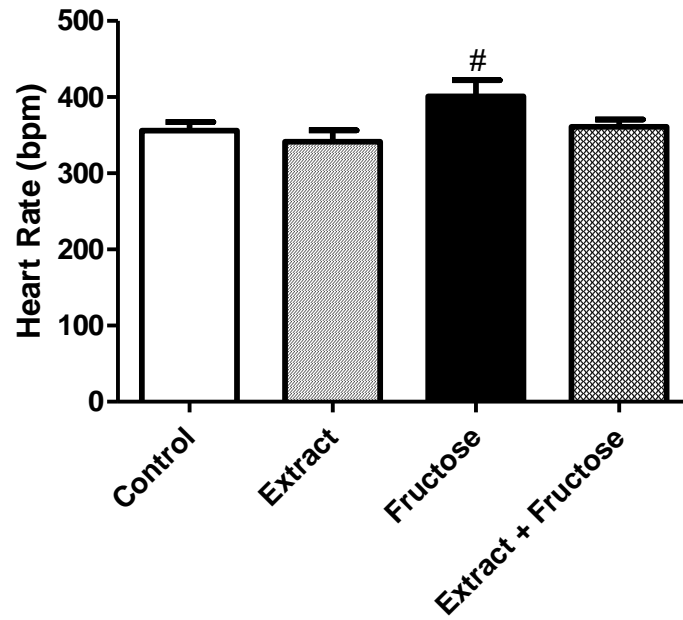


Figure 4. Heart rate of different groups, [#] $p < 0.05$ vs extract. N = 8.

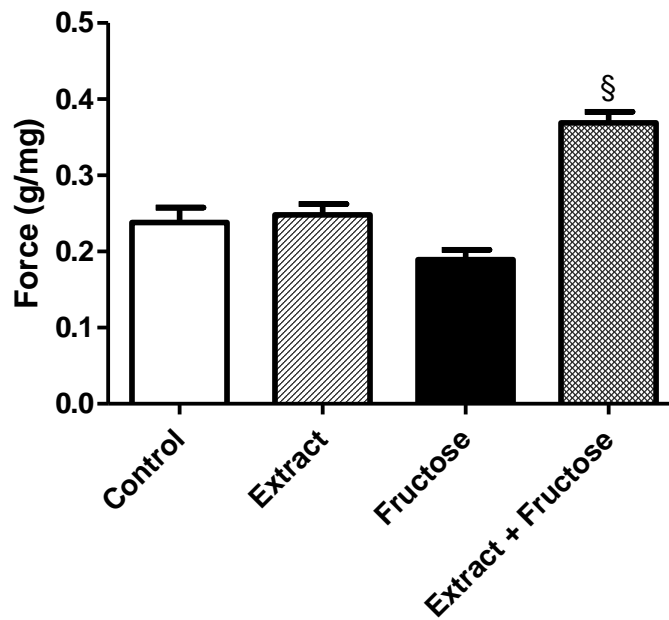


Figure 5. Isometric force by left ventricular papillary muscles of rats. ^{\$} $p < 0.05$ vs fructose. N = 8.

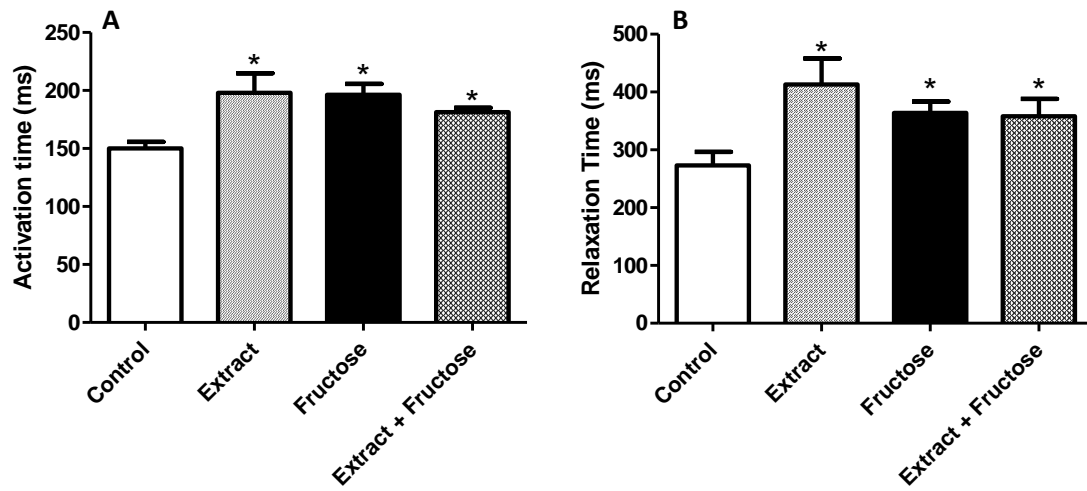


Figure 6. Temporal parameters of LV papillary muscles from rats of different groups. A) Activation time. B) Time of relaxation. * $p < 0,05$ vs Control. N = 8.

