

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LISLAINE MARIA KLIDER

AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA E FARMACOLÓGICA DE *Cuphea calophylla*
CHAM. & SCHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

PONTA GROSSA

2019

LISLAINE MARIA KLIDER

AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA E FARMACOLÓGICA DE *Cuphea calophylla*
CHAM. & SHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel

Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

PONTA GROSSA

2019

K65 Klider, Lislaine Maria
Avaliação farmacobotânica e farmacológica de *Cuphea calophylla* CHAM. & SCHATDL. Subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG/ Lislaine Maria Klider. Ponta Grossa, 2019.
70 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração Avaliação Biológica de Produtos Naturais), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparoto Junior

1. *Cuphea calophylla*. 2. Sete-sangrias. 3. Morfoanatomia. 4. Diurese. 5. Hipertensão. I. Budel, Jane Manfron. II. Gasparoto Junior, Arquimedes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD : 615.321



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta



Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 05/2019 DA MESTRANDA LISLAINE MARIA KLIDER REALIZADA NO DIA 27 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e sete dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 14h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Arquimedes Gasparotto Junior reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Lislaine Maria Klider na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelos Professor Doutor Arquimedes Gasparotto Junior(UFGD/MS), demais Doutores (membros titulares): Sinvaldo Baglie (UEPG/PR) e Juliane Nadal Dias Swiech (CESCAGE/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.


O título do trabalho foi: “**AVALIAÇÃO FARMACOTÂNICA E FARMACOLÓGICA DE CUPHEA CALOPHYLLA CHAM. & SCHTDL. SUBSP. MESOSTEMON (KOEHNE) LOURTEIG.**”

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se aprovada a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____


Arquimedes Gasparotto Junior 1 - (MEDICINA - UFGD) Presidente


Sinvaldo Baglie 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular


Juliane Nadal Dias Swiech 3 - (FARMÁCIA - CESCAGE) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de paz e fé que me proporcionou dedicação e sapiência na execução desse trabalho.

Aos meus pais que me capacitaram chegar até aqui com todo amor, cuidado e incentivo.

A minha irmã Luciana pelo amparo e atenção permanente e ao meu irmão Peterson pelo carinho e encorajamento.

Ao meu companheiro Dimas por todo amor, paciência e força depositada.

Ao meu sobrinho João Miguel e ao meu afilhado Davi que tornaram meus dias leves com toda brandura.

Aos meus amigos e familiares pelo carinho e compreensão dos momentos ausentes.

A Camila, Valter e Luciane pela amizade e auxílios da parte botânica desse trabalho.

Aos colegas do mestrado e do PPGCF pelas ajudas e descontração necessárias.

A taxonomista Dra. Taciana Barbosa Cavalcanti pela identificação da espécie de estudo.

A excepcional orientação da Profa. Dra. Jane Manfron Budel pela atribuição deste trabalho tornando minha trajetória no mestrado aprazível.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior pela parceria, ensinamentos e ativa disposição.

Ao grupo do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFGD (Cleide, Aline, Bethânia, Paulo, Rhanany, Lorena e Caio) pela contribuição na avaliação farmacológica desse estudo.

Ao C-Labmu/PROPESP, por possibilitar as análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia de raios X. Em especial a técnica Ana Meri pelo auxílio no processo de liofilização do extrato vegetal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/ UNICENTRO por oportunizar este mestrado.

A todas as mulheres pesquisadoras e cientistas que me inspiram a fazer ciência.

Ninguém na história alcançou algo significativo por si mesmo, por isso agradeço a todos que indiretamente contribuíram com este trabalho.

Dedico este trabalho a um casal. Ambos com ensino fundamental incompleto que me mostraram a importância de ter estudo, que me capacitaram a chegar até aqui e me instigaram a querer saber sempre mais. A meus pais, todo amor!

RESUMO

Cuphea P. Browne é o maior gênero da família Lythraceae, representado por cerca de 260 espécies. Várias espécies de *Cuphea* são utilizadas medicinalmente como anti-inflamatórias, diaforéticas, diuréticas, anti-hipertensivas e cardioprotetoras. *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehe) Lourteig é uma espécie herbácea de crescimento espontâneo que ocorre em campos, bordos de mata, e beiras de estradas no Brasil. Apresenta morfologia similar com outras espécies de *Cuphea*, criando confusões na identificação das espécies. Devido à semelhança morfológica, diferentes espécies conhecidas como sete-sangrias no Brasil são usadas para os mesmos fins terapêuticos. Os principais objetivos do presente trabalho foram i) caracterizar a morfoanatomia de folhas e caules de *C. calophylla* subsp. *mesostemon*; ii) avaliar a segurança em relação a toxicidade do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* (ESCC); e iii) investigar as atividades diuréticas, hipotensoras, vasodilatadoras e antioxidantes do (ESCC) nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Para a análise botânica, o material vegetal foi analisado através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Morfologicamente, *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* apresenta folha de contorno oval, base arredondada, ápice agudo, margem lisa e filotaxia oposta. O pecíolo e caule são cilíndricos. Anatomicamente, a folha é anfiestomática, com epiderme unisseriada e mesofilo dorsiventral com gotículas de óleo. Os estômatos são anomocíticos e diacíticos. Os tricomas são de três tipos: tipo a) glandular, pluricelular e plurisseriado; tipo b) tector, verrucoso e aderido à epiderme e tipo c) tector, pluricelular e unisseriado. A nervura central em seção transversal é ligeiramente côncavo-convexa e o sistema vascular é bicolateral formado por feixe único e central em arco aberto. O caule possui formato circular e epiderme unisseriada. A análise elementar dos cristais indica que são de oxalato de cálcio. Os testes histoquímicos demonstraram a presença de compostos fenólicos, lipofílicos, lignificados e grãos de amido em vários tecidos da planta. Para a avaliação farmacológica o ESCC foi obtido por infusão segundo métodos padronizados com algumas modificações. Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar de 8 a 12 semanas e então realizados os ensaios biológicos. O ESCC (2000 mg/kg) não apresentou efeitos tóxicos agudos estimando-se, portanto DL_{50} acima de 2000 mg/kg. Na avaliação da atividade diurética aguda o ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) não apresentou efeito diurético significativo. No entanto, na diurese prolongada na dose de 30 mg/kg no dia 7 foi possível observar uma diferença significativa. Nos testes da atividade hipotensora, nenhum dos tratamentos foi capaz de promover uma alteração significativa nos níveis de pressão arterial ou frequência cardíaca. O ESCC foi avaliado em relação aos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido, porém não foi observada ação vasodilatadora. Para a avaliação do potencial antioxidante, no tecido cardíaco os grupos tratados com o ESCC nas três doses (30, 100 e 300 mg/kg) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Palavras-chave: *Cuphea calophylla*; sete-sangrias; morfoanatomia; diurese; hipertensão.

ABSTRACT

Cuphea P. Browne is the largest genus of the family Lythraceae, represented by about 260 species. Several species of *Cuphea* are used medicinally and are reported to have anti-inflammatory, diaphoretic, diuretic, antihypertensive and cardioprotective properties. *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig is an herbaceous plant growing naturally in the fields, forest edges and along roadsides in Brazil. It shares similar morphological features with several other species of *Cuphea* creating confusions in the species identification. Due to the morphological similarity, different species known as seven-sangrias in Brazil are used interchangeably for the same therapeutic purposes. The main objectives of the present work were i) to characterize the morpho-anatomy of leaves and stems of *C. calophylla* subsp. *mesostemon*; ii) to evaluate the safety of ethanol-soluble fraction from *Cuphea calophylla* (ESCC) of the taxon in relation to its toxicity; and iii) to investigate the diuretic, hypotensive, vasodilatory and antioxidant effects of ESCC at 30, 100 and 300 mg/kg doses. For the botanical analysis, the plant materials were analyzed by light and scanning electron microscopy. Morphologically, the leaves of *C. calophylla* subsp. *mesostemon* are opposite, ovate in shape with a rounded base, acute apex and smooth margins. The petioles and stems are cylindrical. Anatomically, the leaf is amphistomatic, with uniseriate epidermis and dorsiventral mesophyll containing oil droplets. Two types of stomata, namely anomocytic and diacytic, are present. The trichomes are of three types: a) glandular, multicellular, multiseriate; b) non-glandular, warty, adpressed; and c) non-glandular, multicellular, uniseriate. In cross-section, the midrib is slightly concave-convex in outline and possesses a central beam of bicollateral vascular system in open arch. The stem is circular in shape and covered by a uniseriate epidermis. Elemental analysis of the crystals shows that they are of calcium oxalate. The histochemical tests indicate the presence of lipophilic, lignified, phenolic compounds and starch grains in various tissues of the plant. For the pharmacological evaluation, the ESCC was obtained by infusion using standard methods with some modifications. Male and female Wistar rats of 8 to 12 weeks old were used for biological studies. In the tests for toxicity, the ESCC (2000 mg/kg) showed no acute toxic effects and therefore the estimated LD₅₀ was above 2000 mg/kg. In the evaluation for diuretic activity, the ESCC (30, 100 and 300 mg/kg) did not present significant diuretic effect. However, on prolonged diuresis at the dose of 30 mg/kg on day 7, a significant difference was observed. In the tests for hypotensive activity, none of the treatments was able to promote a significant change in blood pressure levels or heart rate. The ESCC was then evaluated for vasodilator effects in isolated and perfused mesenteric bed, but no vasodilator action was observed. For the valuation of the antioxidant potential, in the cardiac tissue the groups treated with the ESCC in the three doses (30, 100 and 300 mg / kg) presented significant differences in relation to the control group on activity of the superoxide dismutase (SOD).

Keywords: *Cuphea calophylla*; seven-sangrias; morphoanatomy; diuresis; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schtdl. subsp. <i>mesostemon</i> (Koehne) Lourteig. | 17 |
| Figura 2 - Espécies de <i>Cuphea</i> | 17 |
| Figura 3 - Esquema dos efeitos das plantas na patogênese molecular da hipertensão..... | 21 |
| Figura 4 - Morfoanatomia de <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schtdl. subsp. <i>mesostemon</i> (Koehne) Lourteig. | 33 |
| Figura 5 - Anatomia de <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schtdl. subsp. <i>mesostemon</i> (Koehne) Lourteig. | 34 |
| Figura 6 - Espectro EDS de cristais prismáticos (a) e drusa (b) de <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schtdl. subsp. <i>mesostemon</i> (Koehne) Lourteig. | 37 |
| Figura 7 - Histoquímica de <i>Cuphea calophylla</i> Cham. & Schtdl. subsp. <i>mesostemon</i> (Koehne) Lourteig..... | 39 |
| Figura 8 - Vista macroscópica dos órgãos dos animais tratados com o ESCC (2000 mg/kg) ou com o controle (veículo). | 41 |
| Figura 9 - Efeito da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sob o volume urinário produzido nos dias 1, 3, 5 e 7..... | 46 |
| Figura 10 - Efeitos da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratos machos Wistar. | 52 |
| Figura 11 - Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) de ratos machos Wistar. | 53 |
| Figura 12 - Efeitos da administração oral sobrenadante etanólico do infuso de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) na avaliação do potencial antioxidante. | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Peso corporal, ganho de peso corporal, peso relativo de órgãos ingestão de ração e água de ratas tratadas pela via oral com o sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) | 42 |
| Tabela 2 - Efeito da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sobre o volume urinário | 43 |
| Tabela 3 - Efeito da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sobre o pH e densidade em amostras de urina de 4 e 8 horas | 43 |
| Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sobre a excreção de eletrólitos na urina após 4 e 8 horas | 44 |
| Tabela 5 - Efeitos da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sob o pH urinário nos dias 1, 3, 5 e 7 após o início dos tratamentos..... | 47 |
| Tabela 6 - Efeito da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) da densidade sob a densidade urinária nos dias 1, 3, 5 e 7 após o início dos tratamentos | 48 |
| Tabela 7 - Efeito da administração oral do sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sob o volume urinário acumulado e excreção renal de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ | 49 |
| Tabela 8 - Efeitos da administração oral prolongada com o sobrenadante etanólico do infuso obtido de <i>Cuphea calophylla</i> (ESCC) sobre os parâmetros séricos de ratos após 7 dias de tratamento | 50 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 3.1 | FAMÍLIA LYTHRACEAE | 14 |
| 3.2 | GÊNERO <i>Cuphea</i> | 15 |
| 3.3 | <i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq.) J. F. Macbr..... | 16 |
| 3.4 | <i>Cuphea calophylla</i> CHAM. & SCHTDL. subsp. <i>mesostemon</i> (KOEHNE) LOURTEIG | 16 |
| 3.5 | DOENÇAS CARDIOVASCULARES..... | 18 |
| 3.5.1 | Hipertensão arterial sistêmica (HAS) | 18 |
| 3.6 | USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES..... | 20 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 | AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DE <i>Cuphea calophylla</i> CHAM. & SCHTDL. subsp. <i>mesostemon</i> (KOEHNE) LOURTEIG | 23 |
| 4.1.1 | Material botânico | 23 |
| 4.1.2 | Estudo anatômico | 23 |
| 4.1.2.1 | <i>Preparo de lâminas semipermanentes</i> | 23 |
| 4.1.2.2 | <i>Micromedidas</i> | 24 |
| 4.1.2.3 | <i>Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)</i> | 24 |
| 4.1.2.4 | <i>Espectroscopia por dispersão de energia de Raios-X (EDS)</i> | 25 |
| 4.1.2.5 | <i>Testes Histoquímicos</i> | 25 |
| 4.2 | AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE <i>Cuphea calophylla</i> CHAM. & SCHTDL. subsp. <i>mesostemon</i> (KOEHNE) LOURTEIG | 25 |
| 4.2.1 | Preparo do extrato aquoso purificado | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2 | Animais | 26 |
| 4.2.3 | Avaliação da toxicidade aguda..... | 27 |
| 4.2.4 | Avaliação da atividade diurética aguda e prolongada | 28 |
| 4.2.5 | Avaliação da atividade hipotensora..... | 28 |
| 4.2.6 | Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido | 29 |
| 4.2.7 | Avaliação do potencial antioxidante..... | 30 |
| 4.2.8 | Análises estatísticas..... | 30 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DE <i>Cuphea Calophylla</i> CHAM. & SCHTDL. subsp. <i>mesostemon</i> (KOEHNE) LOURTEIG. | 31 |
| 5.1.1 | Estudo anatômico | 31 |
| 5.1.1.1 | <i>Espectroscopia por dispersão de energia de Raios-X (EDS)</i> | 36 |
| 5.1.1.2 | <i>Testes histoquímicos</i> | 37 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE <i>Cuphea calophylla</i> CHAM. & SCHTDL. subsp. <i>mesostemon</i> (KOEHNE) LOURTEIG | 40 |
| 5.2.1 | Avaliação da toxicidade aguda..... | 40 |
| 5.2.2 | Avaliação da atividade diurética aguda e prolongada | 42 |
| 5.2.2.1 | <i>Avaliação da atividade diurética aguda</i> | 42 |
| 5.2.2.2 | <i>Avaliação da atividade diurética prolongada</i> | 45 |
| 5.2.3 | Avaliação da atividade hipotensora aguda..... | 51 |
| 5.2.4 | Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido | 53 |
| 5.2.5 | Avaliação do potencial antioxidante | 54 |
| 6 | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 60 |
| | ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS | 70 |

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a doença circulatória mais prevalente e é comumente associada a alterações metabólicas, que acarretam ao maior risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, insuficiência renal entre outras (WILLIAMS et al., 2004; GODFRAIND, 2006). A HAS gera o aumento dos custos dos sistemas de saúde, afetando a economia mundial. O grande impacto global da hipertensão arterial sistêmica nos serviços de saúde tem levado maior interesse na investigação da eficácia e segurança de drogas anti-hipertensivas baseadas no uso tradicional de produtos naturais nas últimas décadas (VASCONCELOS et al., 2018).

A exemplo disso, o gênero *Cuphea* pertencente a família Lythraceae possui espécies conhecidas popularmente como sete-sangrias (*C. glutinosa* Cham. & Schltld., *C. carthagenensis* (Jacq.) J.F.Macbr., *C. calophylla* Cham. & Schltld. e *C. ingrata* Cham. & Schltld) que são empregadas como anti-hipertensivas, diuréticas, cardioprotetoras, anti-inflamatórias e diaforéticas (REITZ, 1969; KISSMANN; GROTH, 1991; LORENZI; MATOS, 2008; ZAGO et al, 2009; CAVALCANTI; GRAHAM, 2015). Farmacologicamente, atividades cardiovasculares, cardioprotetoras, diuréticas, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias têm sido comprovadas para algumas espécies do gênero (BRAGA et al., 2000; SCHULDT et al., 2000; KREPSKY et al., 2012; PRANDO et al., 2015; BARBOZA et al., 2016; RAMIREZ-ATEHORTÚA et al., 2018).

Cuphea carthagenensis é considerada uma representante de destaque no gênero, pois é uma importante espécie medicinal nativa dos estados do Sul do Brasil e tem atraído a atenção da comunidade científica por seu expressivo uso popular no tratamento da hipertensão, aterosclerose e distúrbios circulatórios (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; BOLSON et al., 2015). Os efeitos benéficos de *C. carthagenensis* têm sido atribuídos à sua capacidade de causar vasodilatação arterial (SCHULDT et al., 2000; KREPSKY et al., 2012; SCHAEGLER et al., 2018), diminuir os lipídios séricos (BIAVATTI et al., 2004) e reduzir o estresse oxidativo em ratos (SCHULDT et al., 2004; PRANDO et al., 2015).

Cuphea calophylla Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig é uma espécie herbácea ruderal de crescimento espontâneo que ocorre em campos, bordos de mata, beiras de estradas e pastagens em todo o Brasil (LUSA; BIASI, 2011). Apresenta morfologia similar com outras espécies de *Cuphea*, sendo no

Brasil utilizada pela população para as mesmas atividades terapêuticas. É considerada espécie afim de *C. carthagenensis* (LORENZI; MATOS, 2008). Na Colômbia é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e essa atividade foi comprovada nos estudos de Ramírez-Atehortúa et al. (2018).

As plantas medicinais nativas utilizadas na medicina popular crescem naturalmente nos diferentes biomas brasileiros e é comum a confusão entre diferentes representantes conhecidos pelo mesmo nome popular e usados indiscriminadamente para a mesma finalidade terapêutica (DEGEN et al., 2005). Incontestavelmente, uma das principais causas de equívocos na identificação de fármacos vegetais é o uso inadequado dos nomes populares. É frequente uma mesma espécie vegetal possuir diversos nomes vulgares e, por outro lado, um nome comum pode designar diversas espécies vegetais (DEGEN et al., 2005; LORENZI, MATOS, 2008).