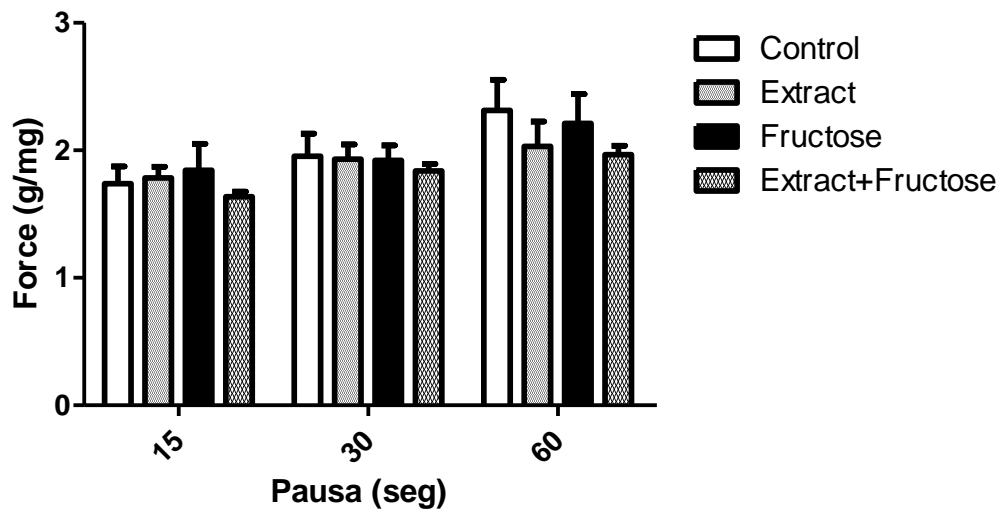


Figure 7. Relative potentiation of the contractions after pauses in electrical stimulation (PPP) of 15, 30 and 60 seconds, in left ventricular papillary muscles from rats of different groups. N = 8.

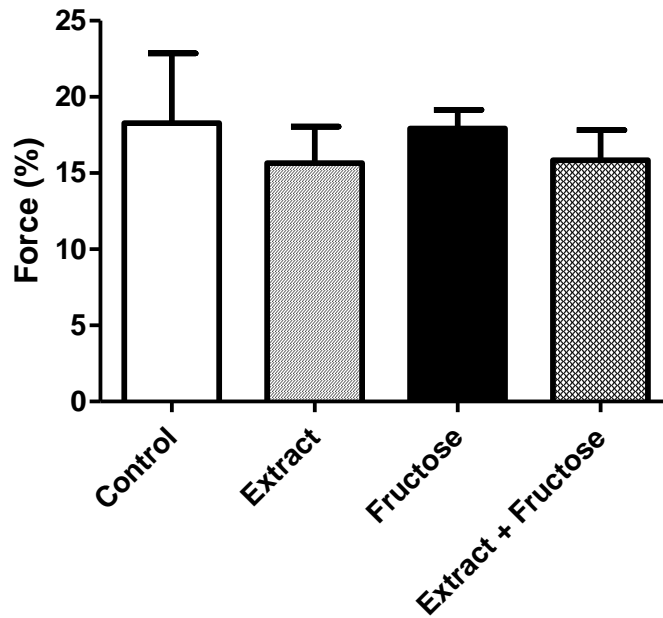


Figure 8. Potentiation on the contractions after pauses in electrical stimulation (PRC) for 10 min in the presence of caffeine and nurturing Krebs solution free of calcium in left ventricular papillary muscles from rats of different groups. N = 8.

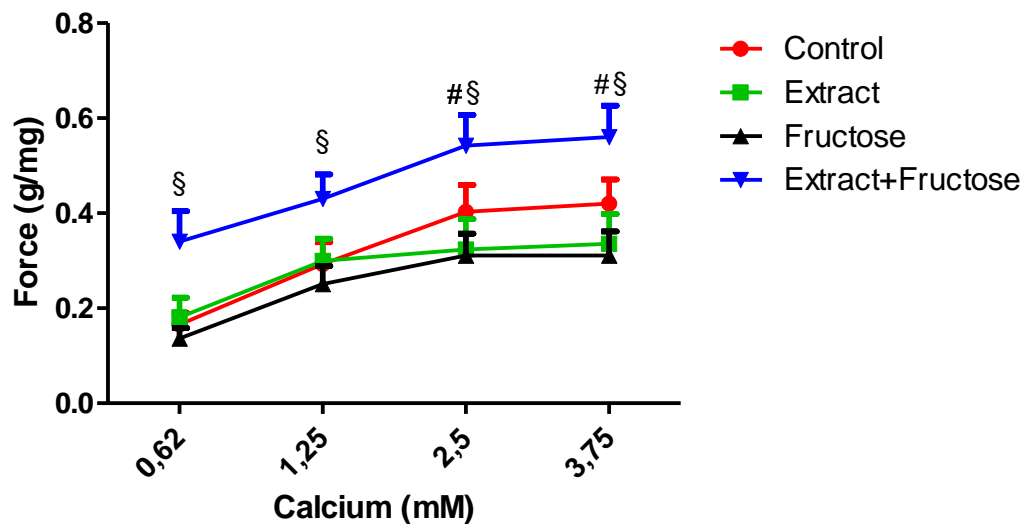


Figure 9. Force developed in different concentrations of calcium, by left ventricular papillary muscles of rats in the different groups. # $p < 0.05$ vs extract; § $p < 0.05$ vs fructose. N = 8.