Considerando o grande impacto da hipertensão nos serviços de saúde em todo o mundo, as confusões na identificação de diferentes espécies de *Cuphea* devido às suas semelhanças morfológicas e ao uso do mesmo nome popular, o objetivo desse trabalho é ampliar o arsenal terapêutico, investigando a eficácia e a segurança de *C. calophylla* como droga anti-hipertensiva, diurética e vasodilatadora; valorizar a cultura local e dar suporte científico ao uso seguro de plantas medicinais e caracterizar anatomicamente as folhas e caules de *C. calophylla* a fim de fornecer subsídios botânicos de identificação e diferenciação das demais espécies de *Cuphea*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação farmacobotânica e farmacológica de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os caracteres morfológicos externos (macroscópicos) e anatômicos (microscópicos) da folha e caule de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*;

Realizar o estudo histoquímico da folha e caule de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* a fim de investigar os grupos metabólicos presentes;

Obter o extrato aquoso purificado das partes aéreas de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*;

Investigar a toxicidade aguda do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*;

Avaliar a atividade diurética aguda e prolongada do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*;

Avaliar a atividade hipotensora do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*;

Investigar a reatividade vascular em leito mesentérico isolado e perfundido do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* subsp. *Mesostemon*;

Avaliar o potencial antioxidante do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* subsp. *Mesostemon*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA LYTHRACEAE

A família Lythraceae pertence à ordem Myrtales e compreende aproximadamente 32 gêneros e cerca de 620 espécies. São plantas de distribuição mundial, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Lythraceae é representada por subarbustos, arbustos, árvores e até plantas aquáticas. Dentre os gêneros de Lythraceae, *Lagerstroemia* L. é descrito como o mais antigo, enquanto que *Cuphea* P. Browne é o mais recente (BARROSO, 1991; ZAGO et al., 2009; VALE et al., 2012; XU; DENG, 2017).

Importantes espécies medicinais de Lythraceae são descritas com inúmeras atividades biológicas. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. demonstrou atividade biológica em um ensaio fitoquímico e antibacteriano, indicando a sensibilidade frente a diferentes bactérias. Além da atividade antimicrobiana, *L. pacari* demonstrou também atividade antioxidante vinculada aos seus constituintes químicos, especialmente compostos fenólicos como os polifenóis e flavonoides. *Lawsonia inermis* L., conhecida popularmente como hena e amplamente utilizada na extração de seu corante possui várias atividades biológicas descritas, como antibacteriana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante. Atividade hepática foi observada através do extrato metanólico das flores de *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz. Os resultados indicaram que o tratamento realizado com o extrato reduziu os efeitos da fibrose hepática crônica (FIRMO et al., 2014; SEMWAL et al., 2014; NITHA et al., 2014; BURQUE et al., 2015).

Outra atividade biológica analisada na família Lythraceae foi no extrato etanólico da casca de *Punica granatum* L. (romã) em que o extrato reduziu significativamente a replicação viral do BoHV-1 Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados. Extratos e frações do gênero *Ammannia* como *A. multiflora* Roxb., *A. baccifera* L., *A. verticillata* (Ard.) Lam. e *A. coccinea* Rottb., apresentaram atividade antiplasmódica significativa, justificando um potente uso no tratamento da malária. Em um estudo realizado no México, que avaliou os efeitos anti-hipertensivos e vasorrelaxantes de *Heimia salicifolia* (Kunth) Link, constatou que a espécie possui efeito vasodilatador dependente da liberação de óxido nítrico

quando administrado em leito mesentérico vascular (UPADHYAY et al., 2013; PALAZZI et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2018).

3.2 GÊNERO *Cuphea*

O gênero *Cuphea* é o maior e um dos mais importantes da família Lythraceae sendo representado por 260 espécies nativas do Brasil, mas não endêmicas, podendo ser encontradas no México e América do Norte (CAVALCANTI; GRAHAM, 2015). Habitam locais úmidos e terrenos pedregosos (GRAHAM; FREUDENSTEIN; LUKER, 2006; BARBER et al., 2010; KREPSKY, 2011).

Apresentam porte herbáceo a arbustivo, são anuais ou perenes e florescem preferencialmente na primavera e no verão (REITZ, 1969; KISSMANN; GROTH, 1991; ZAGO et al., 2009; BARBER et al., 2010).

Há registro de 104 espécies de *Cuphea* no Brasil, sendo que 71 são endêmicas. Em todos os biomas brasileiros podem ser encontradas as espécies registradas do gênero, porém com maior prevalência no Cerrado. Na Serra do Espinhaço em Minas Gerais e na Chapada Diamantina na Bahia é possível verificar uma alta diversidade de espécies de *Cuphea* (KREPSKY et al., 2012; CAVALCANTI; GRAHAM, 2015).

Algumas espécies do gênero são conhecidas popularmente como sete-sangrias e utilizadas na medicina tradicional como diuréticas, anti-hipertensivas, cardioprotetoras, anti-inflamatórias e diaforéticas (REITZ, 1969; KISSMANN; GROTH, 1991; LORENZI, MATOS, 2008; ZAGO et al, 2009).

Quimicamente, espécies do gênero contém flavonoides, a exemplo da ramnetina, isoramnetina, kaempferol, flavonas, triterpenoides, ácidos graxos de cadeia curta e média (ácido caprílico, cáprico, láurico e mirístico) e taninos hidrolisáveis, incluindo elagitaninos (SANTOS et al, 1995; FILICHKIN et al., 2006; ZAGO et al., 2009). Devido a produção de ácidos graxos de cadeia curta e média e óleos fixos, algumas espécies de *Cuphea* podem ser utilizadas na fabricação de detergentes, plásticos e lubrificantes (LUSA; BIASI, 2011).

3.3 *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr

Cuphea carthagenensis é uma espécie medicinal nativa dos estados do sul do Brasil e é considerada a espécie de *Cuphea* de maior destaque devido suas propriedades medicinais. Tem atraído a atenção da comunidade científica por seu expressivo uso na medicina tradicional para o tratamento da hipertensão, aterosclerose e distúrbios circulatórios (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; BOLSON et al., 2015). Dentre as atividades biológicas de *C. carthagenensis*, destacam-se a capacidade de causar vasodilatação arterial (SCHULDT et al., 2000; KREPSKY et al., 2012), diminuir os lipídios séricos (BIAVATTI et al., 2004) e reduzir o estresse oxidativo em ratos (SCHULDT et al., 2004; PRANDO et al., 2015).

3.4 *Cuphea calophylla* CHAM. & SHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

Cuphea calophylla subsp. *mesostemon* é conhecida popularmente como sete-sangrias e apresenta como sinonímia *Cuphea plumbaginea* Mart. De acordo com a etimologia da palavra o termo “*calophylla*” vem do grego *kalós* = lindo e *phyllon* = folha, uma referência à beleza da folhagem, enquanto que “*mesostemon*” relaciona-se com a inserção dos estames, os quais ocorrem na região mediana do tubo floral (FACCO, 2015).

É uma espécie herbácea ruderal de crescimento espontâneo que ocorre em campos, bordos de mata, beiras de estradas e pastagens em todo o Brasil (LUSA; BIASI, 2011). Apresenta distribuição ampla na América do sul (Figura 1), habitando a Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil (Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (CAVALCANTI; GRAHAM, 2015).

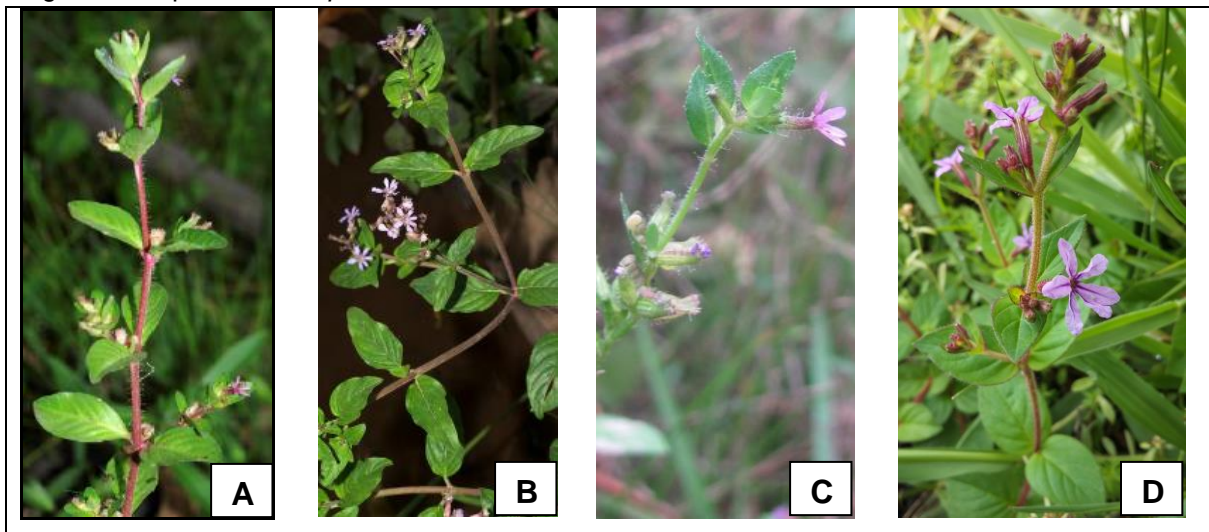
Figura 1 - Distribuição geográfica de *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig



Fonte: GBIF. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/search?q=>>. Acesso em: 03/09/2018.

Possui morfologia similar a outras espécies de *Cuphea*: *C. carthagenensis*, *C. racemosa* e *C. glutinosa* (Figura 2). No Brasil é utilizada popularmente para as mesmas atividades terapêuticas como diurética, anti-hipertensiva e anti-inflamatória (LORENZI; MATOS, 2008). Apesar de *C. calophylla* ser usada com os mesmos fins medicinais de outras espécies de *Cuphea*, não há estudos que comprovem essas atividades farmacológicas. Na Colômbia é utilizada como anti-inflamatório, atividade foi comprovada nos estudos de Ramírez-Atehortúa et al. (2018).

Figura 2 - Espécies de *Cuphea*



Legenda: **A.** *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F.Macbr. **B.** *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng. **C.** *Cuphea glutinosa* Cham. & Schtdl. **D.** *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig. Fonte: Figuras A e B: FACCO, M. G. Estudo taxonômico do gênero *Cuphea* P. Browne (Lythraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Figura C: GBIF. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/search?q=>>. Figura D: a autora.

3.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCVs) abrangem as doenças do coração, doenças vasculares do cérebro e doenças dos vasos sanguíneos. São a principal causa de morte do mundo com cerca de 17,3 milhões de mortes por ano. Podem ser ocasionadas devido a aterosclerose como doença cardíaca isquêmica ou doença arterial coronariana (como exemplo, ataque cardíaco), doença cerebrovascular (como exemplo, acidente vascular cerebral), doenças de artérias (como exemplo, hipertensão arterial). Outras DCVs incluem cardiopatia congênita, doença cardíaca reumática, cardiomiopatias e arritmias cardíacas (WHO, 2011).

No período de 1990 a 2009, foi possível observar uma progressiva redução na mortalidade causada por doenças cardiovasculares no Brasil, entretanto, os dados ainda são alarmantes. Em 2010 ocorreram 326.371 mortes chegando a 383.961 no ano de 2017. Considerando dados atuais do IBGE há uma mudança da estrutura etária do Brasil, a proporção de idosos está aumentando assim como a expectativa de vida do brasileiro, portanto a incidência de doença cardiovascular tende a aumentar. Existem fatores de risco que podem estar relacionados com o progressivo aumento na incidência das mortes por DCVs como o colesterol, tabagismo, sedentarismo, diabetes, estresse e hipertensão. Para isso, é importante a otimização no controle desses fatores de risco (MANSUR; FAVARATO, 2012; SIQUEIRA et al., 2017; SBC 2018).

3.5.1 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica, condição clínica multifatorial, é definida com valores mensurados de pressão arterial sistólica (PAS) maiores ou igual a 140 mmHg e de pressão arterial diastólica (PAD) maiores ou igual a 90 mmHg. Porém, com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75 mmHg já ocorre o aumento progressivo da mortalidade por doença cardiovascular (SBC, 2018).

A doença é caracterizada como o nível de pressão arterial em que os benefícios da terapia (farmacológico ou não) superam os riscos do tratamento. Além disso, estudos clínicos apontam que através da detecção, do tratamento e do controle da hipertensão há uma importante redução de eventos cardiovasculares. A exemplo disso, um estudo de coorte observacional internacional mostra que os

níveis elevados de HAS se relacionam ao aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos com hipertensão e doença arterial coronariana (SBC, 2018; PETIOT et al., 2016; ESC, 2018).

A prevalência global da hipertensão foi estimada em 2015 com 1,13 bilhões de casos, sendo 30 a 45% prevalentes nos adultos, 20 e 24% em mulheres e homens respectivamente. A alta predominância da doença não possui relação com status de renda, mas se torna gradualmente mais frequente com o aumento da idade, com prevalência maior de 60% em indivíduos com mais de 60 anos. O número de hipertensos tende a aumentar de 15 a 20% em 2025 chegando próximo a 1,5 bilhão de casos (ESC, 2018).

A HAS é classificada em dois tipos: hipertensão primária ou essencial e hipertensão secundária. A hipertensão secundária ocorre em menor proporção e atinge de 5 a 10% de indivíduos hipertensos. Decorre de causas identificáveis como diabetes e danos renais, dessa forma tem maior possibilidade de ser tratada. Por outro lado, a hipertensão primária possui maior proporção de acometimentos (90 a 95%) sendo causada por múltiplos fatores como idade, dieta e estilo de vida. Como não possui causa definida, esse tipo de hipertensão se torna mais difícil de ser identificada. A hipertensão também pode ser classificada com a medida casual no consultório podendo chegar a 3 estágios, instalada no primeiro estágio a partir de 140 mmHg de PAS e 90 mmHg de PAD. O terceiro estágio ocorre em valores maiores ou iguais a 180 mmHg de PAS e 110 mmHg de PAD (AL DISI et al., 2016; SBC 2018).

Medidas podem ser adotadas para que a HAS seja prevenida ou adiada. Na hipertensão primária, mudanças no estilo de vida como hábitos alimentares e prática de exercício físico são recomendadas, logo atuam também na redução de eventos cardiovasculares. A prevenção da HAS ocorre desde a infância e adolescência, por meio da alimentação saudável, baixo consumo de sódio e adequada ingestão de potássio. Para os adultos e idosos outras medidas além dessas também podem ser contidas como controle na ingestão de álcool, tabagismo e controle do peso corporal. Na hipertensão de longa duração, na grave e até mesmo em hipertensão menos grave pode ocorrer danos em órgãos alvo. Os danos são determinados devido a alterações na estrutura ou função das artérias ou órgãos decorrentes do aumento de pressão arterial. Tais danos auxiliam como marcador de DCV pré-clínica ou até mesmo assintomática. Para isso, é fundamental que se tenha controle da

HAS com tratamento, pois além de evitar o progresso de DCVs, a terapia pode impedir que órgãos alvo sejam lesionados (ESC, 2018; SESA/PR, 2018).

A pressão arterial é o resultado do débito cardíaco pela resistência vascular periférica, conseqüentemente os fármacos utilizados para reduzir a pressão arterial, terão como ação a redução do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. O tratamento farmacológico da HAS tem como objetivo não somente diminuir os valores da pressão arterial, assim como diminuir os eventos cardiovasculares. A terapia medicamentosa abrange principalmente diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina (BRA II) e antagonistas dos canais de cálcio (ACC), dentre os quais podem ser utilizados isolados ou em associações. Os diuréticos, por exemplo, são empregados para regular o volume dos líquidos corporais, atuando no aumento da excreção de sódio (natriurese) e do fluxo urinário, no entanto apresentam efeitos adversos como disfunção erétil, indução de hiperuricemia desencadeando a gota, hiponatremia, hipercalcemia e depleção de potássio podendo desenvolver arritmias ventriculares. (GOODMAN & GILMAN, 2010; SBC, 2018).

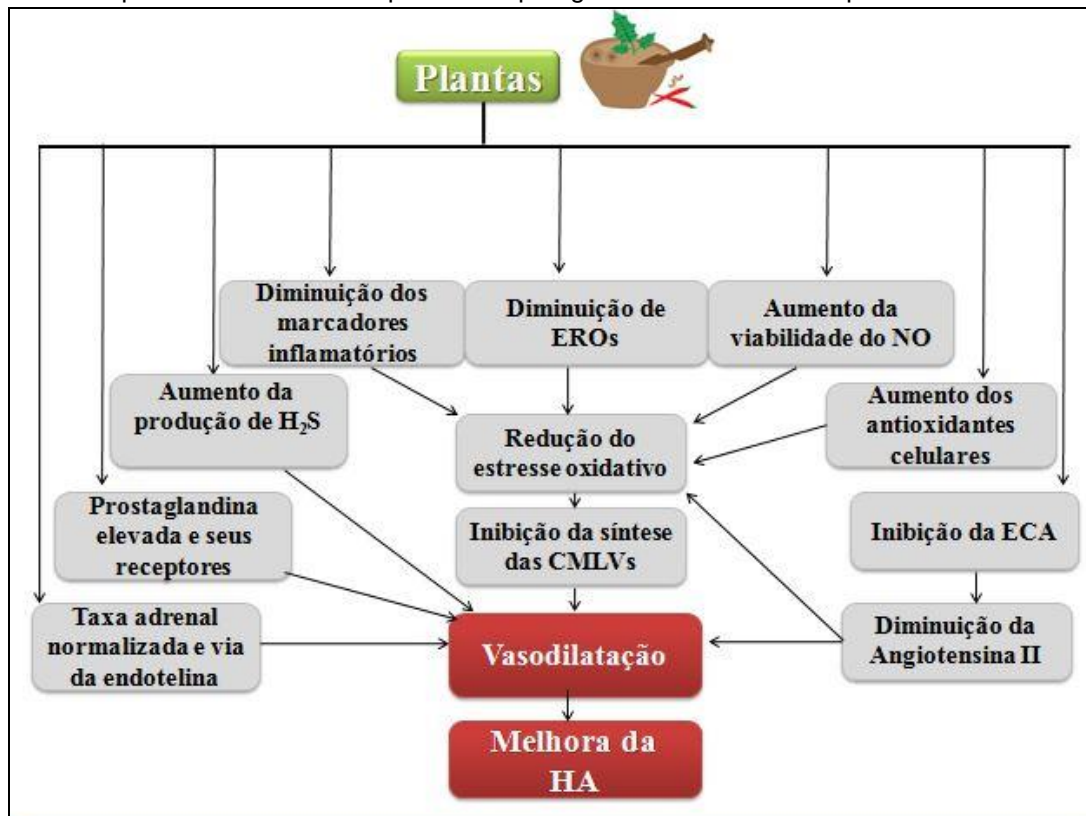
Apesar do tratamento farmacológico na hipertensão arterial ser bem elucidado, a doença apresenta baixa adesão ao tratamento farmacológico. As causas da baixa adesão são variadas, relacionadas às características da doença crônica, bem como a predominância da condição assintomática, ou características ligadas ao fármaco, devido aos efeitos adversos, maior custo econômico, complexidade de dosagem e acesso ao medicamento. Levando isso em consideração, muitos pacientes hipertensos buscam alternativas para o tratamento da HAS como remédios a base de plantas (AL DISI et al., 2016; SABIO, 2018).

3.6 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Nos últimos anos, o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças, aumentou significativamente. O que pode ser explicado devido a menor ocorrência de efeitos colaterais e menor custo. A ação das plantas no organismo fundamenta-se pelos componentes bioativos presentes, os metabólitos secundários, que exercem ações terapêuticas conhecidas (HERNÁNDEZ et al., 2016; AL DISI et al., 2016).

A patogênese da hipertensão, a nível molecular, desenvolve-se a partir de vários mecanismos como a mediação da célula muscular lisa vascular (atua no aumento da resistência periférica reduzindo diâmetros arteriais), células endoteliais (importante na homeostase cardiovascular), moléculas de sinalização (espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, sulfato de hidrogênio, angiotensina II, fator nuclear kappa B). Paralelamente a isso, os metabólitos bioativos das plantas medicinais podem atuar regulando esses mecanismos conforme esquematizado na Figura 3 (AL DISI et al., 2016).

Figura 3 - Esquema dos efeitos das plantas na patogênese molecular da hipertensão.



Legenda: (CMLVs: células do músculo liso vascular; ECA: enzima conversora de angiotensina; EROs: espécies reativas de oxigênio; H₂S: sulfeto de hidrogênio; HA: hipertensão arterial; NO: óxido nítrico).
 Fonte: adaptado de AL DISI, S. S, ANWAR, M. A, EID, A. H. Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action: Part I. *Frontiers in Pharmacology*, v.6, p.323-333, 2016.

Diversos estudos têm mostrado o emprego de plantas medicinais na hipertensão e nas DCVs. Em uma pesquisa realizada na Índia com o extrato hidro-metanólico de sementes de *Coriandrum sativum* L. (coentro) foi possível atestar o potencial cardioprotetor devido ao alto conteúdo de polifenóis nas sementes. Em outro estudo recente, o extrato de *Allium sativum* L. (alho) foi capaz de diminuir os efeitos da

insuficiência renal crônica induzida por gentamicina. O extrato de alho atuou no controle da atividade cardíaca de $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$, no nível de Ca^{+2} , na redução da hipertrofia cardíaca e pressão arterial além de demonstrar melhora no sistema antioxidante cardíaco. Outro vegetal de alvo científico é *Crataegus crenulata* (Roxb. ex D.Don) Roxb., encontrado nas montanhas do Himalaia, no qual os frutos são ricos em bio-flavonoides sendo atualmente considerado um tônico cardíaco, fortalecendo os músculos cardíacos e regulando o fluxo sanguíneo (DIPAK et al., 2012; NEGI et al., 2018; GOMAA et al., 2018)

Cuphea carthagenensis que possui flavonoides, proantocianidinas e taninos na composição química evidenciou efeito vasorrelaxante e atividade anti-aterosclerótica, diminuindo e prevenindo lesões, podendo assim ser utilizado no tratamento de dislipidemias além das afecções cardíacas (KREPSKY et al., 2012; BARBOZA et al., 2016)

Cuphea glutinosa Cham. & Schltdl demonstrou inibição de atividade de Na^+ , $\text{K}^+ \text{ATPase}$ além de propriedades antioxidantes. Possui grande quantidade de compostos polifenólicos, como β -sitosterol-3-O- β -glicosídeo, kaempferol, quercetina, isoquercetina, éster metílico de ácido gálico e ácido gálico compostos que conferiram a inibição da Na^+ , $\text{K}^+ \text{ATPase}$ e portanto aumento de Ca^{+2} intracelular fortalecendo assim a contratilidade cardíaca (ZAGO et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DE *Cuphea calophylla* CHAM. & SCHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

4.1.1 Material botânico

Foram coletadas partes vegetativas aéreas de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*. A coleta aconteceu no município de Curitiba – PR (24° 18' S e 49° 37' N), o material vegetal foi submetido à confecção de exsicata sob o número de registro 101547, identificado pela taxonomista Dra. Taciana Barbosa Cavalcanti e depositado no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF. O acesso ao patrimônio genético *Cuphea calophylla* foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SISGEN) e está registrado sob o número A3B666C. O material coletado foi devidamente processado para a realização do estudo farmacobotânico e farmacológico.

4.1.2 Estudo anatômico

Para a realização do estudo anatômico, foram utilizadas as folhas e caules frescos de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*. O material vegetal foi fixado em FAA 70 (formol: ácido acético glacial: etanol a 70% na proporção 5:5:90) (JOHANSEN, 1940) e estocados em solução de etanol a 70 % (WOSCH et al., 2015).

4.1.2.1 Preparo de lâminas semipermanentes

Foram produzidas lâminas semipermanentes, a partir de secções transversais e longitudinais, à mão livre das folhas e caules *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*. Utilizou-se a dupla coloração com fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1972). As secções coradas foram montadas em lâmina de vidro com glicerina diluída a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor. As lâminas semipermanentes foram confeccionadas no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para a análise das características epidérmicas das folhas, as mesmas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (alvejante doméstico) até ficarem translúcidas. As amostras foram então lavadas com água e coradas com safranina.

As fotomicrografias foram preparadas usando microscópio Nikon E600 equipado com sistemas de câmera Nikon DSFiv e software de imagem Nikon Elements (Nikon Inc., Tóquio, Japão).

Foi utilizado o Microscópio de fluorescência (Nikon E600) para estudar os componentes fluorescentes, como corpos oleosos. Elementos birrefringentes como cristais de oxalato de cálcio foram observados usando um microscópio polarizado (Nikon E600 POL). Ambos os microscópios foram equipados com sistemas de câmeras Nikon DSFiv e Nikon Elements (Nikon Inc., Tóquio, Japão). Essas análises foram conduzidas no Laboratório de Microscopia da Universidade do Mississippi, Oxford, USA.

4.1.2.2 *Micromedidas*

Estudos quantitativos dos estômatos foram realizados por meio de 20 medidas de espécimes múltiplas de folhas. O índice estomático (IE) foi calculado utilizando a seguinte fórmula em que S= número de estômatos por unidade de área, e E= número de células epidérmicas (incluindo tricomas) na mesma unidade de área.

$$IE = \frac{S}{E + S} \times 100$$

O comprimento e a largura dos estômatos foram medidos a partir de 20 estômatos em diferentes locais da lâmina foliar para cada espécie, para determinar o tamanho médio dos estômatos. As micromedidas foram conduzidas no Laboratório de Microscopia da Universidade do Mississippi, Oxford, USA, utilizando o microscópio Nikon E600 equipado com sistemas de câmera Nikon DSFiv e software de imagem Nikon Elements (Nikon Inc., Tóquio, Japão).

4.1.2.3 *Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)*

O material vegetal foi submetido a análise ultraestrutural de superfície através de microscopia eletrônica de varredura (SOUZA, 1998). As amostras foram fixadas

em FAA 70 e desidratadas em série etanólica crescente. Após montagem em suporte e no equipamento, realizou-se a metalização com ouro do material vegetal em aparelho Quorum SC7620 a fim de tornar as amostras condutivas. A análise de microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo foi realizada com o equipamento Tescan Mira 3 (Oxford Instruments, Oxford, UK) em alto vácuo com voltagem de aceleração de 15 kV.

4.1.2.4 *Espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS)*

Foram executadas microanálises químicas por EDS acoplado ao FEG para análise da forma e da natureza química dos cristais. Os ensaios foram amostrados aleatoriamente nos cristais e em células sem cristais (controle), sob mesmas condições de operacionalidade para a captura das eletromicrografias (SILVA, 2014).

Para realização da metalização, FEG e EDS, o material foi analisado no Laboratório Multiusuários (LABMU), na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.1.2.5 *Testes histoquímicos*

Foram realizadas secções transversais à mão livre do material vegetal utilizando os seguintes reativos: solução de floroglucina/HCl para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudam III para lipídios, cutina e suberina (SASS, 1951), cloreto férrico e dicromato de potássio para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), solução de iodo a 2% para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e azul de metileno 0,1% para a pesquisa de mucilagem. Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias em microscópio fotônico Olympus CX31 acoplado à máquina fotográfica Olympus C7070.

4.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Cuphea calophylla* CHAM. & SCHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

Todos os experimentos destinados a avaliação da atividade farmacológica e toxicológica de *C. calophylla* subsp. *mesostemon* foram realizados no laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sob orientação do professor Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

4.2.1 Preparo do extrato aquoso purificado

O sobrenadante etanólico foi obtido por infusão da planta inteira, segundo preconizado pelo uso popular (LORENZI; MATOS, 2008) com algumas modificações. Submeteu-se a droga vegetal seca e moída (100 g) ao processo de extração por infusão com 1L de água fervente. A extração foi realizada até que o meio de extração atingisse a temperatura ambiente. O resíduo foi separado por filtração e concentrou-se o extrato obtido em evaporador rotatório até um volume de 200 mL. O produto final obtido foi tratado com 600 mL de etanol para a precipitação das proteínas e polissacarídeos, obtendo-se um precipitado etanólico do infuso (PEI) e um sobrenadante etanólico do infuso (ESCC). O ESCC obtido foi liofilizado e armazenado em freezer até posterior análise.

4.2.2 Animais

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar de 8 semanas para a avaliação da toxicidade e ratos machos para a investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido. Para a avaliação da atividade diurética aguda e prolongada e da atividade hipotensora foram utilizados ratos machos de 12 semanas. Os animais foram provenientes do biotério central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O acondicionamento foi em gaiolas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), com cama de maravalha esterilizada, livre acesso a comida e água e em condições padrão de temperatura (22 + 2°C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas. Para os diferentes protocolos experimentais, o número de animais por grupo foi de 5-6 indivíduos. A escolha dos ratos como espécie a ser utilizada nesta pesquisa baseou-se em trabalhos desenvolvidos por Kau et al. (1984) e Gasparotto Junior et al. (2009) que caracterizam o rato como um bom modelo para o estudo e desenvolvimento de drogas anti-hipertensivas e diuréticas.

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram, primeiramente, submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Federal da Grande Dourados. Todos os procedimentos a serem executados apresentam grau de invasividade 1 e estão de acordo com as Diretrizes

Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA).

4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda

Este ensaio foi realizado de acordo com o guia 425 (OECD, 2008), o qual preconiza duas doses para o teste: 2000 mg/kg e excepcionalmente 5000 mg/kg. Como essa avaliação não possui necessidades específicas, administrou-se por via oral (gavagem) 2000 mg/kg do ESCC. Foram utilizados ratos fêmeas seguindo o Guia 425 (OECD, 2008), o qual menciona que pesquisas bibliográficas de testes convencionais de LD₅₀ apontam pouca diferença na sensibilidade entre os sexos porém, quando observadas diferenças as fêmeas apresentam uma maior sensibilidade. Portanto, foram utilizadas 10 ratos fêmeas da linhagem Wistar, as quais foram divididas em dois grupos com 5 ratas em cada: grupo controle, o qual recebeu 1 mL/100 g de água (veículo) e o grupo tratado recebendo a dose de 2000 mg/kg do extrato. Os animais permaneceram em jejum durante 6 horas antes da administração dos extratos, com livre acesso apenas para a água. A ingestão de ração foi permitida 2 horas após a administração do extrato.

Cada animal foi avaliado por 14 dias, contando a partir do dia que recebeu a dose única do extrato. Letalidade, peso corporal, consumo de água e ração foram mensurados diariamente. O comportamento dos animais foi diariamente observado segundo o screening hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Os animais fêmeas foram analisados quanto a atividades do sistema nervoso central (SNC) estimulantes (hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, piloereção, movimento intenso das vibrissas e outras) e atividades depressoras (hipnose, ptose, sedação, anestesia, ataxia, reflexo do endireitamento, catatonia, analgesia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e perda do reflexo auricular). Outros comportamentos também foram analisados como ambulação, bocejo excessivo, limpeza, levantar, escalar, vocalizar, sacudir a cabeça, contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior e garra. As atividades eram avaliadas de 0 a 4 quanto à intensidade dos movimentos (OCDE, 2008a).

No 15^o dia, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de Isoflurano em câmara com saturação (acima de 20%), obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2015) e a resolução no 1000/2012 do CFMV. Foi

confirmada a morte pela análise dos sinais vitais e reflexo corneal. Os órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço, rim, útero e ovário) foram removidos, pesados e avaliados macroscopicamente.

4.2.4 Avaliação da atividade diurética aguda e prolongada

A atividade diurética foi determinada segundo métodos previamente descritos (Kau et al., 1984) com algumas modificações. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas. Durante o período do jejum, os animais tiveram livre acesso a água. Uma hora antes do início do experimento, todos os animais receberam através da gavagem uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 mL/100g) para impor uniformidade corporal de sal e água. Para estes protocolos os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais e submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1) Controle negativo (n=6): animais tratados pela via oral (gavagem) com uma dose única do veículo (água filtrada) em um volume de 5 mL/kg;
- 2) ESCC (n=6): animais tratados pela via oral (gavagem) com três diferentes doses do ESCC (30, 100 e 300 mg/kg);
- 3) Controle positivo hidroclorotiazida (HCTZ) (n=6): animais tratados pela via oral (gavagem) com uma única dose de HCTZ (25 mg/kg).

Após os tratamentos, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas. Na avaliação da diurese aguda (4 e 8 horas) e diurese prolongada (1, 3, 5 e 7 dias) foram mensurados o volume de urina excretado, as concentrações de sódio, potássio, cloreto, a densidade e o pH.

No sétimo dia da avaliação da diurese, também foram quantificados a concentração sérica de cloreto, potássio, sódio, creatinina e ureia. As análises bioquímicas foram realizadas no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, utilizando o analisador bioquímico Cobas Miras Plus® e seus respectivos kits de reagentes através da absorbância como modo de medição.

4.2.5 Avaliação da atividade hipotensora

Para estes experimentos os animais, utilizados na diurese foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administradas por

via intramuscular, e suplementadas com uma nova dose de anestésico a cada 45 a 60 minutos, se necessário. Uma injeção subcutânea de heparina (30 UI) foi administrada em bolus previamente ao procedimento cirúrgico. Posteriormente, foi isolada a artéria carótida esquerda, canulada e conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália) onde os dados de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram mensurados e gravados. Após 30 minutos necessários para a estabilização da PA, o nível basal das pressões e da frequência cardíaca foram registrados por 5 minutos.

4.2.6 Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido

Os leitos mesentéricos (n = 5) oriundos de ratos machos da linhagem Wistar, foram rapidamente isolados e preparados para a perfusão como descrito previamente (KAWASAKI et al., 1988; KAWASAKI et al., 1991). A artéria mesentérica superior foi canulada e lavada delicadamente com uma solução de Krebs modificada (pH 7.4; de composição em mmol.L⁻¹: 119 NaCl; 4.7 KCl; 2.4 CaCl₂; 1.2 MgSO₄; 25.0 NaHCO₃; 1.2 KH₂PO₄; 0.03 EDTA e 11.1 dextrose) para eliminar o sangue de seu interior. Após a remoção do intestino inteiro e do leito vascular associado, o leito mesentérico foi delicadamente separado. Somente quatro filiais arteriais principais do tronco mesentérico superior co-localizada próximo ao íleo terminal foram utilizadas. Os leitos mesentéricos isolados foram acondicionados em cubas de vidro, mantidos a 37°C, aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e perfundidos a um fluxo constante de 4 mL/min com uma solução de Krebs modificado com auxílio de uma bomba peristáltica. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália).

Os leitos mesentéricos isolados e perfundidos foram submetidos a um aumento de pressão de perfusão (aproximadamente 100 mmHg) através da infusão de uma solução de Krebs contendo fenilefrina (3 µmol.L⁻¹). Após o período de estabilização, foi realizada uma administração única de acetilcolina (30 nmol) para avaliar a integridade do endotélio vascular. Em seguida, uma sequência de

administração em bolus do ESCC (0,0001; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 mg) e da solução salina fisiológica (PSS) foram realizadas. Ao final dos procedimentos, todos os animais foram submetidos à eutanásia com isoflurano em câmara de saturação.

4.2.7 Avaliação do potencial antioxidante

Para estes experimentos foram utilizados os animais da avaliação da atividade hipotensora. As amostras do tecido do rim e coração foram removidas após eutanásia dos animais (overdose de isoflurano) e então homogeneizadas em tampão fosfato de potássio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5), em diluição 1:10. O potencial antioxidante foi avaliado através de três métodos clássicos utilizando diferentes concentrações do ESCC (30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada através do método de Gao et al. (1998). Os níveis de hidroperóxido lipídico (LPO) foram avaliados de acordo com metodologia previamente descrita por Sedlak e Lindsay (1968). A determinação da catalase (CAT) foi realizada através do método de Beers e Sizer (1952). Os resultados foram expressos como U de SOD/mg de proteína para atividade de SOD, mmol de hidroperóxido/mg de proteína para níveis de LPO e mmol/min/mg de proteína para atividade de CAT.

4.2.8 Análises estatísticas

Os dados foram previamente analisados quanto à homogeneidade da variância e à normalidade da distribuição. Foi utilizado o teste *t* de *student* e o teste ANOVA de uma ou duas vias, seguido de teste de Dunnett como pós-teste, dependendo dos fatores envolvidos. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DE *Cuphea Calophylla* CHAM. & SCHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG.

5.1.1 Estudo anatômico

Cuphea calophylla subsp. *mesostemon* (Figura 4a) apresenta caule do tipo haste, totalmente coberto por tricomas, avermelhado, circular, ramificado, aéreo, medindo 10 a 50 cm de altura. A folha mostra contorno oval, base arredondada à subcordada, ápice agudo, margem lisa e filotaxia oposta. O pecíolo é curto e reto, com secção circular e inserção lateral, medindo entre 1 e 3 mm de comprimento. As flores são lilases, isoladas ou reunidas em inflorescências do tipo cimeira ramificada, florescendo o ano todo, especialmente no verão. As características relatadas estão de acordo com a literatura (SHOENBERG; OLIVEIRA, 1989; LUSA; BONA 2011; FACCO, 2015).

Cuphea calophylla subsp. *mesostemon* (Figura 4a) apresenta epiderme foliar com paredes celulares anticlinais levemente sinuosas em ambas as faces (Figuras 4b, c), sendo coberta externamente por uma cutícula estriada (Figura 4d). Estômatos anomocíticos e diacíticos estão presentes em ambas as epidermes adaxial (Figura 4b) e abaxial (Figura 4c), caracterizando a folha como anfiestomática. O tamanho médio dos estômatos é de 8,50 x 13,46 µm. Características semelhantes foram encontradas em *Cuphea carthagenensis* (LUSA; BONA, 2011).

No presente estudo, areia cristalina formada por pequenos cristais prismáticos bipiramidais foi observada externamente à superfície adaxial da folha (Figura 4e). Esta característica não foi relatada anteriormente em espécies de *Cuphea*. Entretanto, cristais sobre a epiderme tem sido descrito em diferentes gêneros, estando presentes sobre folhas de espécies de *Piper* (SANTOS et al., 2015) e *Eucalyptus* (MIGACZ et al., 2018) ou sobre a epiderme caulinar em *Celosia* (TOLOUEI et al., 2019).