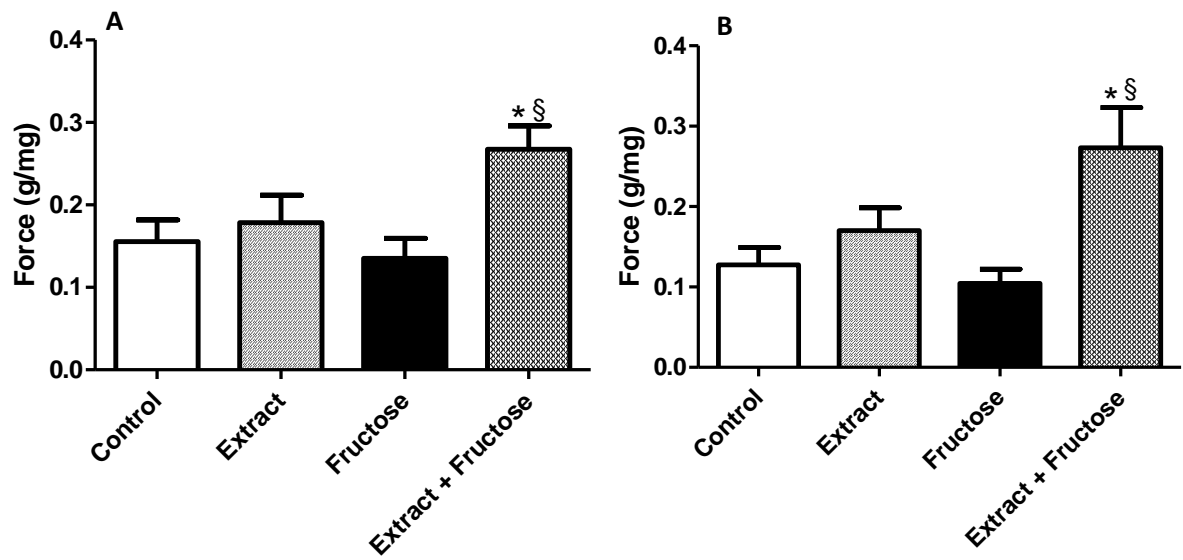


Figure 10. Force developed by tetanic contractions of the left ventricular papillary muscles from rats of different groups A) force developed at the peak of tetanic contractions. B) Force developed on plateaus of tetanic contractions. * $p < 0.05$ vs control, § $p < 0.05$ vs fructose. N = 8.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui sugerem que o extrato de *C. xanthocarpa* reverte a hipertensão, normaliza a frequência cardíaca e causa inotropismo positivo em ratos com síndrome metabólica. O extrato também diminui triglicérideo e aumenta colesterol-HDL. Além disso, este estudo sugere que as folhas de *C. xanthocarpa* não têm toxicidade.

De acordo com Pires *et. al.* (2004), substâncias com valores estimados de DL50 superiores a 5 mg/Kg podem ser consideradas atóxicas e os cálculos decorrentes aos resultados obtidos acima deste valor, imprecisos, sendo assim, os resultados obtidos neste estudo não indicam toxicidade para o extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa*. A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que, atualmente, a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial (Pinto *et al.*, 2002). Por isso é muito importante que haja estudos científicos comprovando a segurança no uso empírico dessas plantas.

A avaliação do *Screening Hipocrático* fornece uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida (Lucio *et. al.*, 2000). A observação de nenhuma mudança no comportamento dos ratos durante 14 dias após administração das doses do extrato pode-se sugerir que não haja efeitos adversos na ingestão do chá das folhas de guabiroba.

Lucio *et al.*(2000) avaliou, através dos mesmos protocolos utilizados neste estudo, a epiisopilosina, um alcaloide derivado de *Pilocarpus microphyllus*, onde a partir de observações do *Screening Hipocrático* pode concluir que este composto reduziu o estado de consciência e disposição dos ratos e ainda em doses superiores a 300mg/kg causou tremores, giros de cabeça, coceira e bater de dentes. Dados que indicaram uma provável atuação da substância na ativação de receptores colinérgicos centrais. Já Pires *et al.* (2004), avaliou a toxicidade aguda de duas espécies de pimenta, *Schinus terebinthifolius* e *Piper nigrum*, concluindo que a toxicidade destas seria maior que 5g/kg por via oral e de 3,5g/kg por via intraperitoneal, sugerindo que a via de administração do extrato pode variar sua dose letal e que a via intraperitoneal seria mais sensível. As observações do *Screening Hipocrático* durante as primeiras 24 horas demonstraram alterações nos parâmetros de estado de consciência e sistema motor muscular, os quais desapareceram após 12h da administração.

A quantificação sérica das enzimas AST e ALT bem como dos metabólitos de excreção, creatinina e ureia são bem utilizados para avaliar as possíveis alterações hepáticas e renais, respectivamente (Rosidah *et al.*, 2009; Mohamed, *et al.*, 2011; Atsamo, *et al.*, 2011).

Para uma confirmação da inexistência de danos hepáticos e renais foram feitas análises séricas de AST, ALT, creatinina, e ureia. Só foi encontrada diferença significativa no parâmetro AST, que é uma enzima liberada em grande quantidade no sangue quando há danos na membrana dos hepatócitos, no entanto não há necessidade de necrose para que haja aumento desta enzima, não havendo uma relação estabelecida entre o dano e os níveis de AST. Neste estudo, embora os valores de AST do grupo 5000 mg/kg aumentaram 2 vezes em relação aos grupos (300, 500, 2000 mg/Kg), não é diferente do controle, e corroborando com este dado, as análises histológicas não revelaram lesão hepática.

Analisando histologicamente os rins não foi observada nenhuma lesão renal, bem como nenhuma diferença nos marcadores bioquímicos renais.