Nas folhas, dois tipos de tricomas estão presentes em *C. calophylla*, tipo a) glandular, pluricelular, plurisseriado, com bulbos expandidos nas bases e pedicelo estreito e alongado (Figuras 4f – i). A glândula presente nesse tricoma (Figura 4h) mostra conteúdo amarelo claro e é bastante sensível, caindo a um simples toque. É

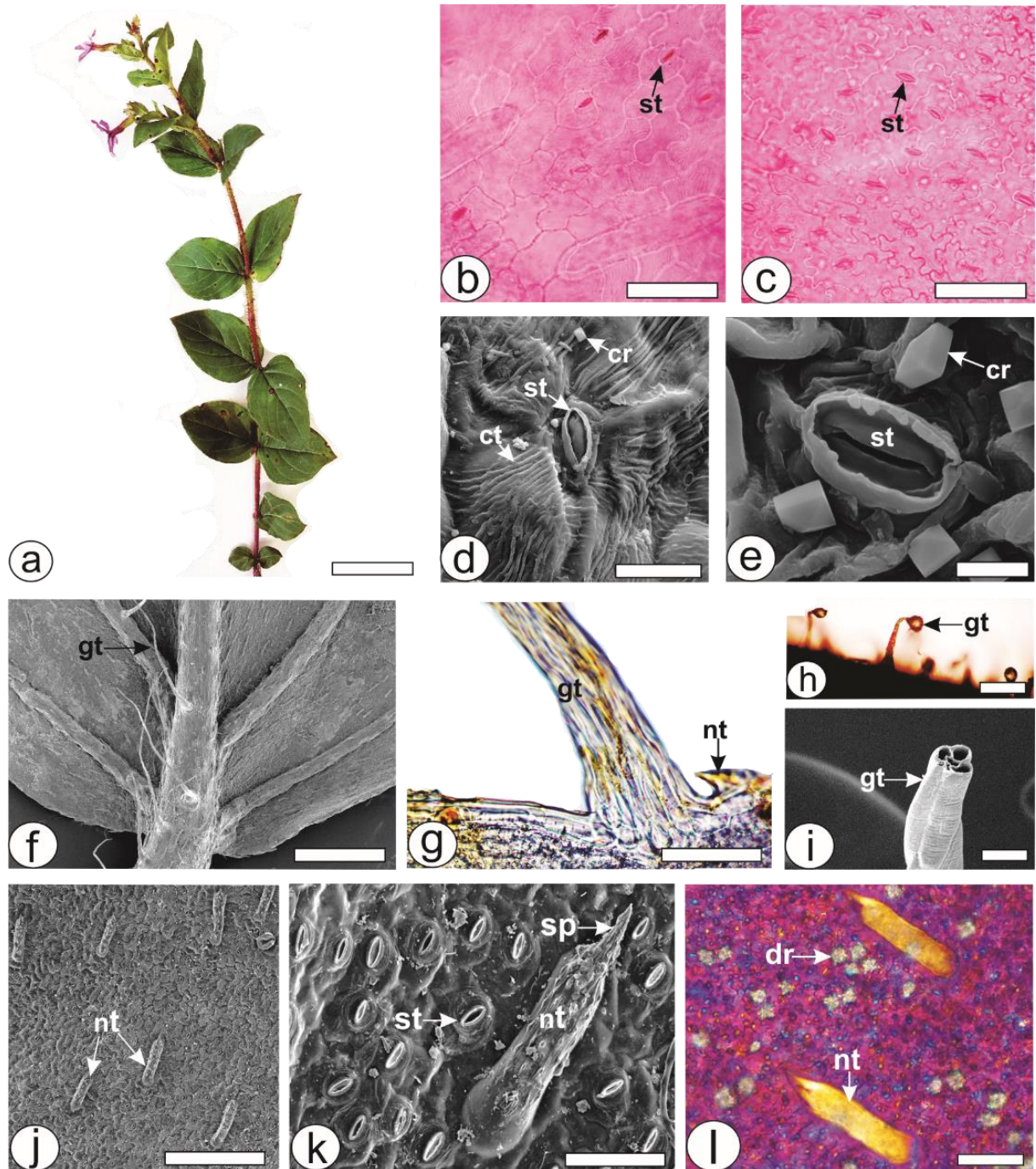
um tricoma muito longo, medindo mais de 1 mm e comumente está localizado na nervura central (Figura 4f). Tipo b) tector, verrucoso, aderido à epiderme, espiniforme com espinho conspícuo (Figura 4j-l). Este tricoma mede 139,5 µm de comprimento e 21,1 µm de largura e o espinho tem 26,6 µm, em média. Geralmente é encontrado na lâmina, na nervura central e nos bordos. Quando presente nos bordos posicionam-se voltados para o ápice da folha.

Amarasinghe et al. (1991) estudaram a morfologia de tricomas de 136 espécies de *Cuphea* usando microscopia óptica e eletrônica e encontraram sete tipos diferentes de tricomas nas folhas, caules e flores. O tipo a encontrado no presente estudo evidenciou secreção resinífera e foi encontrado em 92% das espécies estudadas, sendo abundantes em flores e menos frequentes em folhas. Os autores supracitados também encontraram o tipo b em várias folhas de *Cuphea*, como *C. elíptica* Koehne e *C. sessilifolia* Mart.

Os tricomas tipos a e b observados no presente estudo foram encontrados em *C. carthagenensis* por Lusa e Bona (2011) e Barboza et al. (2016). Entretanto, esses autores também encontraram um tricoma tector, unisseriado, formado por até 4 células com paredes lisas e finas, o qual não foi observado no presente estudo.

A morfologia dos tricomas apresenta alto valor taxonômico e no gênero *Cuphea* ajudam a diferenciar espécies morfologicamente similares, a exemplo de *C. epilobiifolia* Koehne e *C. sordida* Koehne (AMARASINGHE et al. 1991).

Figura 4 - Morfoanatomia de *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig.



Legenda: [b, c, g, h, l: microscopia óptica; d, e, f, i, j, k: FESEM]. (a) Ramo da planta. (b-l). Vista frontal. [cr, cristal prismático; ct, cutícula; dr, drusa; gt: tricoma glandular; nt: tricoma tector; sp: ponta aguda; st, estômato].

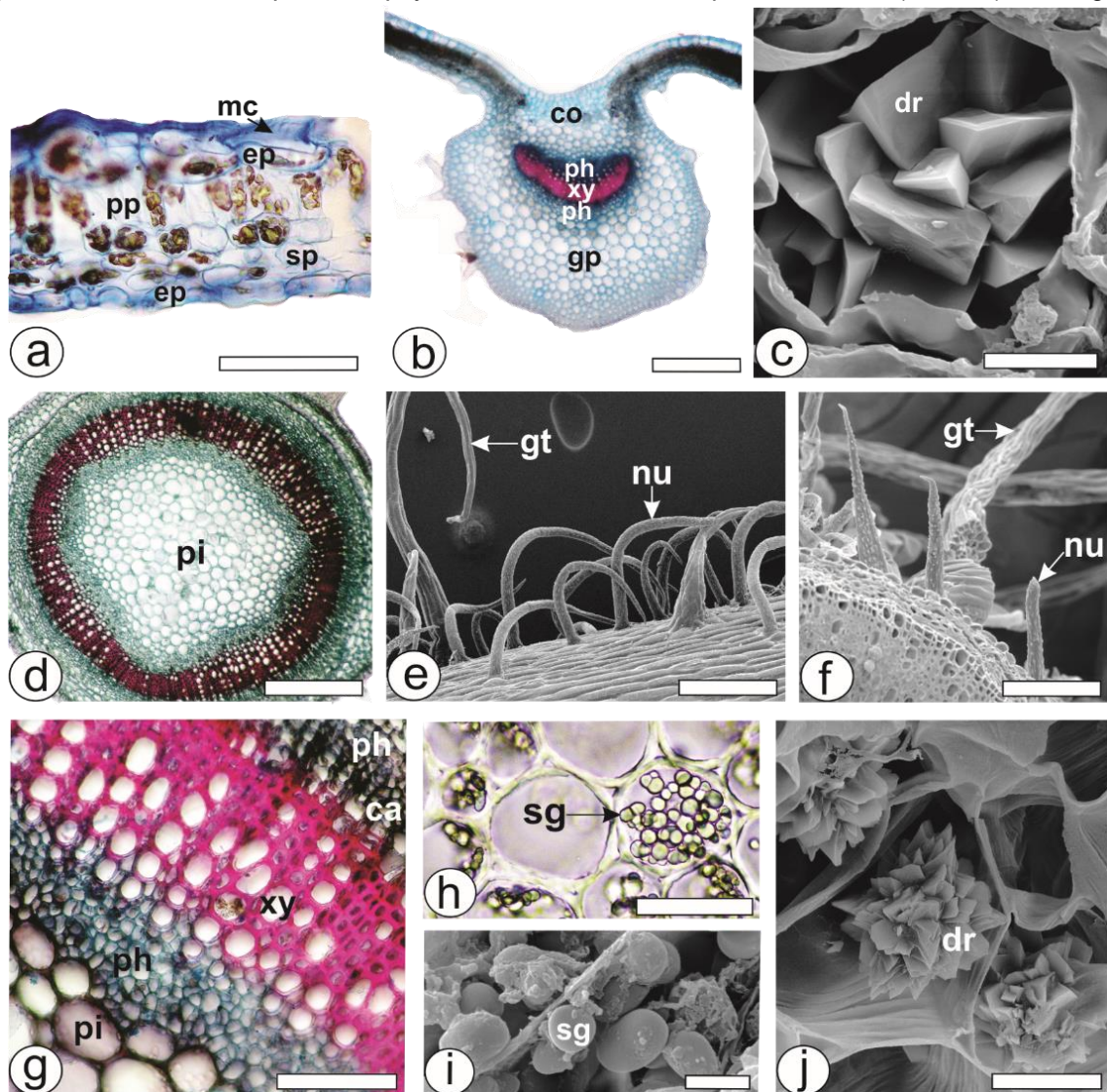
Escala: Barra: a= 2 cm; f, h = 1 mm; j = 200 µm; b, c, g, k, l = 50 µm; d, i = 20 µm; e = 5 µm.

Fonte: a autora.

A folha de *C. calophylla*, em corte transversal, apresenta epiderme unisseriada, com células contendo mucilagem na parede periclinal externa (Figura 5a). Este tipo de célula foi relatado em espécies da família Lythraceae (LITTLE et al.,

2004; LUSA; BONA, 2011). As células da epiderme adaxial são comparativamente maiores que as células da face abaxial (Figura 5a, b). O mesofilo é dorsiventral, compreendendo 1-2 camadas de parênquima paliçádico e até 4 camadas de parênquima esponjoso (Figura 5a). Os vasos que atravessam a região do mesofilo são representados por pequenos feixes vasculares bicolaterais circundados por endoderme.

Figura 5 - Anatomia de *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig.



Legenda: [a, b, d, g, h: microscopia óptica; c, e, f, i, j: FESEM]. (a-c) Folha. (d-j) Caule. (a-d, f-i) Secções transversais. (e) Vista frontal da superfície foliar [ca, câmbio; co, colênquima; dr, drusa; ep, epiderme; gp, parênquima fundamental; gt, tricoma glandular; mc, célula mucilagínosa; nu, tricoma tector unisseriado; ph, floema; pp, parênquima paliçádico; pi, medula; sg, grãos de amido; sp, parênquima esponjoso; xy, xilema].

Escala: Barra: d = 300 µm, b = 200 µm, e, f = 100 µm, a, g, h = 50 µm, i, j = 10 µm, c = 5 µm. Fonte: a autora.

Gotículas de óleo foram observadas no mesofilo, especialmente no parênquima paliçádico (Figura 7a). Não há relatos anteriores sobre gotículas de óleo em espécies de *Cuphea*. Entretanto, gotículas de óleo foram encontradas no mesofilo de espécies de Lythraceae, a exemplo de *Decodon verticillate* (L.) Ell. e *Lythrum salicaria* L. (LERSTEN et al., 2006).

Em secção transversal, a nervura central é ligeiramente côncava na face adaxial e acentuadamente convexa na face abaxial (Figura 5b). *Cuphea carthagenensis* mostrou uma nervura central com formato plano-convexo (LUSA, BONA, 2011). A epiderme unisseriada é coberta por uma cutícula delgada e lisa (Figuras 5a e c). Subjacente à epiderme, aparece o colênquima angular, composto por cerca de quatro camadas em ambas as faces. Os idioblastos contendo drusas são encontrados na nervura central (Figura 5c) e também no mesofilo, especialmente no parênquima esponjoso. O sistema vascular é bicolateral formado por feixe único e central, em arco aberto (Figura 5b). Feixes vasculares bicolaterais em arco aberto e a presença de drusas na nervura central e mesofilo são características comuns em membros de Lythraceae (METCALFE; CHALK, 1950; LITTLE et al., 2004).

O pecíolo, em secção transversal (Figura 7f), possui formato ligeiramente plano-convexo. A epiderme é unisseriada, coberta por uma cutícula delgada e lisa e apresenta tricomas tipo a e b, como relatado anteriormente para a folha. No córtex ocorre cerca de 10 camadas de colênquima angular. O sistema vascular tem as mesmas características descritas anteriormente para a lâmina foliar. Várias drusas e grãos de amido foram encontrados no parênquima fundamental. O formato, o tipo do feixe vascular e a presença de drusas também foram encontrados em *C. carthagenensis* (LUSA, BONA, 2011; BARBOZA et al., 2016).

O caule de *C. calophylla*, em estrutura secundária, apresenta formato circular (Figura 5d). A epiderme é unisseriada e apresenta raros estômatos. A cutícula é ligeiramente estriada, exibindo formações epicuticulares lenticulares (Figura 7g). O tricoma do tipo a, como descrito anteriormente para a folha, está presente no caule (Fig. 5e, f). Um tipo diferente de tricoma foi encontrado nesse órgão, denominado tipo c (Figura 5e, f). Este, é pluricelular, unisseriado, tector, formado por até 7 células, com média de 240 µm de comprimento, às vezes curvado no ápice e de paredes espessas.

No presente estudo, o tricoma tipo c foi encontrado apenas no caule de *C. calophylla*. Esse tricoma também foi encontrado no caule de *C. carthagenensis* (LUSA, BONA, 2011). Amarasinghe et al. (1991) afirmam que o tricoma do tipo c é frequentemente observado em espécies de *Cuphea* e se mostraram taxonomicamente importantes principalmente em relação a espécie baseada em diferenças de comprimento e/ou abundância.

O córtex é formado por 2-3 camadas de colênquima e até 6 camadas de células parenquimatosas (Figura 7g). Algumas regiões do caule contêm células corticais com pigmentos vermelhos, os quais Lusa e Bona (2011) relacionaram à presença de antocianidinas em *C. carthagenensis*. Limitando o córtex, a endoderme evidencia grãos de amido (Figura 7h).

Cuphea carthagenensis evidencia as camadas internas das células do córtex colapsadas formando o aerênquima. *Cuphea glutinosa* mostra algumas camadas de células mucilaginosas no córtex (ZAGO et al., 2009). Aerênquima e células mucilaginosas não foram observadas em *C. calophylla* e essas características podem auxiliar na diferenciação das espécies de *Cuphea*.

Um anel descontínuo de fibras formado por três camadas de células circunda o sistema vascular, o qual apresenta um arranjo bicolateral. Tanto o floema interno como o externo são compostos por elementos de tubo crivado, células de parênquima e grãos de amido. A região do cambio é evidente. O xilema é formado por elementos de vasos arranjados em filas radiais (Figura 5g).

A medula ocupa a parte central do caule e é composta por células de parênquima de parede fina onde podem ser encontrados vários grãos de amido (Figura 5h, i) e drusas (Figura 5j). Os grãos de amido apresentam formato circular a oval, aparecem compondo agregados de vários grânulos na medula, medindo 4,2 x 3,0 μm em média. Aerênquima foi encontrado na medula de *C. carthagenensis* (LUSA, BONA, 2011), esta característica não foi observada neste estudo.

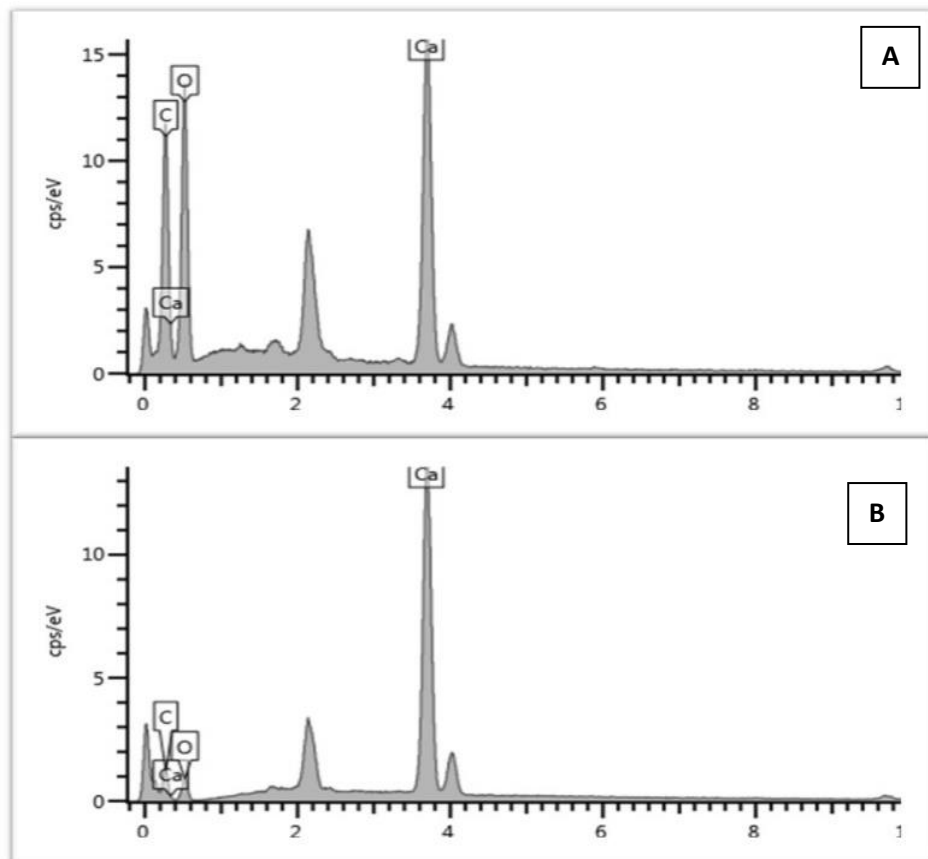
5.1.1.1 Espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS)

A composição química elementar dos cristais foi analisada por EDS. O espectro EDS de um cristal prismático (Figura 6a) presente na superfície da epiderme das folhas (Figura 4e) mostra picos proeminentes de cálcio (20,9%), carbono (28,7%) e oxigênio (50,4%), enquanto que o espectro EDS de uma drusa

(Figura 6b) encontrada na medula evidencia 65,3% de cálcio, 11,3% de carbono e 23,4% de oxigênio (23,4%). A composição química indica que os cristais são de oxalato de cálcio. Drusas também foram evidenciadas em *C. carthagenensis* (LUSA, BONA, 2011) e em *C. glutinosa* (ZAGO et al., 2009).

A presença, tipologia e composição química dos cristais auxiliam na taxonomia e diferenciação das espécies (LERSTEN; HORNER, 2000; MERIC, 2009). A morfologia dos cristais dentro da planta é influenciada pela característica genética da espécie, fazendo com que a presença, morfotipo ou mesmo ausência do cristal sejam uma característica para a diferenciação e identificação das espécies.

Figura 6 - Espectro EDS de cristais prismáticos (a) e drusa (b) de *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig.



Legenda: Os principais picos não identificados representam o elemento ouro usado para metalizar as amostras

Fonte: a autora.

5.1.1.2 Testes histoquímicos

A análise histoquímica permite localizar um grupo de metabólitos em diferentes órgãos, tecidos e células de plantas. Isso pode auxiliar na identificação do

melhor o órgão da planta para se extrair as substâncias de interesse. No presente estudo, os testes histoquímicos auxiliaram na localização de compostos fenólicos, lipofílicos, lignificados e grãos de amido em *C. calophylla*. Compostos lipofílicos foram detectados na cutícula e no mesofilo onde as gotículas de óleo foram evidenciadas usando Sudam III (Figura 7a). A presença de cutícula nas plantas ajuda a planta a evitar a perda de água (RIEDERER; SCHREIBER. 2001). As gotas de óleo presente nas células do mesofilo provavelmente atuam como produtos de armazenamento intermediário e podem ser considerados uma adaptação a temperaturas frias (LERSTEN et al., 2006).

Os compostos fenólicos foram detectados usando soluções de cloreto férrico (Figura 7c, i) e de dicromato de potássio (Figura 7d). Eles foram encontrados abundantemente no mesofilo (Figuras 7c, d) e no feixe vascular da nervura central (Figura 7d). No caule, compostos fenólicos foram evidenciados no córtex e especialmente no floema (Figura 7i).

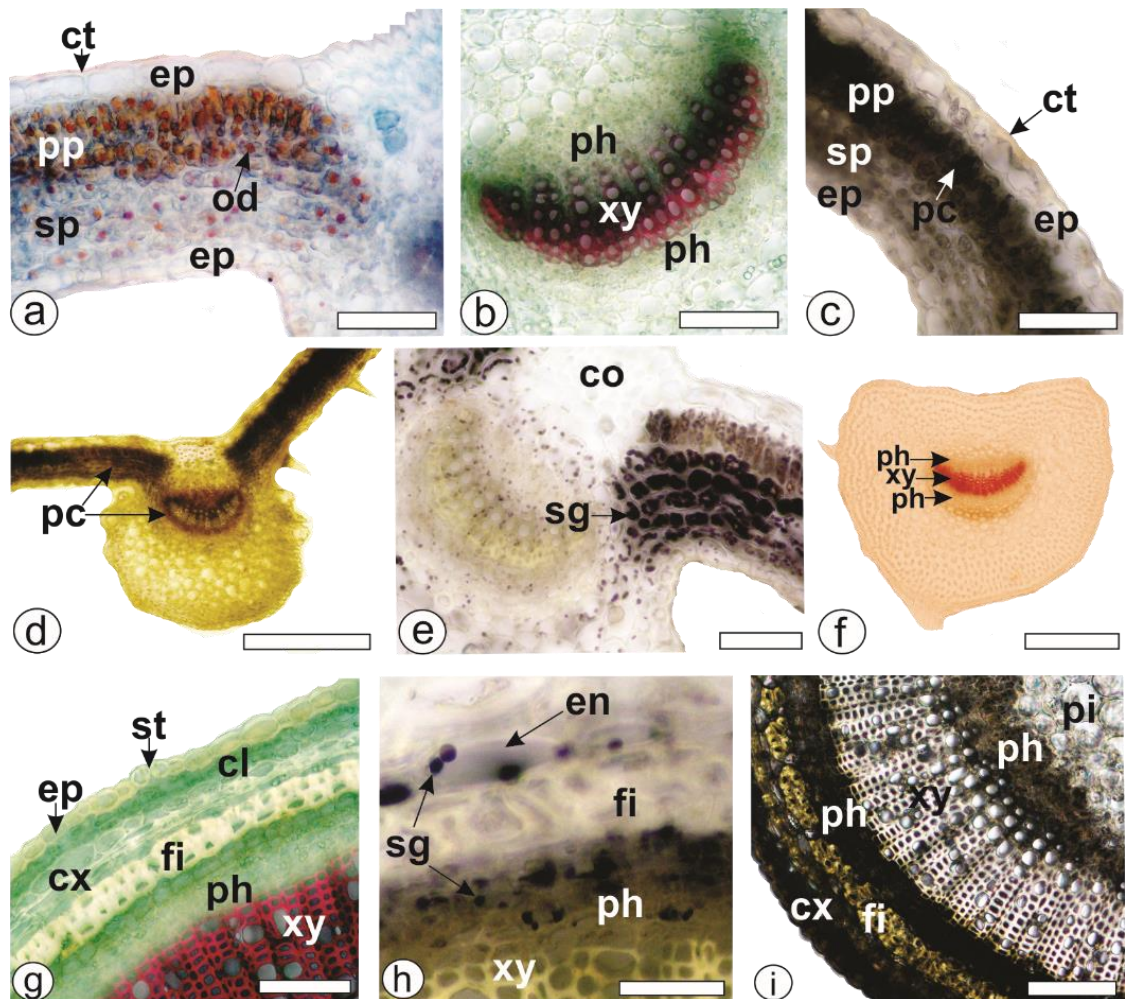
Compostos fenólicos não foram encontrados apenas no mesofilo de *Cuphea carthagenensis*, mas também nos tricomas, nas células da epiderme, na nervura central, no pecíolo, no parênquima fundamental e no feixe vascular (especialmente no xilema) (BARBOZA et al., 2016). Compostos fenólicos são produzidos em plantas para aumentar a resistência a fatores ambientais antagônicos e na defesa de plantas contra insetos herbívoros, microrganismos e fungos (LATTANZIO et al., 2006).

Considerando as atividades biológicas, os compostos fenólicos presentes nos tecidos de caule e folhas de *C. calophylla* podem estar relacionados com as propriedades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória (RAMÍREZ-ATEHORTÚA et al., 2018). Compostos fenólicos, flavonóis e vários derivados glicosilados foram relatados em *C. carthagenensis* e mostraram efeitos ateroprotetores em coelhos (BARBOZA et al., 2016).

Os elementos lignificados, que reagiram com o floroglucinol/HCl, são encontrados nas fibras adjacentes ao floema e no xilema nas folhas e caules (Figura 7g). As ligninas são polímeros aromáticos encontrados principalmente em paredes celulares secundárias espessadas. Elas mantêm a integridade estrutural na parede celular, dando resistência aos tecidos; e impermeabiliza a parede celular, garantindo o transporte de água e solutos através do sistema vascular, além de defender as plantas contra patógenos (BOERJAN et al., 2003).

Os grãos de amido, detectados em reação com solução de iodo, são encontrados abundantemente no mesofilo, especialmente no parênquima esponjoso (Figura 7e) e na endoderme do caule (Figura 7h). O amido é comumente distribuído pelos tecidos vegetais, mas é frequentemente encontrado em maiores concentrações em raízes, caules, rizomas e frutos (UPTON et al., 2011). A presença de amido nas folhas de *Cuphea calophylla* é uma característica diagnóstica importante.

Figura 7 - Histoquímica de *Cuphea calophylla* Cham. &Schtdl. subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig.



Legenda: [a: Sudan III; c, e, i: solução de cloreto férrico (2%); d: solução dicromato de potássio (10%); b, f, g: floroglucina/HCl; h: solução de iodo (1%)]. Secções transversais a–e: folha; f: pecíolo; g–i: caule [cl, clorênquima; co, colênquima; ct, cutícula; cx, córtex; en, endoderme; ep, epiderme; fi, fibras; od, gotículas de óleo; pc, compostos fenólicos; ph, floema; pi, medula; pp, e parênquima paliçádico; sg, grãos de amidos; sp, parênquima esponjoso; st, estômato; xy, xilema].

Escala: a = 200 m, b–d = 50 m, e = 10 m.

Fonte: a autora.

5.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Cuphea calophylla* CHAM. & SCHTDL. subsp. *mesostemon* (KOEHNE) LOURTEIG

5.2.1 Avaliação da toxicidade aguda

As análises de toxicidade aguda foram realizadas seguindo o Guia 425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2008). Os resultados obtidos com os grupos controle e ESCC 2000 mg/kg estão apresentados na Tabela 1.

A toxicidade oral aguda retrata os efeitos que ocorrem após a administração oral de uma dose única de determinado composto. Assim sendo, foram avaliados os efeitos do ESCC (2000 mg/kg) segundo o screening hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Em nenhum dos dias durante o período de avaliação foi observado quaisquer alterações comportamentais sugestivas de atividade depressora sobre o SNC. Porém, na maioria dos dias, os animais demonstraram hiperatividade e agressividade. Nos dias 1, 8 e 9 os animais exibiram irritabilidade; tremores foram vistos nos dias 4 e 5; piloereção e movimento das vibrissas no primeiro e segundo dia. Todos os dias os animais apresentavam movimentos de escalar/levantar. Contudo, todas as alterações relatadas foram de intensidade leve 1 em uma escala de 0 a 4.

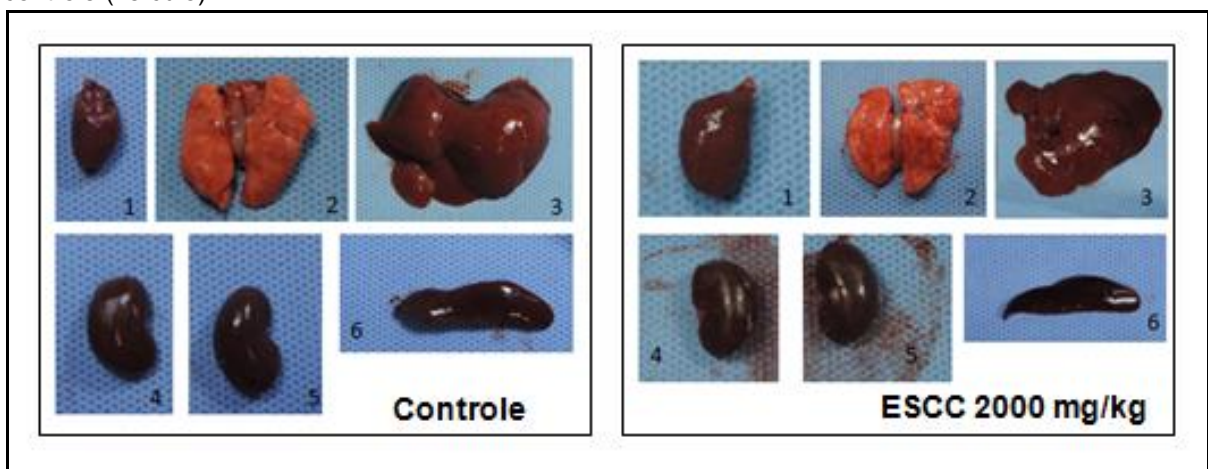
Ao longo dos 14 dias de estudo não ocorreu morte de nenhum animal tratado com o extrato ou com o veículo. Além disso, não foram observadas, convulsões, diarreia, constipação, alterações na mucosa, pele e anexos, ou nos olhos.

Além do screening hipocrático, também foram investigadas alterações no peso corporal e no peso relativo de órgãos. O grupo tratado com o ESCC 2000 mg/kg apresentou um menor ganho de peso corporal em comparação ao grupo controle (Tabela 1). Em relação ao peso relativo dos órgãos, somente o útero de ratos fêmeas do grupo ESCC (2000 mg/kg) apresentaram diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle. Esse dado não necessariamente indica toxicidade, pois o tamanho e o peso do útero das ratas variam em decorrência da fase do ciclo estral. Como o protocolo adotado para esse estudo não prevê a determinação e padronização prévia da fase do ciclo estral dentre os grupos experimentais, este dado não traz informações toxicológicas relevantes. A Figura 8 mostra macroscopicamente o coração, pulmão, fígado, rim e

baço do grupo controle e do grupo tratado com o ESCC 2000 mg/kg. É possível observar que dentre os grupos experimentais não há diferenças macroscópicas aparentes. Segundo a Resolução 90 da ANVISA e o Guia 425 da OECD (2008), investigações histopatológicas devem ser realizadas somente se houverem alterações macroscópicas nos órgãos avaliados. Como não foram observadas quaisquer alterações clínicas ou macroscópicas relevantes, a avaliação histopatológica não foi realizada. Os dados obtidos nesse estudo, também permitem considerar que a dose letal mediana (DL₅₀) do ESCC é maior que 2000 mg/kg, já que não foi observado nenhuma morte durante todo o período experimental.

Alguns estudos toxicológicos já foram conduzidos com outras espécies de *Cuphea*. Em um estudo conduzido em animais submetidos a dieta hipercalórica e tratados com o extrato aquoso de *Cuphea carthagenensis* não foram observadas alterações significativas no peso corporal ou nas funções hepáticas e renais. Porém, notou-se aumento da vascularização hepática podendo sugerir toxicidade, no entanto, os autores indicam estudos adicionais visto que esse efeito pode estar relacionado à detoxificação do extrato (BIAVATTI et al., 2004). Além disso, um estudo conduzido por ESPINOSA et al. (2013) mostrou que a administração oral da infusão de *Cuphea aequipetala* Cav. (5000 mg/kg) não apresentou efeitos tóxicos agudos, nem diferenças no peso corporal ou divergências no comportamento dos animais, estimando-se, portanto, DL₅₀ acima de 5000 mg/kg.

Figura 8 - Vista macroscópica dos órgãos dos animais tratados com o ESCC (2000 mg/kg) ou com o controle (veículo).



Legenda: 1. Coração; 2. Pulmão; 3. Fígado; 4. Rim esquerdo; 5. Rim direito; 6. Baço.

Fonte: a autora.

Tabela 1 - Peso corporal, ganho de peso corporal, peso relativo de órgãos, ingestão de ração e água de ratos fêmeas tratados pela via oral com o sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC)

| Parâmetro | Controle | ESCC (2000 mg/kg) |
|-------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Peso inicial (g) | 245.00 ± 4.65 | 259.00 ± 5.25 |
| Peso final (g) | 254.40 ± 6.65 | 260.75 ± 5.43 |
| Ganho de peso corporal (g) | 9.40 ± 4.15 | 1.75 ± 0.37 |
| Ganho de peso corporal (%) | 3.88 ± 1.71 | 0.67 ± 0.14 |
| Ingestão de ração (g/100g pc) | 7.06 ± 0.09 | 7.14 ± 0.09 |
| Ingestão de água (mL/100g pc) | 14.01 ± 0.15 | 15.04 ± 0.15 |
| Peso relativo dos órgãos (%) | | |
| Coração | 0.26 ± 0.00 | 0.24 ± 0.00 |
| Pulmão | 0.44 ± 0.00 | 0.47 ± 0.00 |
| Fígado | 3.32 ± 0.23 | 3.06 ± 0.12 |
| Baço | 0.21 ± 0.02 | 0.17 ± 0.00 |
| Rim direito | 0.34 ± 0.001 | 0.33 ± 0.00 |
| Rim esquerdo | 0.33 ± 0.00 | 0.32 ± 0.00 |
| Ovário direito | 0.02 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 |
| Ovário esquerdo | 0.02 ± 0.00 | 0.02 ± 0.00 |
| Útero | 0.28 ± 0.02 | 0.17 ± 0.00 ^a |

A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de *Student* não pareado. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 5) em comparação ao grupo controle (^ap ≤ 0,05).

5.2.2 Avaliação da atividade diurética aguda e prolongada

5.2.2.1 Avaliação da atividade diurética aguda

São vários os métodos para determinar a atividade diurética de diferentes compostos biologicamente ativos. O método proposto por Kau et al. (1984) com modificações sobre o método de Lipschitz et al. (1943) é um dos mais referenciados e aceitos, pois propõe a uniformidade de hidratação dos animais com a administração prévia de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (MACHÍN et al., 2011).

Os resultados do volume urinário demonstraram que as administrações orais das 3 doses do ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) nos tempos de 4 e 8 horas não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Como esperado, houve diferenças significativas entre os valores do volume urinário da hidroclorotiazida (25 mg/kg; HCTZ) em comparação ao grupo controle. Os valores obtidos após a administração da HCTZ foram de 5,14 mL/100g ± 0,32 no tempo 4

horas e $6,19 \text{ mL}/100\text{g} \pm 0,32$ após 8 horas da administração. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* (ESCC) sobre o volume urinário

| Grupo | Volume urinário (mL/100g/4h) | Volume urinário (mL/100g/8h) |
|------------------|---|---|
| Controle | 3.03 ± 0.09 | 3.82 ± 0.09 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 5.14 ± 0.32^a | 6.19 ± 0.32^a |
| ESCC (30 mg/kg) | 1.43 ± 0.14 | 2.68 ± 0.07 |
| ESCC (100 mg/kg) | 2.86 ± 0.15 | 3.30 ± 0.09 |
| ESCC (300 mg/kg) | 2.41 ± 0.09 | 3.39 ± 0.09 |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (n= 6). ^ap \leq 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

Os valores de pH e densidade urinária estão apresentados na Tabela 3. Somente a administração do ESCC em sua menor dose (30 mg/kg) foi capaz de promover um aumento significativo nos valores de pH e densidade urinária. Além disso, no tempo de 8 horas, a administração oral de HCTZ apresentou valor de pH diminuído em relação ao controle.

Tabela 3 - Efeito da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* (ESCC) sobre o pH e densidade em amostras de urina de 4 e 8 horas

| Grupo | pH (4 h) | pH (8 h) | Densidade (4 h) | Densidade (8 h) |
|------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| Controle | 7.50 ± 0.05 | 7.96 ± 0.12 | 1010.6 ± 0.72 | 1036.6 ± 1.81 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 7.50 ± 0.15 | 7.20 ± 0.10^a | 1012.0 ± 0.00 | 1039.0 ± 0.50 |
| ESCC (30 mg/kg) | 8.06 ± 0.09^a | 8.43 ± 0.06^a | 1017.3 ± 0.36^a | 1040.0 ± 0.00 |
| ESCC (100 mg/kg) | 7.50 ± 0.05 | 8.25 ± 0.07 | 1010.6 ± 0.36 | 1037.0 ± 1.50 |
| ESCC (300 mg/kg) | 7.66 ± 0.04 | 8.23 ± 0.01 | 1011.3 ± 0.36 | 1040.0 ± 0.00 |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (n= 6). ^ap \leq 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida. Densidade expressa em mg/L.

A excreção dos eletrólitos urinários após 8 horas de sua administração está apresentado na Tabela 4.

Os resultados obtidos reafirmam a natriurese do fármaco hidroclorotiazida classificado como diurético tiazídico. Essa classe de medicamentos que atua no túbulo contorcido distal exerce seus efeitos na inibição do simportador de Na^+/Cl^- causando perda de íons sódio e cloreto na urina. (GOODMAN; GILMAN, 2010; RANG; DALE, 2016).

Os valores obtidos com a administração do ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) mostraram que, no tempo de 8 horas, a dose do ESCC de 30 mg/kg apresentou valor diminuído para a excreção do sódio e cloreto; porém, aumentou significativamente a excreção do potássio. Por outro lado, a dose do ESCC de 100 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a excreção urinária de potássio e cloreto.

Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* (ESCC) sobre a excreção de eletrólitos na urina após 8 horas

| Grupo | El_{Na^+} | El_{K^+} | El_{Cl^-} | ^b Índice salurético | | |
|------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------|---------------|
| | | | | Na^+ | K^+ | Cl^- |
| Controle | 1.20 ± 0.03 | 0.70 ± 0.03 | 1.80 ± 0.02 | - | - | - |
| HCTZ (25 mg/kg) | 2.00 ± 0.10 ^a | 0.60 ± 0.04 | 2.20 ± 0.10 ^a | 1.66 | 0.85 | 1.22 |
| ESCC (30 mg/kg) | 0.80 ± 0.02 ^a | 0.90 ± 0.02 ^a | 1.50 ± 0.03 ^a | 0.66 | 1.28 | 0.83 |
| ESCC (100 mg/kg) | 1.10 ± 0.05 | 0.50 ± 0.03 ^a | 1.50 ± 0.06 ^a | 0.91 | 0.71 | 0.83 |
| ESCC (300 mg/kg) | 1.20 ± 0.01 | 0.70 ± 0.01 | 1.70 ± 0.02 | 1.00 | 1.00 | 0.95 |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^ap ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. ^bÍndice salurético = mmol.L^{-1} grupo problema/ mmol.L^{-1} grupo controle. El: Carga Excretada; HCTZ: hidroclorotiazida. El_{Na^+} , El_{K^+} e El_{Cl^-} expressos em $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$.

O valor do índice salurético apresentado na Tabela 4 é calculado pela razão do valor do grupo problema pelo controle. Assim, valores maiores que 1,00 denotam valores maiores do grupo tratado pelo grupo controle. Fisiologicamente, os rins através de seu sistema osmorregulatório, atuam no equilíbrio dos fluidos corporais e de seus componentes químicos. Quando há um desequilíbrio em seu sistema, diuréticos são utilizados para aumentar a excreção de sódio e água, diminuindo assim o volume sanguíneo no sistema cardiovascular (GASPAROTTO et al., 2009; BALMACEDA et al., 2018).

Os principais mecanismos celulares e moleculares envolvidos na diurese induzida por diferentes plantas medicinais são descritos por Lívero et al. (2017).