Apesar do uso disseminado de plantas medicinais, as pesquisas que avaliam a toxicidade delas são escassas. Para melhor entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Portanto, o uso pela medicina popular baseado no conhecimento tradicional não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (Turola e Nascimento, 2006).

A dificuldade de encontrar dados na literatura para discussão de resultados de avaliação de toxicidade reforça a necessidade de estudos dessa natureza que trarão grande contribuição para utilização segura desses produtos pela população humana e animal (Almeida *et.al.*, 2009).

Os padrões socioeconômicos e culturais da população vêm sofrendo diversas transformações a partir da segunda metade do século XX, alternando de forma significativa o modo de vida da humanidade. Mas os avanços importantes que contribuíram para melhorar a vida do homem exerceram influências expressivas sobre o processo saúde-doença. O estresse causado pela vida moderna e urbana colabora para o aumento da incidência de várias patologias crônicas, como a obesidade, o *diabetes mellitus* e a hipertensão arterial, as quais frequentemente cursam com alterações nas lipoproteínas plasmáticas e aumento de risco para doenças cardiovasculares (Mendonça e Anjos, 2004; Pozzan *et al.*, 2004).

Dentre os sintomas da Síndrome Metabólica destacam-se o diabetes e a dislipidemia, para confirmar que o modelo com frutose os provocaria e para verificar os efeitos do extrato de *C. xanthocarpa* sobre estes, foram avaliados níveis séricos de glicose, colesterol total,

HDL-colesterol e triglicerídeos. Pode-se observar que a glicose e o triglicerídeos do grupo frutose aumentaram 2 e 4 vezes, respectivamente, comparados com os valores do grupo controle. Moura *et al.* (2009), compararam os métodos de indução de síndrome metabólica com dieta rica em frutose, com grupos de ratos Wistar alimentados com ração enriquecida em 60% de frutose e com 10% de frutose na água de beber, entre 4 e 8 semanas, o grupo que recebeu frutose na ração teve aumento significativo no colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos, enquanto o grupo que bebeu frutose não teve aumento significativo, o que fez os autores concluírem que a administração na ração seria o melhor método. No entanto, o modelo usado neste trabalho obteve resultados bons com administração de frutose 30% na água e no tempo mínimo testado, sendo que os animais obtiveram aumento significativo nos níveis de glicose, apontando um possível início de diabetes. Já Barros *et al.*, (2007) administrou 10% e 20% de frutose na água para hamsters durante 2 meses e obteve cerca de 40% de aumento de glicose em ambas as dosagens. Em vários modelos animais, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia hipercolesterolemia, e resistência à insulina têm sido relatados com uma dieta enriquecida com frutose, no presente trabalho há diferenças destes estudos, possivelmente pela maior concentração e/ou tempo de administração da dieta.

Os níveis de alanina aminotransaminase (ALT), aspartato aminotransaminase (AST), ureia e creatinina foram mensurados para avaliar uma possível toxicidade hepática e renal causados pelo extrato e danos provenientes da administração de frutose. Pode-se observar que o tratamento apenas com frutose diminuiu o valor de ureia. De acordo com Pedersen *et al.* (2004), em um estudo sobre o efeito da frutose na síntese de ureia, 1mmol/L de frutose no sangue humano foi capaz de reduzir a capacidade de síntese de ureia em 3,6 μ mol, efeito que foi relacionado a não dependência de insulina no metabolismo da frutose. Já os valores de AST em todos os grupos diferem-se dos citados na literatura como normal, 45-80U/L, no entanto nas lâminas histológicas de fígado não se observou nenhum dano celular. A AST é uma enzima liberada em grande quantidade no sangue quando há danos na membrana dos hepatócitos, no entanto não há necessidade de necrose para que haja aumento desta enzima, não havendo uma relação estabelecida entre o dano e os níveis de AST (Rhoden *et al.*, 2000).

Uma substância quando tóxica, geralmente poderá afetar o fígado e rim, já que estes são órgãos de metabolização e excreção, respectivamente, ocasionando modificações histológicas como contorno celular e núcleos indistintos, congestão vascular, degeneração e necrose tecidual (Rhoden, *et al.*, 2000; Atangwho, *et al.*, 2012). Para uma confirmação da inexistência de danos hepáticos e renais durante o tratamento, foram feitas análises histológicas onde não foram observadas mudanças na conformação celular.

Após os 30 dias de tratamento os grupos controle e frutose aumentaram o peso em 48g, o grupo extrato 36g e o grupo extrato+frutose 24g, muitos fatores podem influenciar no peso dos animais, tais como temperatura, consumo de ração, estresse, entre outros, no entanto considerando que as condições estavam igualmente controladas para todos os grupos, suspeita-se que o extrato aquoso de *C. xanthocarpa* possa auxiliar na perda de peso. A guabirobeira foi citada em um estudo de Dickel *et al.* (2007) como uma planta utilizada para o emagrecimento pela população, Biavatti *et al.* (2004) tratando ratos com uma dieta rica em calorias, testou o extrato aquoso de *C. xanthocarpa* verificando perda de peso nos animais que ingeriram o extrato. Vinagre *et al.* (2010) testou a mesma planta como anti-diabética e verificou que o grupo de ratos diabéticos teve um menor ganho de peso quando tratados com o extrato. No entanto maiores estudos sobre esta propriedade da *C. xanthocarpa* se fazem necessários.

Nos grupos que beberam frutose, a ingestão de ração foi 50% menor que os grupos que beberam apenas água, o que pode ser atribuído à rápida metabolização da frutose e saciedade que esta proporciona (Barreiros *et al.*, 2005). A metabolização primária da frutose ocorre no fígado, sua rápida entrada no hepatócito é mediada pela GLUT 2 e é independente de insulina e gasto energético, após fosforilada a frutose é cindida em duas trioses que podem seguir três caminhos: participar da via glicolítica, ser reduzida até glicerol e formar glicose (Barreiros *et al.*, 2005). Já que a ingestão de frutose desses animais era constante acredita-se que estes tenham substituído a necessidade de ração pela água com frutose.

O uso de plantas medicinais, na forma de chás, infusão, decocto, entre outras, para o combate e/ou prevenção da hipertensão é uma prática muito comum e milenar entre a população mundial (Arnous *et al.*, 2005). Nas últimas três décadas, uma série de esforços tem sido canalizados para a pesquisa em plantas com valores terapêuticos hipotensores e anti-hipertensivo, sendo algumas destas validadas e outras refutadas (Tabassum e Ahmad, 2011). Dentre os compostos encontrados nas plantas medicinais destacam-se os flavonóides, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostram claramente um efeito protetor dos flavonóides sobre o sistema cardiovascular, tais efeitos benéficos envolvem a inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), atividade antiagregante plaquetária e anti-inflamatória, e ação vasodilatadora hipotensora direta (Majewska-Wierzbička e Czczot, 2012). Neste estudo se avaliou os efeitos da guabiroba, sobre o sistema cardiovascular em ratos com síndrome metabólica induzida pela ingestão de alto teor de frutose, esta planta é popularmente utilizada para diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, tentativa de controle da glicose em caso de diabetes e no combate a hipertensão. No entanto

sua composição química não é bem elucidada, alguns autores afirmam que nas folhas de *C.xanthocarpa* haveria a presença de saponinas, taninos, terpenos e flavonóides, sendo este último majoritário (Markman *et al.*, 2004; Klafke *et al.*, 2010).

Os resultados do tratamento realizado demonstram que o extrato aquoso da *C. xanthocarpa* apresenta potencial hipotensor, em 30 dias foi capaz de reverter a hipertensão induzida pelo consumo de frutose em 20 mmHg. Dima *et al.* (2001), estudando extrato aquoso e metanólico de *Bidens pilosa* em ratos hipertensos induzidos por frutose, também obteve uma normalização dos valores de pressão arterial, no entanto em um tratamento de 6 semanas. Já Ayele *et al.* (2010) trabalhando com um modelo de hipertensão de ratos com um rim clipado, analisou o efeito hipotensor de extrato de *Syzygium guineense*, espécie pertencente a mesma família da planta estudada neste trabalho, obtendo redução de até 40mmHg em uma única dose.

Quando avaliado a contratilidade miocárdica de ratos com síndrome metabólica induzida por frutose, a força apresentou uma tendência a diminuir, no entanto quando administrado concomitante ao extrato aquoso de *C. xanthocarpa* a força contrátil teve um aumento significativo, cujo mecanismo ainda necessita estudo, já que os testes realizados apontam apenas para um aumento no influxo de cálcio. Consolini e Sarubbio (2002) pesquisando os efeitos de *Eugenia uniflora*, pertencente à família Myrtaceae, no coração de ratos através do protocolo de Langendorff, obteve um efeito inotrópico positivo, o qual eles associam a algum composto β -adrenérgico presente nesta planta. Utilizando o mesmo protocolo, Nie *et al.*, (2012) avaliou os efeitos de *hydroxysafflor*, um composto extraído de *Carthamus tinctorius*, uma erva chinesa comumente usada no tratamento de doenças cardíacas, em ratos normotensos e hipertensos, onde encontrou uma melhora na força contrátil devido a este composto.

O tempo de ativação mede a cinética dos processos que aumentam a disponibilidade do cálcio ou interferem na sensibilidade dos miofilamentos a este íon. O tempo de relaxamento mede a cinética dos processos que retiram o cálcio do mioplasma. Em geral este tempo depende mais da capacidade do retículo sarcoplasmático em captar cálcio, principalmente em rato, no qual esta organela é responsável por retirar, aproximadamente, 90% do cálcio citoplasmático durante o relaxamento (Bers, 2002). Desta forma, visto que o tratamento com extrato e/ou frutose pode aumentar estes parâmetros e a tensão tetânica, os resultados sugerem que estes compostos estão interferindo na sensibilidade dos miofilamentos e na atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. Nossos resultados não

mostraram mudanças na potenciação da contração em todas as pausas, sugerindo a ausência de mudanças no RS quando testado o PPP e já que o tempo de ativação e relaxamento foi aumentado uma maior sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio é provável.

Mellor *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da frutose no transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados de ratos, e verificaram que o transiente de cálcio foi diminuído no grupo frutose em relação ao controle, no entanto o ciclo de contratilidade e a capacidade de relaxamento dessas células não foram diferentes, os autores também encontraram um aumento da isoforma alfa da miosina, a qual é relacionada a melhora do mecanismo de contração, tais achados foram relacionados a um possível mecanismo compensatório.

No protocolo de “post rest contraction” (PCR), o tratamento com cafeína e exposição à solução sem cálcio visam avaliar o influxo de cálcio pelo sarcolema. No músculo cardíaco de ratos, a extrusão de cálcio para o meio extracelular é dependente do transporte de cálcio para estoques intracelulares e da extrusão através do sarcolema. A cafeína depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995) e a exposição a solução sem cálcio na sua composição facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (Vassallo *et al.*, 2008). A exposição ao extrato e/ou a frutose não provocou redução no influxo de cálcio transsarcolemal mensurado indiretamente pela PCR.

É conhecido que o aumento do Ca^{2+} extracelular resulta no aumento do influxo de cálcio via canais de Ca^{2+} do tipo L desencadeando ainda mais liberação de Ca^{2+} dos estoques de cálcio do RS. Isto, por sua vez, aumenta o Ca^{2+} intracelular livre culminando no encurtamento do miofilamento e a contração celular (Bers e Perez-Reyes, 1999). Foi medida a resposta inotrópica às mudanças na concentração do Ca^{2+} extracelular (0.62 a 3.75 mM). Como esperado, o aumento no Ca^{2+} extracelular resultou em resposta inotrópica positiva em todos os grupos experimentais, no entanto a interação entre o extrato e a frutose potencializou o efeito inotrópico positivo causado pelo cálcio.

O músculo cardíaco possui um potencial de ação (PA) longo, isso previne que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização. Portanto, o tétano não pode ser obtido em condições normais, nas quais é impossível a fusão das contrações. Por esse motivo, foi utilizada a cafeína, que depleta os estoques de cálcio do RS por ligar-se aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994) e aumento da frequência de estimulação elétrica (10 Hz) para se produzir a ativação máxima da maquinaria contrátil em músculos papilares (Leite *et al.*, 1995).

Em miocárdio de ratos, as contrações tetânicas obtidas após tratamento com cafeína são menores que as contrações em condição estabilizada. Isto sugere que a ativação da maquinaria contrátil nas contrações tetânicas é dependente da entrada de cálcio pelo sarcolema e a manutenção da contração é dependente da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (Leite *et. al.*, 1995). Apenas as contrações tetânicas obtidas em preparações de músculos isolados de ratos expostos por 30 dias a extrato e frutose, concomitantes, apresentaram alterações nos picos e nos platôs dessas contrações características (figura 9). Isso sugere que a interação entre frutose e o extrato de *C. xantocarpa* pode influenciar a interação das proteínas contráteis.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados sugerem que o consumo do extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* não é tóxico;
- O extrato não apresenta efeitos colaterais renais, hepáticos e comportamentais, até a maior dose testada. Portanto, a população pode ter segurança no consumo deste chá até 5g diariamente;
- *C. xanthocarpa* foi capaz de reverter a hipertensão e normalizar a frequência cardíaca em ratos tratados com frutose;
- A guabiroba causou inotropismo positivo, provavelmente por proporcionar uma maior interação das proteínas contráteis;
- Os parâmetros bioquímicos apontam que o extrato também foi capaz de normalizar os triglicerídeos e aumentar o colesterol HDL em ratos com síndrome metabólica induzida por frutose;
- Em animais normotensos o extrato não alterou parâmetros cardiovasculares.
- O extrato aquoso da *C. xanthocarpa* mostrou ter atividade anti-hipertensiva e cardiotônica, podendo se tornar uma alternativa fitoterápica para os indivíduos com síndrome metabólica.

7. REFERÊNCIAS

- Aguilar-Salinas, CA; Rojas, R; Gómez-Perz, FJ; Valles, V; Rios-Torres, JM; Franco, A; Olaiz, G; Rull, JA; Sepúlveda, J; Garcia López, LL; High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Archives of Medical Research*, 2004; 35: 76-81.
- Alexandre RF, Bagatini F, Simões CMO. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Rev Bras Farmacogn*, 2008; 18: 455-463.
- Alice CB; Siqueira NCS; Mentz LA; Brasil e Silva GAA; José KFD. *Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico*, 1995. Ed. Ulbra. Canoas. 211p.
- Almeida, A.C.; Sobrinho, E.M.; Pinho, L.; Souza, P.N.S.; Martins, E.R.; Duarte, E.R.; Santos, H.O.; Brandi, I.V.; Cangussu, A.S.; Costa, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural*, 2009.
- Arnous, AH; Santos, AS; Beinner, RPC. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, 2005; 6: 1-6.
- Atsamo, Albert D.; Télesphore B. Nguelefack; Jacques Y. Datt; Albert Kamanyi. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 134: 697-702.
- Ayele, Y; Urga, K; Engidawork, E. Evaluation of *In Vivo* Antihypertensive and *In Vitro* Vasodepressor Activities of the Leaf Extract of *Syzygium guineense* (Willd) D.C. *Phytotherapy. Research.*, 2010; 24: 1457-1462.
- Ayres, JE. Prevalence of hypertension in the city of Piracicaba. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 1991; 57: 33-36.
- Balbino, EE; Dias, MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20: 992-1000.
- Barbosa, RR; Ribeiro Fl, MR; Silva, IP; Soto-Blanco, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Veterinaria Brasília*, 2007; 1: 1-7.
- Barreiros, RC; Bossolan, G; Trindade, CRP. Frutose em humanos: efeitos metabólicos , utilização clínica e erros inatos associados. *Ver Nutr*, 2005; 18: 377-389.
- Barros, CMMR; Lessa, RQ; Grechi, MP; Mouço, TLM; Souza, MGC; Wiernsperger, N; Bouskela, E. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *Clinics*, 2007; 62: 327-334.
- Bassani, JWN; Bassani, RA; Bers, DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology*, 1994; 476: 279-293.

Bassani, RA; Bassani, JWN; Bers, DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, 1992; 453: 591-608.

Beevers, DG; McGregor, GA. *Hipertensão na prática*. 3^a Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2000.

Bers, DM and Despa S. Cardiac Myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in Normal and Failing Hearts. *J Pharmacol Sci*, 2006; 100: 315 – 322.

Bers, DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002; 415: 198-205.

Biavatti, MV; Farias, C; Curtius, F; Brasil, LM; Hort, S; Schuster, L; Leite, SN; Prado, SRT. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 93: 385-389.

Blaustein, M.P., DiPolo, R e Reeves, JP. Sodium-calcium exchange. Proceedings of the second international conference. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991; 639.

Campeato VR. *Uso de Plantas Mediciniais Durante a Gravidez e Risco para Malformações Congênitas*. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

Capazzo, R; Izzo, AA; Pinto, L; Bifulco, T; Vitobello, C; Mascolo, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 2000; 71: 58-65.

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

Cheeke, PR. *Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2^oed. Danville: Interstate Publishers, 1998; 479p.

Ciolac, EG; Guimarães, GV. Exercícios físico e Síndrome Metabólico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2004; 10: 319-324.

Clark, BA; Alloosh, M; Wenzel, JW; Sturek, M; Kostrominova, TY. Effect of diet-induced obesity and metabolic syndrome on skeletal muscles of Ossabaw miniature swine. *Am.J. Physiol. Endocrinol.Metob*, 2011; 300: 848-857.

Consolini, AE; Sarubbio, MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 81: 57-63.

Cummings BP; Stanhope KL; Grajam JL; Evans JL; Baskin, DG; Griffen SC; Havel PJ. Dietary fructose accelerates the development of diabetes in UCD-T2DM rats: amelioration by the antioxidant α -lipoic acid. *American Journal of Physiology-Regulatory*, 2010; 298: 1343-1350.

Dickel ML; Rates SMK; Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in POA, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 109: 60-71.

Dimo, T; Azay, J; Tan, PV; Pellecuer, J; Cros, G; Bopelet, M; Serrano, JJ. Effects of the aqueous and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* leaf on fructose-hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 76: 215-21.

Dunstan, DW; Zimmet, PZ; Welborn, TA; Courten, MP; Cameron, AJ; Sicree, RA; Dwyer, T; Colagiuri, S; Jolley, D; Knuiman, M; Atkins, R; Shaw, JE. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. The Australian diabetes, obesity and lifestyle study. *Diabetes Care*, 2002; 25: 829-834.

Ford, ES; Giles, WH; Dietz, WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults; findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama*, 2002; 287: 356-359.

Fox, SI. *Fisiologia Humana*. 7ª Ed. Manole, Barueri, SP. 2007, 726p.

Freitas, OC; Carvalho, FR; Neves, JN; Veludo, PK; Parreira, RS; Gonçalves, RM; Lima AS; Bestetti, RB. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2001; 77: 9-21.

Grossman W. Diastolic dysfunction and congestive heart failure. *Circulation*, 1990; 81: III1–III7.

Grundey, SM; Brewer, BJ; Cleeman, JI; Smith, SC; Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 2004; 109: 133-138.

Hashemi, M; Kelishadi, R; Hashemipour, M; Zakerameli, A; Khavarian, N; Ishitani, LH; Franco, GC; Perpétuo, IHO; França, E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. *Ver Saúde Pública*, 2010; 40: 684-691.

Ishitani, LH; Franco, GC; Perpétuo, IHO; França, E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. *Ver Saúde Pública*, 2006; 40: 684-691.

Klafke JZ; Silva MA; Panigas TF; Belli KC; Oliveira MF; Barichello MM; Rigo FK; Rossato MF; Santos ARS; Pizzolatti MG; Ferreira J; Viecili PRN. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 127: 299-305.

Klafke, JZ; Silva, MA; Rossato, MF; Trevisan, G; Walker, CIB; Leal, CAM; Borges, DO; Schetinger, MRC; Moresco, NR; Duarte, MMMF; Santos, ARS; Viecili, PRN; Ferreira, J. Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012; 2012: 9547-48.

Leite, CM; Vassallo, DV; Mill, JG. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1995; 73: 638-643.

Leite, CM; Vassallo, DV; Mill, JG. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1991; 24: 843-846.

Leite, CM; Vassallo, DV; Mill, JG. The effects of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1988; 21: 859-862.

Libby, P; Bonow, RO; Mann, DL; Zipes, DP. *Tratado de doenças cardiovasculares*, 8ª ed. Saunders Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.

Lopes, HF. Hipertensão arterial e síndrome metabólica: além da associação. *Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 2003; 13: 64-77.

Lopes, HF; Martin, KL; Nashar, K; Morrow, JD; Goodfriend, TR; Egan, BM; Dash diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension*, 2003; 41: 422-430.

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

Lucio, E.M.R. de A.; Rosalen, P.L.; Sharapin, N.; Souza Brito, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2000; 9/10: 23-35.

Majewska-Wierzbicka M, Cieczot H. Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Pol Merkur Lekarski*, 2012; 32: 50-4.

Markman, BEO; Bacchi, EM; Kato, ETM. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 94: 55-57.

Mellor, KM; Wendt, IR; Ritchie, RH; Delbridge, LMD. Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca^{2+} handling and myofilament responsiveness. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, 2012; 302: 964-972.

Mendonça, CP; Anjos, LA. Aspectos das práticas alimentares e a atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2004; 20: 698-709.

Mill, JG; Vassallo, DV; Leite, CM. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1992; 25: 399-408.

Mill, JG; Vassallo, DV; Leite, CM; Campagnaro, P. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1994; 27: 1455-1465.

Ministério da Saúde. Disponível in: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>; acessado em 14/05/2011 às 12:45.

Mohamed, Elsnoussi Ali Hussin; Chung Pin Lim; Omar Saad Ebrika; Mohd. Zaini Asmawi; Amirin Sadikun; Mun Fei Yam. Toxicity evaluation of a standardised 50% ethanol extract of *Orthosiphon stamineus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133: 358-363.

- Mohan, V; Shanthirani, S; Deepa, R; Premalatha, G; Sastry, NG; Saroja, R. Intra-urban differences in the prevalence of the metabolic syndrome in southern India – the Chennai Urban Population Study (CUPS No 4). *Diabetic Medicine*, 2001; 18: 280-287.
- Moura, RF; Cambri, LT; Quadros Jr., AC; Nascimento, CMC; Arantes, LM; Sebastião, E; Tanaka, K; Papini, CB; Oliani, MM; Mota, CSA; Ribeiro, C; Melo, MAR. Capacidade aeróbica de ratos alimentados com dieta rica em frutose. *Revista Bras Med Esporte*, 2008; 14: 422-426.
- Mulè, G; Cottone, S; Nardi, E; Andronico, GC; Cerasola. Metabolic syndrome in subjects with essential hypertension: relationships with subclinical cardiovascular and renal damage. *Minerva Cardioangiologica*, 2006; 54: 173-194.
- Mulè, G; Nardi, E; Cottone, S; Cusimano, P. Influence of metabolic syndrome on hypertension-related target organ damage. *Journal of Internal Medicine*, 2005; 257: 503-513.
- Nayler WG, Dunnet J. A possible explanation for the peculiar contractile behavior displayed by rat heart muscle. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, 1975; 5: 171-175.
- Nie, P; Zhang, L; Zhang, W; Rong, W; Zhi, J. The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 139: 746– 750.
- Nobre, F; Lima, NKC; Moura Jr, LA. Hipertensão arterial essencial. In: Porto, CC. *Doenças do coração: prevenção e tratamento*. 7ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998; p.461-471.
- Osweller, GD. *Toxicologia Veterinária*. Artes Médicas, Porto Alegre, 1998; 526p.
- Pedersen, JH; Alnor, D; Vilstrup, H; Hansen, BA. Effect of fructose on the capacity of urea-N synthesis in rats. *Clinical Nutrition*, 2004; 13: 243-246.
- Pessin, JE; Saltiel, AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000; 106: 165-169.
- Pinto, CA; Silva, DHS; Bolzani, US; Lopes, NP; Epitânio, RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, 2002; 25: 45-61.
- Pires, O.C.; Taquemasa, A.V.C.; Akisue, G.; Oliveira, F. de; Araujo, C.E.P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). *Acta Farm. Bonaerense*, 2004; 23: 176-182.
- Pozzan, R; Pozzan, R; Magalhães, MEC; Brandão, AA; Brandão, AP. Dislipidemia, síndrome metabólica e risco cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*, 2004; 17: 97-104.
- Redon, J; Cifkova, R. The metabolic syndrome in hypertension: diagnostic and therapeutic implications. *Current Hypertension Reports*, 2007; 9: 305-313.

Rhoden, E.L.; Pereira-Lima, L.; Rhoden, C.L.; Mauri, M.; Zettler, C.G. Análise das alterações histopatológicas dos fígados de ratos pré-tratados com alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2000; 27: 373-377.

Rosidah, Mun Fei Yam; Amirin Sadikun; Mariam Ahmad; Gabriel Akyirem Akowuah; Mohd. Zaini Asmawi. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 123: 244-249.

Salaroli, LB; Barbosa, GL; Mill, JG; Molina, MGB. Prevalência de Síndrome Metabólica em estudos de base populacional, Vitória, ES – Brasil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2007; 51: 1143-1152.

Salles, GF; Bloch, KV; Cardoso, CR. Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetic Care*, 2004; 27: 1299-1305

Santos, MS; Carneiro, PIB; Wosiacki, G; Petkowicz, CLO; Carneiro, EBB. Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia xanthocarpa* B. (Gabiroba). *Ciências Agrárias*, 2009; 30: 101-106.

Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16: 455-462.

Tabassum, N; Ahmad, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn Rev.*, 2011; 5: 30-40.

Tokarnia, CH; Döbereiner, J; Peixoto, PV. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Helianthus, Rio de Janeiro. 2000; 310p.

Tomazzoni, MI; Negrelle, RRB; Centa, ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto contexto enferm*, 2006; 15: 115-121.

Unger, BS; Patil, BM. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. *Indian J Pharmacol*, 2009; 41: 208-212.

Vasdev, S; Longerich, L; Gil, V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem*, 2004; 37: 1-9.

Vassallo, DV; Mill, JG. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica Latinoamericana*, 1988; 38: 87-97.

Vassallo, DV; Oliveira, EM; Stefanon, I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires, MM; *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008; 435-469.

Veiga Jr, VF; Pinto, AC; Maciel, MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova*, 2005; 28: 519-528.

Vinagre, AS; Rönna, ADRO; Pereira, SF; Silveira, LU da; Wiiland, E de F; Suyenaga, ES. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 46: 169-177.

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

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