Segundo os autores os mecanismos envolvidos incluem canais de aquaporinas, os quais regulam o balanço hídrico no organismo; efeito de carreadores renais que agem no transporte ativo na bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ nas membranas celulares; efeito da via do óxido nítrico GMPc o qual atua na proteção vascular; efeitos na via de prostaglandina AMPc que atuam na mediação do tônus vascular; efeito do sistema RAA (renina angiotensina aldosterona) analisado nas plantas pela homeostase de sal e água através de suas excreções; efeito no sistema KKS (sistema cinina-caliceína); efeito na anidrase carbônica no qual é observado efeito salurético nas plantas por meio da inibição da anidrase carbônica e efeito osmótico nos rins através do controle da concentração de Na^+ e reabsorção de água.

No entanto, sob as condições experimentais apresentadas, o ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) não apresentou atividade diurética aguda significativa, já que após a sua administração, o ESCC não apresentou uma redução expressiva na excreção urinária de sódio e cloreto.

5.2.2.2 Avaliação da atividade diurética prolongada

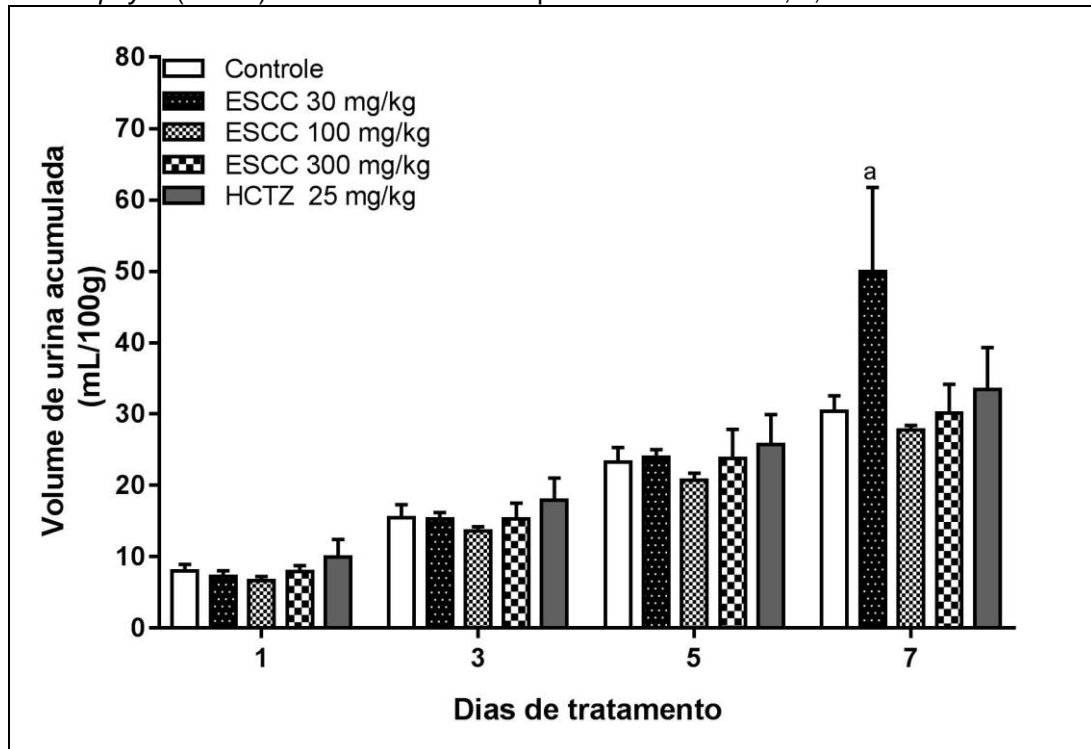
O ESCC obtido de *Cuphea calophylla* também foi avaliado quanto a sua atividade diurética prolongada no período de sete dias, sendo mensurados nos dias 1, 3, 5 e 7 os valores de volume urinário, pH, densidade e a concentração de eletrólitos na urina. Ao final dos tratamentos foi realizada a análise dos eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) e os níveis de, creatinina e ureia séricos. Os resultados do volume urinário estão apresentados na Figura 9.

Curiosamente, embora a HCTZ tenha apresentado efeito diurético agudo, os resultados sob o volume urinário na diurese prolongada demonstram que o grupo apresentou resultados maiores que o controle, no entanto sem diferenças estatísticas significativas. A HCTZ após induzir resposta diurética aguda pode ter a sua capacidade de aumentar o volume urinário reduzida através de mecanismos compensatórios. De fato, a ativação do sistema-renina-angiotensina acarretada pela redução do volume plasmático pode aumentar a reabsorção tubular renal de sódio e água, reduzindo o efeito diurético (DUARTE; COOPER-DEHOFF, 2010).

De forma semelhante à HCTZ, o tratamento com ESCC não foi capaz de induzir qualquer resposta diurética durante os dias 1, 3 e 5. Entretanto, no sétimo dia após o início dos tratamentos, os animais que receberam a dose de 30 mg/kg

apresentaram uma excreção urinária significativamente maior que o controle com um valor de $50,01 \text{ mL} \pm 4,02$ enquanto que o controle apresentou um valor de $30,39 \text{ mL} \pm 0,67$ (representado por média \pm EPM).

Figura 9 - Efeito da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) sob o volume urinário produzido nos dias 1, 3, 5 e 7.



Legenda: Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (n=6). ^ap \leq 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

Fonte: a autora.

O efeito tardio na diurese prolongada, na dose de 30 mg/kg do extrato de *Cuphea calophylla*, permite entender que a espécie possui uma ação diferente da hidroclorotiazida. Em um estudo realizado com ratas Wistar por Balmaceda et al. (2018), o efeito diurético da furosemida foi alcançado no tempo de 4 horas enquanto que o extrato aquoso de *C. glutinosa* teve ação diurética somente no tempo de 8 horas. Diferenças significativas no volume de excreção urinária também foram observadas em *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. no primeiro dia de tratamento nas três doses do extrato avaliadas (SCHAEDLER et al., 2018). Por outro lado, na investigação etnofarmacológica diurética realizada por Prando et al. (2015), os resultados da diurese no tempo de 8h do extrato de *Cuphea carthagenensis* mostram que o volume urinário do extrato foi maior que o grupo controle, porém sem diferenças significativas, não justificando o uso popular da espécie como diurético.

O potencial hidrogeniônico da urina obtida durante os experimentos de diurese prolongada estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeitos da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) sob o pH urinário nos dias 1, 3, 5 e 7 após o início dos tratamentos

| Grupo | pH (dia 1) | pH (dia 3) | pH (dia 5) | pH (dia 7) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Controle | 8.13 ± 0.04 | 7.66 ± 0.01 | 7.76 ± 0.06 | 7.90 ± 0.05 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 7.70 ± 0.05 | 7.45 ± 0.02 | 8.05 ± 0.17 | 7,85 ± 0.02 |
| ESCC (30 mg/kg) | 8.66 ± 0.09 ^a | 7.63 ± 0.04 | 7.66 ± 0.07 | 8.00 ± 0.05 |
| ESCC (100 mg/kg) | 8.36 ± 0.04 ^a | 7.26 ± 0.11 ^a | 8.20 ± 0.05 ^a | 8.23 ± 0.09 ^a |
| ESCC (300 mg/kg) | 8.40 ± 0.02 | 7.56 ± 0.01 | 8.00 ± 0.08 ^a | 8.36 ± 0.09 ^a |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^ap ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

Conforme os dados obtidos, o grupo tratado com a menor dose do ESCC (30 mg/kg) apresentou uma significativa elevação nos valores do pH urinário apenas no primeiro dia de tratamento. Por outro lado, os animais que receberam o ESCC na dose de 100 mg/kg apresentaram um significativo aumento no pH urinário nos dias 1, 5 e 7 após o início dos tratamentos, enquanto os ratos tratados com a dose de 300 mg/kg apresentam valores estatisticamente elevados apenas nos dias 5 e 7 após o início dos tratamentos. Curiosamente, no terceiro dia após o início dos tratamentos, os animais que receberam o ESCC na dose de 100 mg/kg apresentam uma redução significativa no pH urinário quando comparados com os animais do grupo controle.

Alterações no pH urinário podem ocorrer por vários mecanismos distintos, entretanto dois deles estão bastante envolvidos com o uso de extratos vegetais (LÍVERO et al., 2017). Alguns extratos vegetais por apresentarem o pH ligeiramente alcalino, podem alterar o pH do túbulo renal, e conseqüentemente, da urina eliminada. Além disso, uma alteração na eliminação do íon bicarbonato, comum com a utilização de alguns produtos naturais, também podem afetar significativamente o pH urinário.

Os resultados obtidos com a medida da densidade urinária após a administração prolongada do ESCC estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) da densidade sob a densidade urinária nos dias 1, 3, 5 e 7 após o início dos tratamentos

| Grupo | Densidade (dia 1) | Densidade (dia 3) | Densidade (dia 5) | Densidade (dia 7) |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Controle | 1031.3 ± 1.27 | 1027.3 ± 0.72 | 1027.3 ± 0.72 | 1028.6 ± 0.90 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 1024.0 ± 1.00 ^a | 1027.0 ± 0.50 | 1025.0 ± 0.50 | 1027.0 ± 2.50 |
| ESCC (30 mg/kg) | 1038.0 ± 1.63 ^a | 1027.3 ± 1.27 | 1027.3 ± 0.36 | 1028.0 ± 2.17 |
| ESCC (100 mg/kg) | 1030.6 ± 0.72 | 1025.3 ± 1.81 | 1030.0 ± 1.63 | 1026.6 ± 1.27 |
| ESCC (300 mg/kg) | 1028.0 ± 1.63 | 1024.6 ± 1.27 | 1031.3 ± 1.27 | 1030.6 ± 1.45 |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de *Student*. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^ap ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida. Densidade expressa em mg/mL.

Os resultados obtidos mostraram que apenas no dia 1 a dose do ESCC de 30 mg/kg apresentou uma pequena elevação na densidade urinária, enquanto a HCTZ induziu a uma significativa redução nesse parâmetro quando comparados ao grupo controle. A densidade (razão de massa por volume) é inversamente proporcional ao volume, logo valores baixos de urina são sugestivos de densidade mais elevada enquanto que resultados baixos de densidade podem estar correlacionados com um volume de urina menor, bem como uma maior concentração dos componentes da mesma, incluindo os eletrólitos urinários.

Tabela 7 - Efeito da administração oral do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) sob o volume urinário acumulado e excreção renal de Na⁺, K⁺ e Cl⁻

| Grupo | Eletrólitos (μEq/min/100g) | | |
|------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Na+ | K+ | Cl- |
| Dia 1 | | | |
| Controle | 0.65 ± 0.02 | 0.90 ± 0.02 | 1.57 ± 0.03 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 0.90 ± 0.16 | 1.12 ± 0.17 | 1.22 ± 0.21 |
| ESCC (30 mg/kg) | 0.60 ± 0.02 | 1.05 ± 0.02 | 1.63 ± 0.03 |
| ESCC (100 mg/kg) | 0.56 ± 0.02 | 0.75 ± 0.02 | 1.31 ± 0.08 |
| ESCC (300 mg/kg) | 0.58 ± 0.01 | 0.76 ± 0.02 | 1.20 ± 0.02 |
| Dia 3 | | | |
| Controle | 1.90 ± 0.05 | 2.60 ± 0.03 | 4.40 ± 0.09 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 3.20 ± 0.16 ^a | 4.33 ± 0.27 ^a | 4.89 ± 0.19 |
| ESCC (30 mg/kg) | 1.90 ± 0.03 | 2.70 ± 0.06 | 4.50 ± 0.12 |
| ESCC (100 mg/kg) | 1.80 ± 0.06 | 2.10 ± 0.12 | 3.80 ± 0.190 |
| ESCC (300 mg/kg) | 1.60 ± 0.02 | 2.20 ± 0.03 | 3.50 ± 0.04 |
| Dia 5 | | | |
| Controle | 3.70 ± 0.12 | 4.90 ± 0.09 | 8.60 ± 0.190 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 6.46 ± 0.34 ^a | 9.14 ± 0.46 ^a | 10.81 ± 0.36 ^a |
| ESCC (30 mg/kg) | 4.70 ± 0.04 | 4.20 ± 0.03 ^a | 7.60 ± 0.12 |
| ESCC (100 mg/kg) | 4.00 ± 0.17 | 4.60 ± 0.16 | 7.70 ± 0.32 |
| ESCC (300 mg/kg) | 3.60 ± 0.12 | 4.60 ± 0.14 | 7.40 ± 0.17 |
| Dia 7 | | | |
| Controle | 6.30 ± 0.30 | 8.20 ± 0.20 | 14.90 ± 0.30 |
| HCTZ (25 mg/kg) | 10.87 ± 0.47 ^a | 15.80 ± 0.67 ^a | 19.80 ± 0.68 ^a |
| ESCC (30 mg/kg) | 10.00 ± 0.70 ^a | 8.10 ± 0.20 | 14.00 ± 0.60 |
| ESCC (100 mg/kg) | 6.30 ± 0.20 | 7.40 ± 0.10 ^a | 13.10 ± 0.40 ^a |
| ESCC (300 mg/kg) | 6.50 ± 0.40 | 8.10 ± 0.40 | 13.50 ± 0.50 ^a |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^ap ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

Conforme os dados apresentados na Tabela 7, nos dias 1 e 3 os valores de excreção dos eletrólitos dos grupos tratados foram similares aos do grupo controle.

Nos dias 5 e 7 a excreção de potássio nos animais tratados com as doses de 30 e 100 mg/kg do ESCC foram significativamente menor que o grupo controle. No dia 7 houve uma menor excreção de cloreto nos ratos que receberam o ESCC nas doses de 100 e 300 mg/kg, onde ambas as doses apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle. Também no dia 7 a dose do ESCC de 30 mg/kg demonstrou uma significativa capacidade de aumentar a excreção de sódio quando relacionada ao grupo controle.

Como esperado, os valores da excreção dos eletrólitos de hidroclorotiazida apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Nos dias 5 e 7 a excreção de sódio, potássio e cloreto apresentou maiores valores em comparação ao grupo controle. No dia 3, sódio e potássio também tiveram valores aumentados em relação ao controle. Além de atuar na reabsorção de NaCl, fármacos tiazídicos também promovem o aumento da excreção de potássio (BATLOUNI, 2009).

Os resultados obtidos com a dosagem de eletrólitos, ureia e creatinina sérica estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeitos da administração oral prolongada com o sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) sobre os parâmetros séricos de ratos após 7 dias de tratamento

| Parâmetro | Controle | ESCC 30 mg/kg | ESCC 100 mg/kg | ESCC 300 mg/kg | HCTZ 25 mg/kg |
|------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Ureia | 38.68 ± 0.68 | 51.80 ± 1.07 ^a | 41.23 ± 1.50 | 44.56 ± 1.88 | 45.23 ± 2.12 ^a |
| Creatinina | 0.28 ± 0.01 | 0.30 ± 0.00 | 0.29 ± 0.00 | 0.32 ± 0.02 | 0.27 ± 0.01 |
| Sódio | 119.63 ± 1.44 | 114.50 ± 1.40 | 118.43 ± 3.19 | 125.54 ± 2.35 | 115.50 ± 0.92 |
| Potássio | 4.98 ± 0.20 | 5.00 ± 0.08 | 4.71 ± 0.19 | 5.68 ± 0.45 | 3.76 ± 0.17 ^a |
| Cloro | 90.90 ± 1.06 | 87.30 ± 1.57 | 88.90 ± 3.34 | 96.60 ± 2.95 | 87.23 ± 0.60 |

Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste *t* de Student. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). ^ap ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida. Ureia e creatinina expressos em mg/dL. Sódio, potássio e cloro expressos em mmol.L⁻¹.

Quando analisadas no soro, os valores de ureia foram significativamente maiores nos animais tratados com o ESCC (30 mg/kg) ou com a HCTZ (25 mg/kg). O aumento da ureia é observado como reação adversa dos diuréticos tiazídicos e seu aumento relaciona-se à redução do volume extracelular causado pelos diuréticos (BATLOUNI, 2009). Além disso, quando comparados ao grupo controle os

animais tratados com a HCTZ apresentam uma significativa redução nos níveis do potássio sérico, outra reação adversa induzido por diuréticos tiazídicos (DUARTE; COOPER-DEHOFF, 2010).

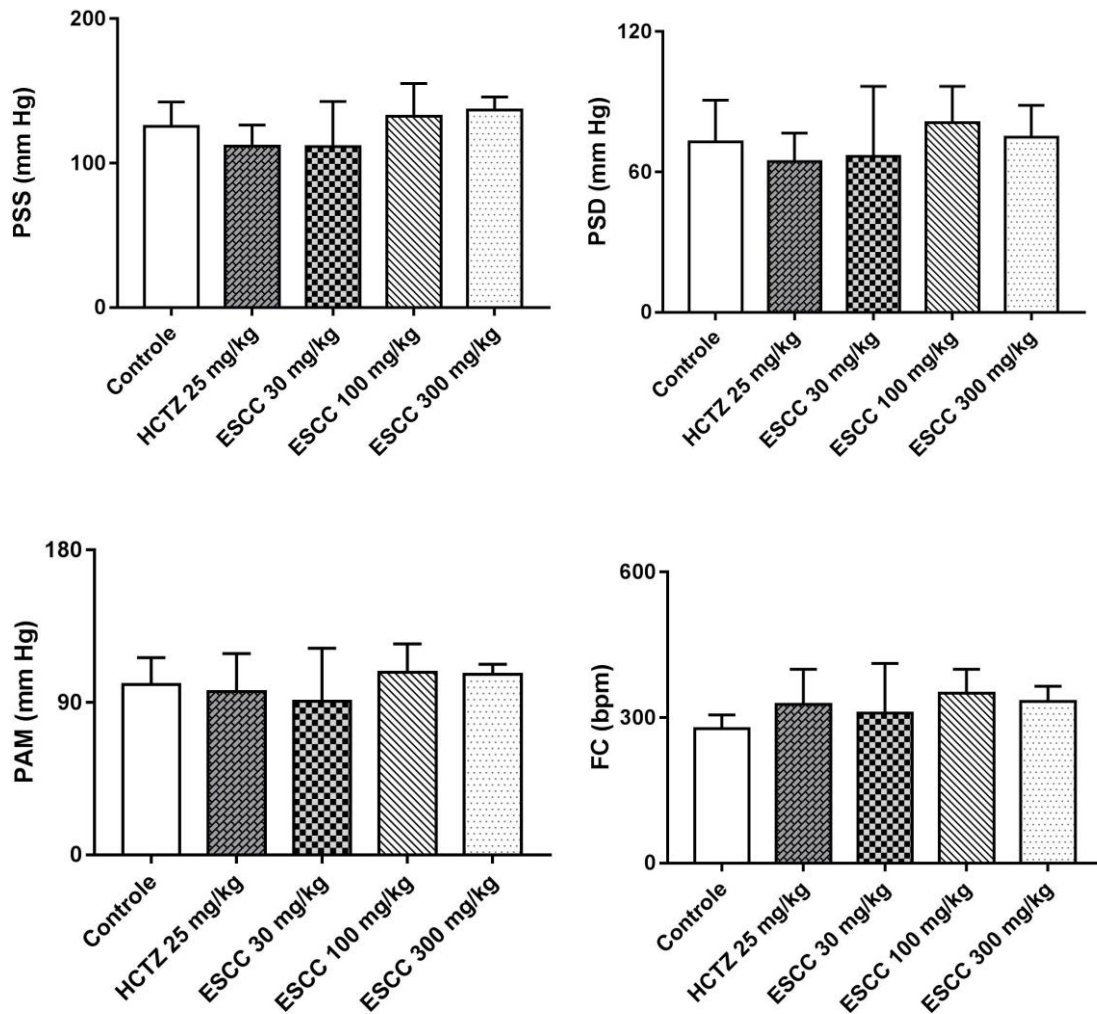
De um modo geral, os valores baixos de volume urinário excretado pelos animais tratados com o ESCC nas doses de 100 e 300 mg/kg podem estar relacionados aos valores baixos de excreção renal de Na^+ e Cl^- , visto que o acúmulo de NaCl atrela-se ao aumento do volume extracelular. O volume extracelular é explicado pela osmolalidade do líquido bem como pela maior secreção de hormônio antidiurético através do mecanismo secretor hipotálamo-hipófise. Resultados diuréticos não observados podem ser devidos a ativação de outro tipo de mecanismos de compensação fisiológica, como a secreção do hormônio antidiurético, que culminam na diminuição do volume de líquido extracelular. Outra hipótese a ser considerada é de um possível efeito diurético aparecer após a adaptação hemodinâmica renal aos tratamentos realizados, o que pode ser observado no efeito diurético tardio da dose de 30 mg/kg do ESCC no sétimo dia (GUYTON; HALL, 2006; BALMACEDA et al., 2018).

5.2.3 Avaliação da atividade hipotensora aguda

Os dados da atividade hipotensora dos grupos tratados com o controle, HCTZ (25 mg/kg), ESCC (30, 100 ou 300 mg/kg) estão apresentados na Figura 10.

Nenhum dos tratamentos realizados foram capazes de promover quaisquer alterações significativas nos níveis de pressão arterial ou frequência cardíaca em comparação com os animais do grupo controle. De um modo geral, os diuréticos tiazídicos podem apresentar seus efeitos na redução da pressão arterial em cerca de 4 semanas, ou em uma minoria de casos, uma redução máxima na pressão arterial é vista num período de 12 semanas. Portanto, não há como prever a atividade anti-hipertensiva baseada na duração ou gravidade da hipertensão (GOODMAN; GILMAN, 2010). No período analisado (7 dias) as administrações de hidroclorotiazida não foram capazes de diminuir a pressão arterial com diferenças significativas. No entanto, em ambos os dias foi possível notar redução da PSS, PSD e PAM podendo sugerir que no período avaliado o fármaco não atingiu sua atividade anti-hipertensiva máxima.

Figura 10 - Efeitos da administração oral prolongada do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratos machos Wistar.



Legenda: Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os tratamentos com a HCTZ foram comparados com o controle utilizando o teste t de Student. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$). $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida; PSS: pressão sanguínea sistólica; PSD: pressão sanguínea diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca.

Fonte: a autora.

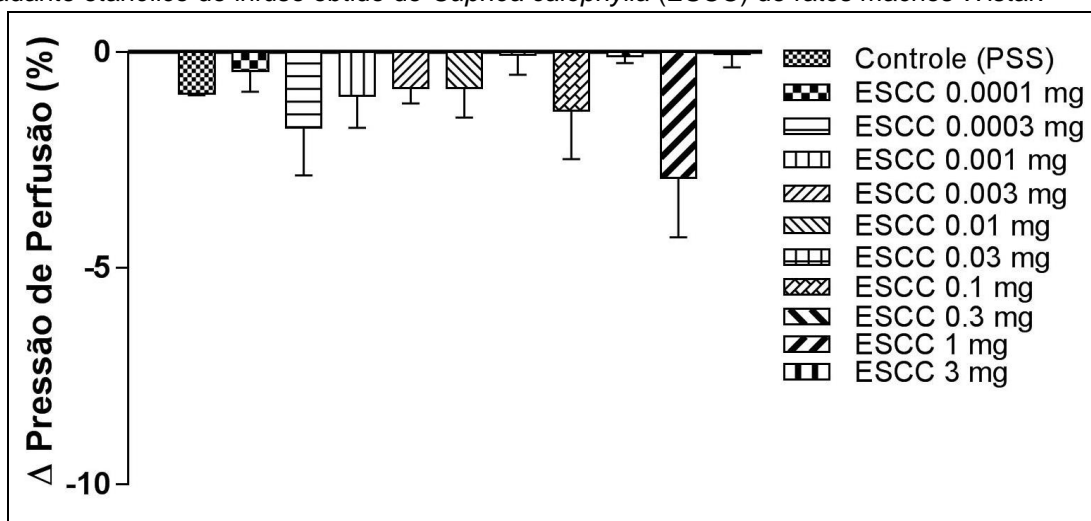
Cuphea carthagenensis apresentou atividade anti-hipertensiva em um estudo realizado *in vitro* que analisou a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Estudo *in vivo* realizados com o extrato aquoso obtido de *C. carthagenensis* mostrou efeitos hipotensores em ratos (VIEL, 1998). O efeito hipotensor do extrato de *C. carthagenensis* em ratos normotensos também foi mostrado por Krepsky (2011). Foi administrada a fração n-butanólica do extrato de *C. carthagenensis* nas doses de 10 e 100 mg/kg e observado a resposta hipotensora por 2 horas. Além disso, as folhas de *C. carthagenensis* obtiveram uma taxa de inibição de 50% da

enzima conversora da angiotensina plasmática (BRAGA et al., 2000). Outra espécie do gênero, *C. glutinosa* reduziu a atividade de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ nas membranas isoladas do coração de ratos. Atualmente, inibidores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ são empregados no tratamento de doenças cardíacas em virtude de seus efeitos ionotrópicos cardíacos (ZAGO, et al., 2018). Contudo, apesar de outras espécies do gênero *Cuphea* apresentar efeitos hipotensores tanto *in vitro* como *in vivo*, e mesmo com a dose de 30 mg/kg do extrato de *C. calophylla* mostrar um decréscimo na PSS, PSD e PAM os resultados não foram de relevância significativa nestas condições experimentais.

5.2.4 Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido

A ação do ESCC em leito mesentérico vascular foi comparada com o resultado obtido da preparação controle perfundida apenas com o veículo (solução salina fisiológica – PSS). No entanto, através da figura 11 é possível observar que nenhuma das doses do ESCC (0,0001; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 mg) foram capazes de induzir respostas vasodilatadoras significativas. Dessa maneira, não houve investigação dos mecanismos moleculares envolvidos.

Figura 11 - Investigação dos efeitos vasodilatadores em leito mesentérico isolado e perfundido do sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* (ESCC) de ratos machos Wistar.



Legenda: Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (n = 5). PSS: Solução Salina Fisiológica.

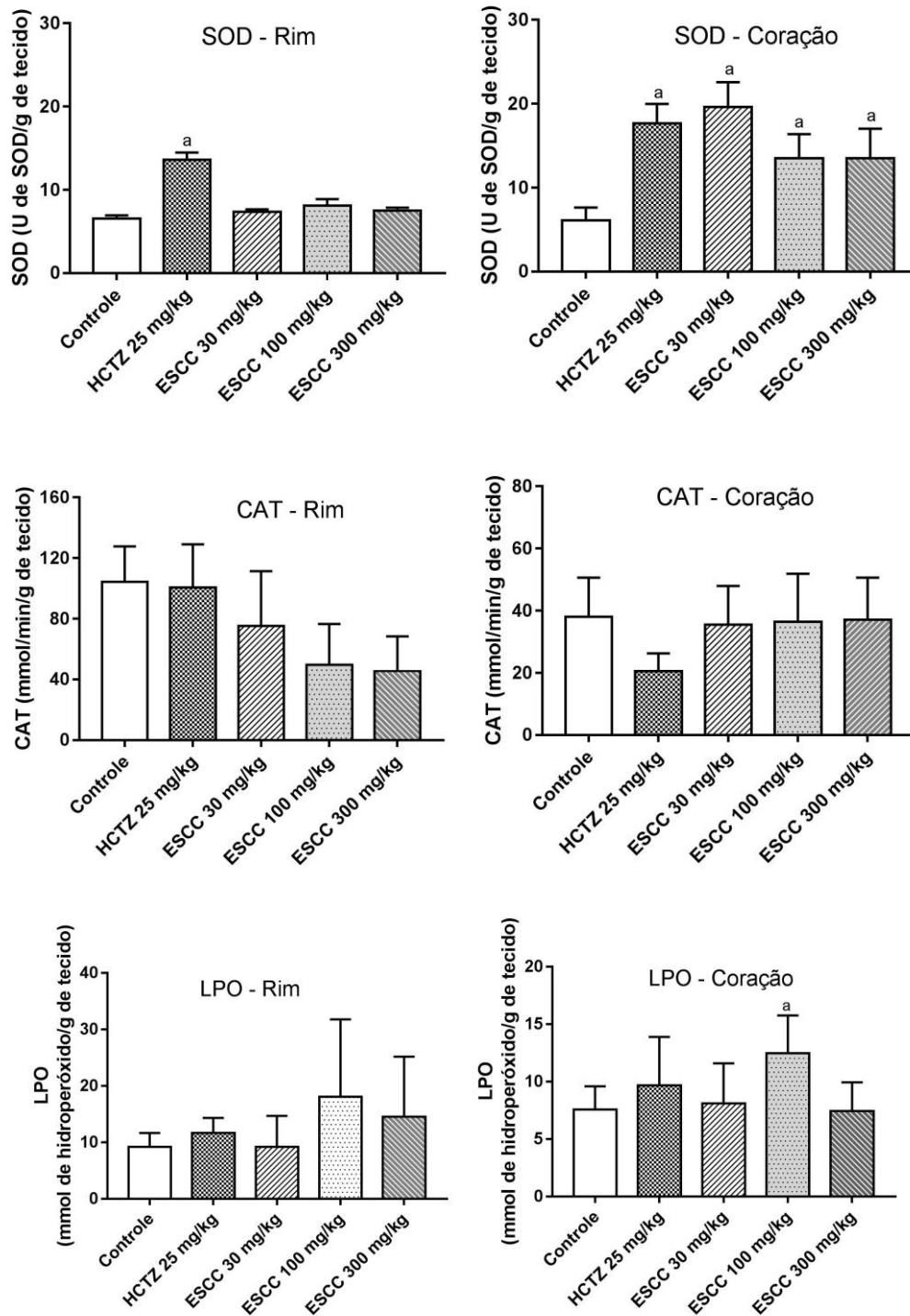
Fonte: a autora.

Um estudo realizado por Schaedler et al. (2018), utilizando leite mesentérico vascular, demonstrou que o sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea carthagenensis* nas doses 0,003; 0,01 e 0,03 mg foi capaz de induzir importante resposta vasodilatadora. Além disso, os dados mostraram que esse efeito é dependente da liberação do óxido nítrico vascular e da ativação subsequente dos canais de potássio. O efeito vasorrelaxante de *Cuphea carthagenensis* também foi constatado por Schuldt et al. (2000). A fração butanólica do extrato mostrou efeito vasodilatador por dois mecanismos distintos, sendo um dependente do endotélio e envolvendo a liberação de óxido nítrico, e outro independente do endotélio. Da mesma forma, a ação vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* foi encontrada por Krepsky et al. (2012) em anéis de aorta de ratos. Além disso, os autores demonstraram a relação da atividade vasodilatadora com os teores de flavonóides, proantocianidinas, taninos e fenólicos totais encontrados na espécie.

5.2.5 Avaliação do potencial antioxidante

Os resultados do potencial antioxidante dos grupos tratados com o controle, HCTZ (25 mg/kg) e ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) estão apresentados na figura 12.

Figura 12 - Efeitos da administração oral sobrenadante etanólico do infuso de *Cuphea calophylla* (ESCC) na avaliação do potencial antioxidante



Legenda: Para os tratamentos com o ESCC, a análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). ^ap < 0,05. SOD: superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína); CAT: catalase (mmol/min/mg de proteína); LPO: hidropéroxido lipídico (mmol de hidropéroxido/mg de proteína); HCTZ: hidroclorotiazida. Fonte: a autora.

De acordo com os dados apresentados, na realização da avaliação do potencial antioxidante com a enzima superóxido dismutase (SOD) presentes no tecido renal, os grupos tratados com o ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) tiveram valores discretamente aumentados (7.36, 8.10 e 7.48 U de SOD/g de tecido, respectivamente) em comparação com o grupo controle (6.53 U de SOD/g de tecido), no entanto sem apresentar diferenças estatisticamente significativas. O grupo tratado com a HCTZ apresentou 13.61 U de SOD/g de tecido renal exibindo diferença significativa em comparação ao grupo controle. Por outro lado, no tecido cardíaco, os grupos tratados com o ESCC nas três doses utilizadas (30, 100 e 300 mg/kg), apresentaram expressivas alterações sobre a atividade da SOD em relação ao grupo controle. De forma interessante, a dose de 30 mg/kg do ESCC apresentou um valor relativamente superior (19.64 U de SOD/g de tecido) em comparação ao grupo tratado com a HCTZ (17.66 U de SOD/g de tecido).

Na avaliação da atividade antioxidante através da enzima catalase (CAT) não foi observado, no rim ou no coração, ações expressivas do ESCC (nas três doses utilizadas) ou da HCTZ em relação ao grupo controle. Em ambos os tecidos os grupos tratados com o ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) e com HCTZ tiveram valores menores quando comparados ao controle.

Na avaliação da peroxidação lipídica, realizada através da medida do hidroperóxido lipídico (LPO), foi possível observar que no tecido cardíaco os animais tratados com o ESCC (na dose de 100 mg/kg) apresentaram valores significativamente maiores que os encontrados no grupo controle. Em todos os outros grupos experimentais ou tecidos, não foram encontradas alterações estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle.

O estresse oxidativo pode ocorrer devido a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO's), e com isso a atividade antioxidante pode diminuir. A exemplo disso, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) atuam na disfunção endotelial, na hipertensão arterial sistêmica e na aterosclerose. Por outro lado, a fim de atenuar as agressões desses agentes, o sistema antioxidante produz enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). A SOD converte o radical reativo $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 que por sua vez é metabolizado pela CAT ou pela glutathiona peroxidase (GPx). Nas doenças cardiovasculares como a hipertensão, o estresse oxidativo induz ao aumento dos níveis de angiotensina II/ aldosterona, H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, além de diminuir a atividade da

SOD, os níveis de GSH e de vitamina E, importantes agentes antioxidantes (LUBRANO, et al., 2015; VERMA, et al., 2018; TALEB, et al., 2018).

Em nosso trabalho, avaliando amostras de tecido cardíaco, verificamos que a SOD apresentou um aumento relevante de sua atividade, em comparação com o grupo controle, após o tratamento com o ESCC. Acreditamos que esse efeito pode ser decorrente de uma atividade antioxidante do extrato de *Cuphea calophylla*, ou ainda, uma resposta contrarreguladora ao aumento da peroxidação lipídica evidenciada. De fato, o extrato de outra espécie de *Cuphea* (*C. carthagenensis*) também aumentou significativamente a atividade da SOD nas doses de 100 e 300 mg/kg (SCHAEDLER, et al., 2018). Além disso, esse extrato também apresentou expressiva atividade antioxidante *in vitro* (PRANDO, et al., 2015). Outro estudo recente demonstrou a capacidade antioxidante de *Cuphea glutinosa in vitro*, além da proteção contra a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio e H₂O₂, demonstrando que os extratos de *Cuphea glutinosa* podem ser utilizados como potenciais agentes no controle de doenças cardiovasculares e alterações oxidativas (ZAGO, et al., 2018).

Nas plantas, compostos fenólicos desempenham importantes atividades biológicas bem como ação antioxidante (SOUZA, et al., 2018). Moustafa et al. (2018) isolaram do extrato hidroalcoólico de *Cuphea ignea* A. DC., a cumarina 5-O-p-glucopiranosídeo 7-hidroxi-3-metoxi, com estrutura rara que inibiu significativamente a produção de ERO's. Compostos fenólicos também foram encontrados em *Cuphea aequipetala* var. *hispida* Koehne, *Cuphea lanceolata* W.T.Aiton, *Cuphea glutinosa*, *Cuphea carthagenensis* e *Cuphea calophylla*. (CARDENAS-SANDOVAL, et al., 2012; BARBOZA, et al., 2016; ZAGO, et al., 2018; RAMÍREZ-ATERHORTÚA, et al., 2018).

Embora os resultados encontrados nestas condições experimentais demonstrem que o ESCC (na dose de 100 mg/kg) não foi capaz de inibir a peroxidação lipídica no coração de ratos machos da linhagem Wistar, em um estudo realizado por Jiménez et al. (2015) que avaliou a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico de plantas medicinais anti-inflamatórias da Colômbia, foi constatado que *Cuphea calophylla* apresenta capacidade de inibir a peroxidação lipídica. Além desse achado, um grupo de investigação de substâncias bioativas da Colômbia verificou que o extrato hidroalcoólico de *Cuphea calophylla* reduziu significativamente os níveis de ERO's em macrófagos induzidos por

lipopolissacarídeos (LPS), atrelando o resultado com o alto conteúdo de compostos fenólicos encontrados (RAMÍREZ-ATEHORTÚA, et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas descritas da folha e caule de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* contribuem para identificação e diferenciação da espécie vegetal e auxiliam na taxonomia do gênero e família. Além disso, os testes histoquímicos contribuíram na localização de compostos fenólicos, lipofílicos, lignificados e grãos de amido em *C. calophylla*.

O sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (ESCC) 2000 mg/kg não apresentou efeitos tóxicos agudos, nem diferenças significativas no peso relativo dos órgãos ou divergências relevantes no comportamento dos animais, estimando-se portanto, DL₅₀ acima de 2000 mg/kg.

O sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (ESCC) nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não apresentou atividade diurética aguda expressiva. No entanto, na diurese prolongada a dose de 30 mg/kg do ESCC promoveu uma diurese tardia observada no sétimo dia.

De acordo com a avaliação dos eletrólitos na diurese aguda e prolongada em nenhuma dose do ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) apresentou uma redução expressiva na excreção de sódio e cloreto. Ademais, nenhum dos tratamentos realizados com o ESCC (30, 100 e 300 mg/kg) foi capaz de promover efeitos hipotensores ou vasodilatores.

Na avaliação do potencial antioxidante, o sobrenadante etanólico do infuso obtido de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (ESCC) nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não alterou a atividade da enzima catalase (CAT) no tecido renal e cardíaco e não inibiu significativamente a peroxidação lipídica. Por outro lado, nas três doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg), o ESCC foi capaz de induzir um importante aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em tecido cardíaco.

Concluindo, os resultados encontrados expressam a relevância na identificação e diferenciação botânica de *C. calophylla* subsp. *mesostemon* visto que espécies de *Cuphea* são similares quanto a seus caracteres morfoanatômicos e popularmente empregados para os mesmos usos. No entanto, observou-se que *C. calophylla* subsp. *mesostemon* não deve ser usada com ação diurética, hipotensora e vasodilatadora em substituição de outras espécies do gênero, uma vez que não apresenta as mesmas ações farmacológicas nas condições experimentais realizadas.

REFERÊNCIAS

- AL DISI, S. S.; ANWAR, M. A.; EID, A. H. Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action: Part I. **Frontiers in Pharmacology**, v.6, p.323-333, 2016.
- AMARASINGHE, V.; GRAHAM, S. A.; GRAHAM, A. Trichome morphology in the genus *Cuphea* (Lythraceae). **Botanical Gazette**, v.152, n.1, p. 77-90, 1991.
- BALMACEDA, R. B.; CARDINALI, F. J.; THEVENON, M. A.; SANTO, M. E. Efecto diurético de *Cuphea glutinosa* Cham. et Schltld (Lythraceae) en ratas Wistar. **Dominguezia**, vol.34, n.1, out. 2018.
- BARBER, J. C.; GHEBRETINSAE, A.; GRAHAM, S. A. An expanded phylogeny of *Cuphea* (Lythraceae) and a North American monophyly. **Plant Systematics and Evolution**, vol. 289, p. 35–44, 2010.
- BARBOZA, L. N.; LÍVERO, F. A. R.; PRANDO, T. B. L.; RIBEIRO, R. C. L.; LOURENÇO, E. L. B.; BUDEL, J. M.; SOUZA, L. M.; ACCO, A.; DALSENTER, P. R.; GASPAROTTO-JUNIOR, A. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F.Macbr.in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.187, p.134–145, abr.2016.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária, vol.2, p. 377, Viçosa, 1991.
- BATLOUNI, M. Diuréticos. **Revista brasileira hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 211-214, 2009.
- BEERS, R. F.; SIZER, I. W. ASpectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133–140. 1952.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Eames, p.326, The Iowa State University Press, 1976.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.93, p.385-389, 2004.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. Annual Review Plant. Physiology **Plant Molecular Biology**, vol. 54, p.519–546, 2003.

BOLSON, M.; HEFLER, S. M.; CHAVES, E. I. D.; GASPAROTTO, A.; CARDOZO, E. L. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.161, p.1-10, 2015.

BRAGA, F. C.; WAGNER, H, A.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, vol.7, p.245–250, 2000.

BURQUE, R. K.; FRANCESCONI, L. P.; VICTORINO, A. T.; MASCARENHAS, M. A.; CERESÉR, K. M. Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 12, n.1, p.1–10, Porto Alegre, 2015.

CARDENAS-SANDOVAL, B. A.; LÓPEZ-LAREDO, A. R.; MARTÍNEZ-BONFIL, B. P.; BERMÚDEZ-TORRES, K.; TREJO-TAPIA, G. Avances en la fitoquímica de *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* y *C. lanceolata*: Extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante. **Revista mexicana de ingeniería química**, v. 11, n. 3, p. 401-413, 2012.

CAVALCANTI, T. B., GRAHAM, S. *Cuphea* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8735>>. Acesso em: 22/05/2017.

DEGEN, R.; SORIA, N.; ORTIZ, M.; BASUALDO, I. Problemática de nombres communes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay. **Dominguezia**, vol. 21, p.11-16, 2005.

DIPAK, K. P.; SWATI, N. D.; HARDIK, P. G.; RANJITSINH, V. D.; RAMACHANDRAN, A. V. Cardio protective effect of *Coriandrum sativum* L. on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, vol.50, p.3120–3125, 2012.

DUARTE, J. D.; COOPER-DEHOFF, R. M. Mechanisms for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 8, n. 6, p. 793-802, 2010.

ESC. European Society of Cardiology. ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, 00, p.1–98, 2018.

ESPINOSA, J. F. P.; GARCÍA, O. A.; VALENCIA, G. G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.151, p.990–998, 2014.

FACCO, M. G. Estudo taxonômico do gênero *Cuphea* P. Browne (Lythraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), Porto Alegre, 2015.

FILICHKIN, S. A.; SLABAUGH, M. B.; STEVEN J. K., New FATB thioesterases from a high-laurate *Cuphea* species: Functional and complementation analyses. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol.108, p.979–990, 2006.

FIRMO, W. C. A.; MIRANDA, M. V.; COUTINHO, G. S. L.; SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Publicação UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.20, n.1, p.7-12, Ponta Grossa, 2014.

GAO, S. J.; ZHAO, G. C.; LUO, G. M.; YANG, T. S.; SHEN, J. C. Antioxidant effects of superoxide dismutase and horseradish peroxidase on lipid peroxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 864, p. 284–287, 1988.

GASPAROTTO, A.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L.; STEFANELLO, M. E.; KASSUYA, C. A.; MARQUES, M. C. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.517-522, 2009.

GBIF. **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em:< <https://www.gbif.org/species/search?q=> >. Acesso em: 03/09/2018.

GODFRAIND, T. Calcium-channel modulators for cardiovascular disease. **Expert Opin Emerg Drugs**, v.11, p.49-73, 2006.

GOMAA, A. M. S.; ABDELHAFEZ, A. T.; AAMER, H. A. Garlic (*Allium sativum*) exhibits a cardioprotective effect in experimental chronic renal failure rat model by reducing oxidative stress and controlling cardiac Na⁺/K⁺-ATPase activity and Ca²⁺ levels. **Cell Stress and Chaperones**, vol.23, p.913-920, set.2018.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. ed.11, p.655-686; 705-734, Mc Graw Hill, 2010.

GRAHAM, S. A.; FREUDENSTEIN, J. V.; LUKER, M. A phylogenetic study of *Cuphea* (Lythraceae) based on morphology and nuclear rDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v.31, n.4, p.764-778, 2006.

GUYTON, ARTHUR C.; HALL, JOHN E. Tratado de fisiologia médica. ed.11, p.216-231, Elsevier, Rio de Janeiro. 2006.

HERNÁNDEZ, E. A. G.; SEGURA-COBOS, D.; AMATO, D.; GUILLERMO ÁVILA-ACEVEDO, J. G.; VÁZQUEZ-CRUZ, B. Evaluation of antihypertensive and vasorelaxant effects of *Heimia salicifolia* (family: Lythraceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.12, n.3, p.41-51, Tlalnepantla, México, 2018.

HERNÁNDEZ, E. A. G.; SEGURA-COBOS, D.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, P. Plants present in Mexico with studies in metabolic syndrome. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol.4, n.6, p. 95-103, 2016.

JIMÉNEZ, N.; CARRILO-HORMAZA, L.; PUJOL, A.; ÁLZATE, F.; OSORIO, E.; LARA-GUZMAN, O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 272-279, 2015.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. McGraw Hill Book, New York, 1940.

KAU, S. T.; KEDDIE, J. R.; ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rat. **Journal Pharmacology Methods**, v.11, n.1, p.67-75, 1984.

KAWASAKI, H.; TAKASAKI, K.; SAITO, A.; GOTO, K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v.335, n.6186, p.164-167, 1988.

KAWASAKI, H.; NUKI, C.; SAITO, A.; TAKASAKI, K. NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. **American Journal of Physiology**, v.261, n.3, p.683-90, 1991.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**, vol.3, São Paulo: BASF, 1991.

KREPSKY, P. B., ISIDÓRIO, R. G., SOUZA-FILHO, J. D., CÔRTEZ, S. F., BRAGA, F. C. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, vol.19, p.953– 957, 2012.

KREPSKY, P. B. Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea Carthagenensis* (jacq.) Macbride. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALLI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**, p.23–67, Kerala, India, 2006.

LERSTEN, N. R.; CZLAPINSKI, A. R.; CURTIS, J. D.; FRECKMANN, R.; HORNER, H. T. Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: overview and selected survey. **American Journal of Botany**, vol.93, n.12, p.1731–1739, 2006.

LERSTEN, N. R.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). **Plant Systematics and Evolution**, v.224, p.83-96, 2000.

LIPSCHITZ, W. L.; HADDIAN, Z.; KERPSCAR, A. Bioassay of diuretics. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol.79, n.2, p.97-116, 1943.

LITTLE, A. A.; STOCKEY, R. A.; KEATING, R. C. Duabanga-like leaves from the Middle Eocene Princeton chert and comparative leaf histology of Lythraceae sensulato. **American Journal of Botany**, vol.91, n.7, p.1126–1139, 2004.

LÍVERO, F. A.; MENETRIER, J. V.; LOURENÇO, E. L. B.; GASPAROTTO, A. Cellular and Molecular Mechanisms of Diuretic Plants: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. **Bentham Science**, vol.23, p.1247-1252, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.512, 2008.

LUBRANO, V.; BALZAN, S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. **World journal of experimental medicine**, v. 5, n. 4, p. 218, 2015.

LUSA, M. G.; BIASI, L. A. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.52-57, 2011.

LUSA, M. G.; BONA, C. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae). *Acta Botanica Brasilica*, vol.25, n.2, p.517-527, São Paulo, 2011.

MACHÍN, M. P.; OYARZUN, M. L. S.; CÁRDENAS, C. M. A. B.; RODRÍGUEZ, F. J. M.; FAZ, C. E. M. Validación de un método in vivo para evaluar la actividad diurética. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, vol.30, n.3, Ciudad de la Habana, 2011.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Journal of Natural Products**, v. 25, n. 4, p.320-331, 1962.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. Instituto do Coração (InCor) – HCFMUS. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, vol.99, n.2, p.755-761, São Paulo, 2012.

MERIC, C. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe *Inuleae* (Asteraceae). **Acta Biologica Cracoviensia**. Series Botanica, v.5, p.105-110, 2009.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. **Anatomy Of The Dicotyledons**, vol.1, Clarendon Press, Oxford, 1950.

MIGACZ, I. P.; RAESKI, P. A.; ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; NISGOSKI, S.; MUNIZ, G. I. B.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Comparative leaf morphology of six species of *Eucalyptus* cultivated in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.28, n.3, Curitiba, 2018.

MOUSTAFA, E. S.; SWILAM, N. F.; GHANEM, O. B.; HASHIM, A. N.; NAWWAR, M. A.; LINDEQUIST, U.; LINSCHIED, M. W. A coumarin with an unusual structure from *Cuphea ignea*, its cytotoxicity and antioxidant activities. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 4, p. 241-243, 2018.

NEGI, P. S.; SINGH, R.; DWIVEDI, S. K. Evaluation of Antihypertensive Effect of Fruit Beverage of *Crataegus crenulata* Roxb.: A wild Shrub of Himalayan Hills. **Defence Life Science Journal**, vol.3, N.2, p.146-150, 2018.

NITHA, A.; PRBHA, S. P.; ANSIL, P. N.; LATHA, M. S. Methanolic extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers ameliorates carbon tetrachloride-induced chronic hepatic fibrosis in rats. **Toxicology and Industrial Health**. Georgian Court University, New Jersey. 2014.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for Testing of Chemical**, Guideline 425, in:OECD (Ed.), Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008a.

PALAZZI, E. G.; PITUCO, E. M.; VICENTE, E. J.; HANSEN, D.; FELICIO, J.; LIMA, M. S.; NOGUEIRA, A. H. C.; STEPHANO, E.; OKUDA, L. H.; ANGELO, M. Avaliação do extrato etanólico de casca de *Punica granatum* (romã) na diminuição da replicação viral do BoHV-1 Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados. Animal pathology. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-9, São Paulo, 2015.

PANDEY, A. K.; SINGHI, E. K.; ARROYO, J. P.; IKIZLER, T. A.; GOULD, E. R.; BROWN, J.; BECKMAN, J. A.; HARRISON, D. G.; MOSLEHI, J. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor–Associated Hypertension and Vascular Disease. **American Heart Association**. Hypertension, vol.71, p.e1-e8, 2018.

PETIOT, E. V.; FORD, I.; GREENLAW, N.; FERRARI, R.; FOX, K. M.; TARDIF, J. C.; TENDERA, M.; TAVAZZI, L. Cardiovascular event rates and mortality according to achieved systolic and diastolic blood pressure in patients with stable coronary artery disease: an international cohort study. **The Lancet**, vol.388, p.2142-4152, 2016.

PRANDO, T. B. L.; BARBOZA, L. N.; GASPAROTTO, F. M.; ARAÚJO, V. O.; TIRLONI, C. A. S.; SOUZA, L. M.; LOURENÇO, E. L. B.; GASPAROTTO, A. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.174, p.369–378, 2015.

RAMÍREZ-ATERHORTÚA, A. M.; MORALES-AGUDELO, L.; OSORIO, E.; LARA-GUZMÁN, A. J. The Traditional Medicinal Plants *Cuphea calophylla*, *Tibouchina kingii*, and *Pseudo lephantopus spiralis* Attenuate Inflammatory and Oxidative Mediators. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2018, p. 1-11, 2018.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rang & Dale. **Farmacologia**, ed.8, p.605-637, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense. Lythraceae**. Publicação. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1969.

RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, vol.52, p.2023–2032, 2001

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v.61, n.2, p.33-36, 1972.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2.ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SABIO, R. Hipertensión arterial y adherencia al tratamiento: la brecha entre ensayos clínicos y realidad. **Revista Cubana de Salud Pública**, vol.44, n.3, p.e1233, 2018.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATIO, A.; Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol.23, p.99-103, 1995.

SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; AMANO, E.; MESSIAS-REASON, I. J.; BUDEL, J. M. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.25, n.2, p. 85-91, mar/abr. 2015.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Disponível em <<https://www.cardiol.br/>> Acesso em 22/09/2018.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192–205. 1968.

SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K.; COMBRINCK, S.; CARTWRIGHT-JONES, C.; VILJOEN, A. *Lawsonia inermis* L. (henna): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, p.80–103, Pretoria, South Africa, 2014.

SESA/PR – Secretaria da Saúde do Paraná. **Linha guia de hipertensão arterial / SAS**. – 2.ed. – Curitiba: SESA, 2018. Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/>>. Acesso em: 01/10/2018.

SCHAEDLER, M. I.; PALOZI, R. A. C.; TIRLONI, C. A. S.; SILVA, A. O.; ARAUJO, V. O.; LOURENÇO, E. L. B.; SOUZA, L. M.; LÍVERO, F. A. R.; GASPAROTTO, A. Redox regulation and NO/cGMP plus K⁺ channel activation contributes to cardiorenal protection induced by *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in ovariectomized hypertensive rats. **Phytomedicine**, v.51, p. 7-19, dez.2018.

SCHULDT, E. Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M. E.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq. McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.35, p.234–239, 2000.

SCHULDT, E.Z.; FARIAS, M. R.; VALLE, R. M. R.; CKLESS, K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine**, v.11, p.523–529, 2004.

SHOENBERG, M. M.; OLIVEIRA, S. M. C. Morfo e histogênese de flor, fruto e semente em *Cuphea calophylla* spp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig. **Estudos de Biologia**, n.19, p.3-47, 1989.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v.44, p.435–446, 2014.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do Impacto Econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.109, n.1, p.39-46, Rio de Janeiro, 2017.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, V. G. L.; RODRIGUES, P. F.; DUARTE, M. P.; FERNANDO, A. L. Antioxidant migration studies in chitosan films incorporated with plant extracts. **Journal of Renewable Materials**, v. 6, n. 5, p. 548-558, 2018.

TALEB, A.; AHMADA, K. A.; IHSANB, A. U.; QUA, JIA.; LINA, N.; HEZAMC, K.; KOJUA, N.; HUIA, L.; QILONG, D. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 689-698, 2018.

TOLOUEI, S. E. L.; TIRLONI, C. A. S.; PALOZI, R. A. C.; SCHAEGLER, M. I.; GUARNIER, L. P.; SILVA, A. O.; ALMEIDA, V. P.; BUDEL, J. M.; SOUZA, R. I. C.; SANTOS, A. C.; SANTOS, V. S.; SILVA, D. B.; DALSENTER, P. R.; GASPAROTTO-JUNIOR, A. *Celosia argentea* L. (Amaranthaceae) a vasodilator species from the Brazilian Cerrado – Na ethnopharmacological report. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 115-126, jan. 2019.

UPADHYAY, H. C.; SISODIA, B. S.; AGRAWAL, J.; PAL, A.; DAROKAR, M. P.; SRIVASTAVA, S. K. Antimalarial potential of extracts and isolated compounds from four species of genus *Ammannia*. **Medicinal Chemistry Research. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants**, v.23, n.2, p.870-876, Lucknow, India, 2013.

UPTON, R.; GRAFF, A.; JOLLIFFE, G.; LANGER, R.; WILLIAMSON, E. American Herbal Pharmacopeia: Botanical Pharmacognosy – **Microscopic Characterization of Botanical Medicines**. CRC Press, ed.1, Boca Raton, mar. 2011.

VALE, A. A. M.; SILVA, A. N. F.; ALMEIDA, E. B. A família Lythraceae no estado do Maranhão: um potencial taxonômico não explorado. 63º Congresso Nacional de Botânica. **Botânica frente às mudanças globais**, p.10, São Luís, 2012.

VASCONCELOS, P. C. P.; TIRLONI, C. A. S.; PALOZI, R. A. C.; LEITÃO, M. M.; CARNEIRO, M. T. S.; SCHAEGLER, M. I.; SILVA, A. O.; SOUZA, R. I. C.; SALVADOR, M. J.; GASPAROTTO-JUNIOR, A.; KASSUYA, C. A. L. Diuretic herb *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae) promotes sustained arterial pressure reduction and protection from cardiac remodeling on rats with renovascular hypertension. **Journal of Ethnopharmacology**, v.225, n.5, p.126-133, 2018.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Study of use citations agreement and importance of medicinal used species and families to the community of Ponta Grossa neighborhood. **Acta Botanica Brasil**, v.20, p.367-382, Porto Alegre, 2006.

VERMA, S.; NIBHA, S.; PUSHPANK, V.; KN, SHUKLA.; MOHAMMAD, A.; MONISHA, B. Antioxidant enzyme levels as markers for type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Bioassays**, v. 2, n. 4, p. 685-690, 2018.

VIEL, T. A. Ações do extrato aquoso e frações purificadas de *Cuphea carthagenensis* (JACQ.) J.F. MACBR. (SETE-SANGRIAS) em sinapses colinérgicas periféricas. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), p.97, São Paulo, 1998.

WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control, 2011.** Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf>. Acesso em: 10/09/2018.

WILLIAMS, B.; POULTER, N. R.; ROWN, M. J.; DAVIS, M.; MCINNES, G. T.; POTTER, J. F.; SEVER, P. S.; THOM, S. M. British hypertension society guidelines for hypertension management. (BHS-IV): summary. **British Medical Journal**, v.328, p.634-640, 2004.

WOSCH, L.; CRISTINA, D.; CERVIB, C, A.; MOURA, B.; BUDEL, M. J.; AIMBIRÉ, M. S. C. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morphoanatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, n.4, p.328-343, Curitiba Jul/Ago. 2015.

XU, Z., DENG, M. Lythraceae. **Identification and Control of Common Weeds**, v.2, p.765–784, 2017.

ZAGO, A. M.; MANDRON, M. P.; MOREL, A. F.; ZANETTI, G. D. Morfonatomia do caule de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schldl. (Lythraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brazilian, v.19, n.3, p.720-726, jul./set. 2009, Rio Grande do Sul, 2009.

ZAGO, A. M.; CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BOHNERT, C.; FERNANDES, M. C.; MORANDINI, L. M.; COELHO, H. S.; FOGAÇA, A. O.; ANDRADE, C. M.; MOSTARDEIRO, M. A.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. A phytochemical study of the *Cuphea glutinosa* from Southern Brazil: Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and antioxidant properties. **Natural Product Research**, v.21, p.1-6, 2018.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 25 de março de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Investigação etnofarmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de Cuphea calophylla CHAM. & SCHTDL. Subsp. mesostemon (KOEHNE) LOURTEIG*”, registrada sob o protocolo de nº 31/2017, sob a responsabilidade de *Arquimedes Gasparotto Junior* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 17/11/2017.

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>Finalidade</i> | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| <i>Vigência da autorização</i> | 01/04/2018 a 30/10/2020 |
| <i>Espécie/linhagem/raça</i> | <i>Rattus norvegicus - Wistar</i> |
| <i>Nº de animais</i> | 50 |
| <i>Peso/idade</i> | 60 dias |
| <i>Sexo</i> | 40 machos e 10 fêmeas |
| <i>Origem</i> | Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD |

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA