



**AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTECTOR DO EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *RUDGEA VIBURNOIDES* BENTH. EM RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR
FERNANDA VIANA PAULIN**

2021

FERNANDA VIANA PAULIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO
CARDIOPROTECTOR DO
EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *RUDGEA
VIBURNOIDES* (CHAM.)
BENTH. EM RATOS COM
HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR**

CAMPO GRANDE – MS

2021



Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade –
Rede Pró-CO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FAFAN



FERNANDA VIANA PAULIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO
CARDIOPROTETOR DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *RUDGEA
VIBURNOIDES* (CHAM.) BENTH. EM
RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade (Área de Concentração: Desenvolvimento de Produtos, Processos e Serviços Tecnológicos) do Campus de Campo Grande da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientadora: Prof.^a Dr.a Denise Brentan da Silva

**CAMPO GRANDE – MS
2021**

Defesa em: 26 de Novembro de 2021.

Banca Examinadora

Prof^ª Dr^ª Denise Brentan da Silva

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Prof. Dr^ª Lais Alves de Souza Bonilha

Prof. Dr^ª Monica Cristina Toffoli Kadri

Prof. Dr^ª Priscila de Souza

Prof. Dr^ª Bruna Paola Murino Rafacho (Suplente)

Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha querida e especial orientadora Prof.^a Dr.^a Denise Brentan da Silva por ter me transferido, tão generosamente, tantos ensinamentos novos, sempre com muita dedicação, paciência e disponibilidade. Também a agradeço por ter me dado todo apoio necessário à realização e conclusão da pesquisa, por toda compreensão dos percalços que surgiram durante esta caminhada e por não ter permitido que eu me perdesse no meio do caminho.

Meu agradecimento eterno à equipe do Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LEFaC) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), que contribuíram de maneira importantíssima para a realização desta pesquisa, tanto pela valiosa ajuda no experimento com os animais, quanto na participação ativa como equipe multiprofissional no processo prático da pesquisa.

Especial agradecimento ao professor Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD, que acreditou na pesquisa e selou uma parceria tão sólida e generosa. Agradeço também ao colega Rhanany Alan Calloi Palozi, do LEFaC, que coordenou as atividades experimentais com os animais e que tanto me auxiliou na interpretação dos resultados.

Um agradecimento especialíssimo a todos os colegas e técnicos do Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), que me deram todo o suporte técnico para realização das atividades experimentais. Meu muitíssimo obrigada.

Agradeço profundamente ao meu esposo, que além de toda colaboração e parceria, ainda me deu, no meio dessa jornada, meu maior presente, nosso filho Arthur. Agradeço aos meus pais e irmã, que mesmo à distância, me incentivam a estudar e continuar buscando sempre conhecimento e melhor capacitação. Vocês todos foram os pilares fundamentais, tanto pela compreensão e ajuda, quanto pela paciência e amor dedicados a mim.

Por fim, agradeço à Deus, por me conceder a vida, saúde e inteligência para chegar até aqui, me dando a oportunidade de realizar mais uma etapa repleta de boas bagagens e gratidão. Mais uma de tantas que ainda pretendo cumprir.

Obrigada!

O que vale na vida não é
ponto de partida, e sim a caminhada.

Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher.

(Cora Coralina)

PAULIN, Fernanda Viana. Avaliação Do Efeito Cardioprotetor Do Extrato Aquoso Das Folhas De *Rudgea Viburnoides* (Cham.) Benth. Em Ratos Com Hipertensão Renovascular. 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) consiste numa condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. É também o principal fator de risco para as alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo e as alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais. O tratamento para o controle da HAS inclui ações de mudança de estilo de vida e utilização de medicamentos, como diuréticos, simpaticolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina II. Neste contexto, insere-se também o tratamento com administração de fitoterápicos ou a utilização de plantas medicinais em formas de chás, infusão e macerações. Sabe-se, que algumas substâncias químicas presentes em determinadas plantas são associadas com a prevenção ou tratamento das doenças cardiovasculares (DCV), por exemplo *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. é pertencente a família Rubiaceae, popularmente conhecida como congonha, congonha-de-bugre ou bugre e utilizada na medicina tradicional sob a forma de chá, devido suas propriedades antirreumáticas, diuréticas, hipotensoras e depurativas do sangue. Ela é uma espécie comum do Cerrado e potencial diurético e antioxidante já descritos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da administração prolongada do extrato aquoso obtido de folhas de *Rudgea Viburnoides* (Cham.) Benth. (EARV) no comprometimento do estresse oxidativo, disfunção renal e dano cardiovascular em ratos hipertensos 2K1C. Além disso, também determinar a composição química de EARV através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM). Para tal, o EARV foi obtido através de extração acelerada com solvente e este extrato foi analisado por CLAE-DAD-EM. Além disso, também foi realizado teste de toxicidade aguda em ratos Wistar fêmeas. Foi induzida cirurgicamente, em ratos Wistar machos, a hipertensão renovascular (dois rins, modelo de um clipe). O EARV foi administrado por via oral nas doses de 30, 100 e 300 mg / kg, diariamente durante 28 dias, por 5 semanas após a cirurgia. Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 a função renal foi avaliada por análise de volume e parâmetros urinários, bem como eletrólitos urinários, pH e densidade. No 29º dia, por eletrocardiografia, foram registradas a pressão arterial e a frequência cardíaca. Também foram obtidas amostras de sangue para avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina plasmática e mensuração sérica de Na⁺, K⁺, uréia e creatinina. Posteriormente, foram isolados respectivamente, os leitos vasculares mesentérico e tecido cardíaco para morfometria cardíaca e avaliação da reatividade vascular. Ao final, foram coletadas para avaliação do estresse oxidativo tecidual, amostras da aorta, coração e rim. Através das análises por CLAE-DAD-EM, os compostos identificados em no EARV foram ácido quínico, bem como ácidos clorogênicos, um iridóide glicosilado, flavonóis O-glicosilados, saponinas e um triterpenos. Na avaliação da toxicidade aguda, não foi observado nenhum sinal após o tratamento com dose única de EARV. O tratamento prolongado com EARV em ratos hipertensos foi capaz de preservar a excreção urinária e os níveis de eletrólitos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻) de maneira semelhante ao grupo operado por Sham (controle negativo). Adicionalmente, o tratamento prolongado com EARV foi capaz de reverter as alterações eletrocardiográficas, o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos hipertensos 2K1C, bem como reverter a hipertrofia ventricular esquerda e as alterações na reatividade vascular induzidas pela

hipertensão. Assim, esse efeito foi associado a uma modulação positiva do estresse oxidativo tecidual, ativação da via NO/cGMP e inibição da enzima de conversão da angiotensina, o que indica um potencial mecanismo para os efeitos renais e cardiovasculares de AERV. Assim, pode-se dizer que o tratamento de 28 dias com AERV reduziu a progressão da doença cardiorrenal em ratos hipertensos 2K1C.

Palavras Chave: Anti-hipertensivo; antioxidante; cardioprotetor; diurético; renoprotetor

PAULIN, Fernanda Viana. Evaluation of the Cardioprotective Effect of the Aqueous Extract of *Rudgea Viburnoides* (Cham.) Benth Leaves. In Rats With Renovascular Hypertension. 2020. Thesis (Doctorate in Biotechnology and Biodiversity). Federal University of Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a multifactorial clinical condition characterized by elevated and sustained blood pressure levels. It is also the main risk factor for functional and / or structural changes in target organs and metabolic changes, with a consequent increase in the risk of fatal and non-fatal cardiovascular events. Treatment for the control of SAH includes actions to change lifestyle and use medications, such as diuretics, sympatholytics, vasodilators, calcium channel blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers. In this context, treatment with the administration of herbal medicines or the use of medicinal plants in forms of teas, infusion and macerations is also inserted. It is known that some chemicals present in certain plants are associated with the prevention or treatment of cardiovascular diseases (CVD), for example *Rudgea viburnoides* Benth. it belongs to the Rubiaceae family, popularly known as congonha, congonha-de-bugre or bugre and used in traditional medicine in the form of tea, due to its anti-rheumatic, diuretic, hypotensive and blood purifying properties. It is a common species of the Cerrado and has a diuretic and antioxidant potential already described. The aim of this study was to evaluate the effects of prolonged administration of aqueous extract obtained from *Rudgea Viburnoides* (Cham.) Benth. (AERV) leaves on the impairment of oxidative stress, renal dysfunction and cardiovascular damage in hypertensive 2K1C rats. In addition, also determine the chemical composition of AERV through high performance liquid chromatography coupled to the diode array detector and mass spectrometry (CLAE-DAD-EM). For this, the AERV was obtained through accelerated solvent extraction and this extract was analyzed by HPLC-DAD-EM. In addition, an acute toxicity test was also performed on female Wistar rats. Renovascular hypertension (two kidneys, model of a clip) was surgically induced in male Wistar rats. AERV was administered orally in doses of 30, 100 and 300 mg / kg, for 28 days, daily for 5 weeks after the surgery. On days 1, 7, 14, 21 and 28, renal function was assessed by diuresis, as well as urinary electrolytes, pH and density. On the 29th day, blood pressure and heart rate were recorded by electrocardiography. Blood samples were also obtained to evaluate the activity of the plasma angiotensin-converting enzyme and to measure serum Na^+ , K^+ , urea and creatinine. Subsequently, the cardiac and mesenteric vascular beds were isolated, respectively, for cardiac morphometry and assessment of vascular reactivity. At the end, samples of the aorta, heart and kidney were collected for evaluation of tissue oxidative stress. Through the analysis by HPLC-DAD-EM, the compounds identified in the AERV were quinic acid, as well as chlorogenic acids, a glycosylated iridoid, O-glycosylated flavonols, saponins and a triterpenes. In the assessment of acute toxicity, no sign was observed after treatment with a single dose of AERV. Prolonged treatment with AERV in hypertensive rats was able to preserve urinary excretion and electrolyte levels (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Cl^-) in a similar way to the group operated by Sham (negative control). In addition, prolonged treatment with AERV was able to reverse electrocardiographic changes, increase in blood pressure and heart rate in 2K1C hypertensive rats, as well as reverse left ventricular hypertrophy and changes in vascular reactivity induced by hypertension. Thus, this effect was associated with positive modulation of tissue oxidative stress, activation of the NO / cGMP pathway and inhibition of the angiotensin converting enzyme, which indicates a potential mechanism for the renal and cardiovascular effects of

AERV. Thus, it can be said that the 28-day treatment with AERV reduced the progression of cardiorenal disease in 2K1C hypertensive rats.

Keywords: Antihypertensive; antioxidant; cardioprotective; diuretic; renoprotective

LISTA DE ABREVIATURAS

EARV – Extrato Aquoso Obtido de Folhas de *Rudgea Viburnoides* (Cham.) Benth.

AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico

Ang II – Angiotensina II

AT1 – Receptor de Angiotensina 1

AVE – Acidente Vascular Encefálico

CAT – Catalase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

cGMP - Medição de monofosfato de guanosina cíclico

CLAE-DAD-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de

Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas

DCV – Doença Cardiovascular

DM – Diabetes Mellitus

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDHF = Fator de hiperpolarização dependente do endotélio

EDRF – Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio

EDRF/NO - Fator de relaxamento dependente do endotélio/óxido nítrico

EM/EM – Detector de Massas com análise de Espectrometria de Massas sequencial no espaço

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FGFs - Fatores de crescimento derivados dos fibroblastos

GMPc - Monofosfato de guanosina cíclico

GPx - Glutathione Peroxidase

GSSG - Glutathione oxidada

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IL - Interleucina

MS – Ministério da Saúde

m/z – relação massa/carga

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDGFs - Fatores de crescimento derivados das plaquetas

PGI₂ – Prostaciclina

PKC - Proteinocinase C

PLC - Fosfolipase C

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SOD - Superóxido Dismutase

SRAA – Angiotensina II do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

TxA₂ - Tromboxano A₂

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Figura 1 – Distribuição das espécies de Rubiaceae quanto às formas de vida (hábito) ..	24
Figura 2 - Mapa de distribuição <i>Rudgea viburnoides</i>	27
Figura 3 – <i>Rudgea viburnoides</i> e suas inflorescências	27
Figura 4 - Estruturas químicas de alguns constituintes isolados de <i>R. viburnoides</i>	28
Figura 5 – Fatores de relaxamento e contração	34
Figura 6 – Estrutura do flavonóide quercentina	38
 ARTIGO	
Figure 1 – Base peak chromatograms from leaves aqueous extract of <i>Rudgea viburnoides</i> (AERV) obtained in positive (A) and negative ion modes (B).	58
Figure 2 – Electrocardiographic quantitative data of Sham (S) or 2K1C-hypertensive rats treated with AERV (30, 100 and 300 mg/kg), MPL (20 mg/kg), or vehicle (NC). P (A), Q (B), R (C), S (D) and T-waves amplitudes (E) and P (F), PR (G), QRS (H), QT (I) and QTC-segments (J) are showed. Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. AERV: aqueous extract from <i>Rudgea viburnoides</i> ; MPL: metoprolol; NC: negative control	64
Figure 3 – Prolonged oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> reverses changes in blood pressure and heart rate induced by 2K1C hypertensive rats. SBP (A), DBP (B), MAP (C), and HR (D) are showed. Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. AERV: aqueous extract from <i>Rudgea</i>	

viburnoides; MPL: metoprolol; NC: negative control; S: Sham-operated group..... 65

Figure 4 – Effects of the prolonged oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on mesenteric vascular reactivity of 2K1C-hypertensive rats. Effects of phenylephrine (A), acetylcholine (B), and sodium nitroprusside (C) are showed. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni’s test. ACh: acetylcholine; AERV: aqueous extract from *Rudgea viburnoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control; Phe: phenylephrine; PP: perfusion pressure; SNP: sodium nitroprusside..... 67

Figure 5 – AERV treatment reduces heart histopathological changes induced by 2K1C-hypertensive rats. WT% of the heart (A), and morphometric data of right ventricle posterior wall (B), left ventricle posterior wall (C), and interventricular septum (D) are shown. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni’s test. AERV: aqueous extract from *Rudgea viburnoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control; S: Sham-operated group 68

Figure 6 – Role of NO/cGMP pathway on the vascular effects of AERV. Intracellular cGMP levels from 2K1C-hypertensive rat aortic rings incubated with ESCC (0.003, 0.01, and 0.03 mg/ml) or sodium nitroprusside (SNP), in the absence and in the presence of ODQ (100 μ m) are showed. The results show the mean \pm S.E.M. of 8-10 preparations per group. p < 0.05 vs acontrol (C) or after incubation with bODQ 69

LISTA DE TABELAS

Página

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Medicamentos com princípios ativos de origem vegetal vendidos em farmácias.....	21
Tabela 2 - Anti-hipertensivos: efeitos colaterais	31
Tabela 3 - EROS e os antioxidantes	37

ARTIGO

Table 1 – Metabolites identified from aqueous extract obtained from leaves of <i>R. viburnoides</i> (AERV) by LC-DAD-MS/MS.....	59
Table 2 – Effects of oral administration of ESRV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 1st day of treatment	60
Table 3 – Effects of oral administration of ESRV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 7th day of treatment	61
Table 4 – Effects of oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 14th day of treatment	61
Table 5 – Effects of oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 21st day of treatment	62
Table 6 – Effects of oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 28th day of treatment	63
Table 7 – Effects of oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on serum Na ⁺ , K ⁺ , urea, creatinine, and plasmatic ACE activity on 28th day of treatment.....	66
Table 8 – Effects of oral administration of AERV obtained from <i>Rudgea viburnoides</i> on tissue redox status.....	67

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	15
----------------------------	----

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica	20
2.1. Etnofarmacologia	20
2.2. Família Rubiaceae	22
2.2.1 Gênero da Família Rubiaceae	25
2.2.2. <i>Rudgea viburnoides</i> Benth	26
2.2. Hipertensão Arterial Sistêmica	29
2.2.1. Função Endotelial	32
2.2.2. Estresse Oxidativo	36
2.2.2.a Estresse Oxidativo e Antioxidantes Naturais	36
Referências Bibliográficas	39

CAPÍTULO II

Artigo	47
Abstract	48
1. Introduction	49
2. Material and Methods	51
2.1. Drugs	51
2.2 Phytochemical study	51
2.2.1 Plant material and extract preparation	51
2.2.2 Chemical analyses by LC-DAD-MS	51
2.3 Pre-clinical studies	52
2.3.1 Animals	52
2.3.2 Toxicological assessment	52
2.3.3 Pharmacological studies	53
2.3.3.1 Hypertension induction (Goldblatt model; two kidneys, one clip; 2K1C)	53
2.3.3.2 Experimental design	53
2.3.3.3 Renal function	53

2.3.3.4 Electrocardiography	54
2.3.3.5 Blood pressure assessment	54
2.3.3.6 Biochemical parameters	55
2.3.3.7 Mesenteric vascular beds (MVBs) reactivity	55
2.3.3.8 Relative weight and histopathological analysis of the heart and left ventricle morphometry	55
2.3.3.9 Cardiac and vascular redox status	56
2.3.4 Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) measurement	56
2.4 Statistical analyses.....	56
3. Results	57
3.1 Chemical constituents from AERV	57
3.2 Toxicological findings	59
3.3 Effects on urinary volume and renal electrolyte excretion	60
3.4 Effects on electrical cardiac activity	63
3.5 Effects on blood pressure	64
3.6 Effects on serum parameters	65
3.7 Effects on MVBs reactivity	66
3.8 Effects on cardiac morphology	67
3.9 Effects on cardiac and vascular redox status	68
3.10 Effects on intracellular cGMP levels	69
4. Discussion	70
5. Conclusion	73
References	74

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, são doenças crônicas, não transmissíveis, que se apresentam de formas variadas, como Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) por exemplo, e estão associadas a fatores de risco como dislipidemias, uso de tabaco, álcool, obesidade, sedentarismo, má alimentação, estresse, entre outros (OIGMAN & NADRUZ, 2020).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2019), 34 mortes por hora, 829 óbitos por dia e mais de 302 mil óbitos aconteceram no ano de 2017 em decorrência das doenças cardiovasculares no Brasil (infarto, hipertensão, AVC e outras enfermidades), que têm como principal fator de risco a hipertensão arterial. Ainda segundo o MS (2019), em 2018, 24,7% da população que vive nas capitais brasileiras tem diagnóstico de hipertensão. A parcela da sociedade mais afetada é formada por idosos, sendo esses 60,9% com idade acima de 65 anos.

Incluídos nesse grupo, os hipertensos são os que estão mais predispostos às complicações cardiovasculares, especialmente Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e Acidente Vascular Encefálico (AVE), necessitando, portanto, de abordagem terapêutica mais cuidadosa. (BRITISH CARDIAC SOCIETY, 2005; COLET et al., 2014).

Dados consolidados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde (2019), também mostram que, em 2017, o Brasil registrou 141.878 mortes devido a hipertensão ou a causas atribuíveis a ela. Esse número revela uma realidade preocupante; todos os dias 388,7 pessoas se tornam vítimas fatais da doença, o que significa 16,2 óbitos a cada hora. Grande parte dessas mortes é evitável e 37% dessas mortes são precoces, ou seja, em pessoas com menos de 70 anos de idade. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 23,6 milhões de pessoas irão morrer em decorrência das doenças cardiovasculares nos próximos anos em todo o mundo (TESTON et al., 2016).

A utilização de produtos naturais e/ou derivados destes ainda são considerados fontes promissoras no desenvolvimento de fármacos, principalmente para em algumas áreas em que há números bastantes expressivos. Por exemplo, fármacos para o tratamento de câncer, no período compreendido entre os anos de 1940 e o final de 2014, mostram que das 175 moléculas aprovadas, 131 delas (75%), são originadas de produtos naturais ou derivados. Em outras áreas, a influência dos produtos naturais também é bastante acentuada, como em antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários (COCK, 2015; NEWMAN & CRAGG, 2016).

As plantas medicinais têm sido utilizadas como recurso terapêutico por milhares de anos e continuam a ser uma importante modalidade de tratamento para uma parcela significativa da população mundial. Neste contexto, o uso da fitoterapia e plantas medicinais vêm aumentando nos países ocidentais como tratamento complementar e, às vezes, alternativo, em conjunto com a medicina convencional (LOPES et al., 2010).

Um recente estudo publicado por Newman e Craag (2020), mostra que em 4 décadas, no período entre 01/1981 a 09/2019, 1.881 novos produtos naturais foram descobertos como fontes de novos medicamentos. Entre eles estão os biológicos, peptídeos grandes ou proteínas isoladas de um organismo ou produzidos por meio biotecnológicos em um hospedeiro substituto (346/18,4%); os produtos naturais (71/3,8%); os produtos naturais botânicos – aprovados mais recentemente (14/0,8%); os derivados de um produto natural – geralmente por uma modificação semissintética (356/18,4%); os totalmente sintéticos – mais frequentemente encontrados aleatoriamente ou por modificação de um agente existente (463/24,65); os feitos por síntese total – porém, o farmacóforo derivado de um produto natural (65/3,2%); as vacinas (142/7,5%) e aqueles incluídos nas subcategorias como os que “imitam” os produtos naturais – como alguns no campo da terapia anticâncer, adicionalmente as categorias incluídas na revisões a partir de 2013 (424/22,55%).

Aliar conhecimento popular ao científico na busca de novos fármacos é o caminho principal para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais, o que beneficia não só as famílias que vivem nos ecossistemas florestais, pois podem obter dos recursos naturais e da sua conservação, seu desenvolvimento sustentável, como também para a população geral, por ter acesso a novos e eficazes medicamentos. Isto se mostra, por exemplo, no consumo de plantas medicinais por pessoas acometidas por doenças crônicas, como a HAS. Essas plantas vêm sendo cada vez mais investigadas, objetivando reconhecer seus efeitos terapêuticos, além de possíveis efeitos adversos, toxicidade e assim, fornecer conhecimento científico sobre o uso popular (MORADI et al., 2016).

Esta busca por novos medicamentos derivados das plantas medicinais para o tratamento da HAS, se faz necessária principalmente devido aos efeitos indesejáveis das classes de anti-hipertensivos disponibilizados no Brasil, como fadiga, sonolência, retenção hídrica entre outros. Atualmente, os principais medicamentos disponíveis para o tratamento da HAS são os medicamentos relacionados ao sistema renina angiotensina-aldosterona, que agem sobre o desbalanço redox. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Assim, nesse cenário, devido principalmente aos efeitos indesejáveis das classes de anti-hipertensivos disponibilizados no Brasil, há um exponencial interesse na utilização de plantas medicinais e seus princípios ativos, exaltando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos. Porém, neste mesmo contexto, ainda há uma carência de estudos em ensaios clínicos, que englobem as doenças cardiovasculares e as plantas medicinais para tratamento e/ou prevenção das mesmas. Estes estudos ainda devem se destacar por fornecerem dados importantes sobre o uso e conservação de espécies vegetais, além dos estudos etnobotânicos, farmacológicos e toxicológicos, que forneçam ferramentas importantes na validação do conhecimento popular, contribuição quanto à eficácia e segurança da planta em estudo, sinergismo farmacológico, dificuldade de adesão ao tratamento e refratariedade ao tratamento. (CARNEIRO; SANTOS, 2014; SILVA et al., 2014; SANTOS FILHO, 2013).

Considerando a importância desse tipo de estudo e que *R. viburnoides* Cham. Benth é amplamente utilizada por via oral, principalmente na forma de chá pela população, devido aos seus possíveis efeitos hipotensores, é fundamental investigar se esta espécie é realmente um cardioprotetor na população hipertensa. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a administração prolongada de um extrato aquoso, obtido de folhas de *R. viburnoides* (AERV), sobre comprometimento do status redox, disfunção renal e dano cardiovascular em ratos hipertensos 2K1C.

Desta forma, o Capítulo I deste trabalho destina-se à revisão bibliográfica sobre o assunto e o Capítulo II ao artigo da pesquisa, que foi publicado em 28 de setembro de 2021 em *Pharmaceutics* (<https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1579>).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etnofarmacologia e produtos naturais

A prática de utilização das plantas medicinais é baseada no conhecimento da flora medicinal, pois muitos são os povos que tem convívio direto com a natureza e isso desencadeia com o passar dos tempos uma série de conhecimentos populares que vão se acumulando, e a partir disso, a ação farmacológica das plantas é descoberta. Neste sentido, a etnobotânica aplicada ao estudo das plantas medicinais, trabalha em cumplicidade com a etnofarmacologia, que consiste na exploração científica e interdisciplinar de agentes

biologicamente ativos, que sejam tradicionalmente empregados ou observados por determinado agrupamento humano (LOPEZ, 2006; MORAIS & FILHO, 2007).

No enfoque etnofarmacológico, são selecionadas plantas conforme o uso terapêutico citado por determinado grupo étnico, o que fornece dados para uma pré triagem e orientação bioguiada para as investigações fitoquímicas e farmacológicas, na descoberta de novos ativos para a produção de medicamentos mais acessíveis economicamente falando, além de menores efeitos colaterais (ELISABETSKY & SOUZA, 2010; RODRIGUES & CARLINI, 2003).

De uma forma indireta, o saber tradicional a respeito das plantas medicinais desperta o interesse da comunidade científica nos estudos multidisciplinares como, por exemplo, a etnofarmacologia, botânica, fisiologia vegetal, fitoquímica e farmacologia, que em conjunto, engrandecem o conhecimento a respeito da medicina natural. Assim, a etnofarmacologia pode auxiliar na ampliação do conhecimento acerca das etnoespécies de qualidades terapêuticas para a população (MACIEL et al., 2002).

Como exemplo de sua importância para o desenvolvimento de novos fármacos, pode-se citar os mais de 119 medicamentos de estrutura conhecida que ainda são extraídos de plantas superiores e utilizados mundialmente na medicina alopática, como exemplificado na Tabela 1. Destes, aproximadamente 74% foram descobertos por químicos que tentavam identificar os compostos bioativos nas plantas responsáveis pelos princípios ativos desses fármacos. Esses mais de 119 medicamentos derivados de plantas são produzidos comercialmente a partir de menos de 90 espécies de plantas superiores. Como existem pelo menos 250.000 espécies dessas plantas superiores na Terra, pode-se presumir que muitos mais fármacos serão encontrados no reino vegetal se a busca por esses compostos for realizada de maneira coerente e sistemática (CHADWICK & MARSH, 2008).

Tabela 1. Medicamentos com princípios ativos de origem vegetal vendidos em farmácias

PRODUTO	LABORATÓRIO
Vick Vaporub Lep.M.	Biolab/Searle
Hydergine	Sandoz
Floratil	Merck S.A.
Digoxina	Wellcome Zeneca
Tebonin	Byk Quimica e Farm
Tamarine	Barrenne
Valda	Canonne
Eparema	Byk Quimica e Farm
Naturetti	Mierrell/Lepetit
Passiflorine	Millet-Roux
Buscopan	Boehringer Angeli
Pasalix	Marjan

Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 1998.

Assim, de maneira geral, as folhas de *Rudgea virbunoides* Benth são usadas tradicionalmente no Brasil pela medicina popular na forma de chá devido a suas propriedades anti-reumáticas, antissifílicas, hipotensora, diurética e “depurativa do sangue”, sendo, portanto, um alvo promissor para os estudos químicos e farmacológicos (ALMEIDA, 2011).

Os metabólitos secundários são, em geral, responsáveis pelas propriedades biológicas e farmacológicas de extratos vegetais, sendo estes constituintes normalmente relacionados aos sistemas de defesa das plantas como, por exemplo, contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (CARRIL & GARCIA, 2009; MANACH et al., 2004).

As substâncias naturais bioativas se classificam em quatro principais grupos: as substâncias fenólicas (flavonoides, lignana, cumarinas, fenilpropanoides, taninos e outros), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos), os terpenos (monoterpenos, hemiterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, carotenoides, politerpenos) e os alcaloides. Essas substâncias exercem várias ações do ponto de vista biológico, como, por exemplo, redução da pressão sanguínea, modulação do metabolismo hormonal, estimulação do sistema imune, atividade antioxidante, atividades antibacteriana e antiviral, redução da agregação plaquetária, entre outras (CARRIL & GARCIA, 2009; SIMÕES, 1999).

A partir do século XX, vários produtos naturais foram introduzidos na terapêutica e alguns ainda são utilizados na prática clínica. Por exemplo, em 1897, a Bayer lançou o primeiro fármaco sintético, o ácido acetil salicílico (aspirina®), baseado na salicina, um glicosídeo natural, isolado de *Salix alba* e usado desde os tempos de Hipócrates como anti-inflamatório. Nos tempos atuais, um fármaco muito discutido, a cloroquina, um potente antimalarial, desenvolvido durante a 2ª guerra mundial, também foi derivado de um produto natural, a quinina (BRODY & BRODY, 2000).

A partir disto, surgiu uma nova era na área da farmacologia, em que substâncias isoladas e puras, em vez de extratos puros e semi-puros de plantas, microrganismos e minerais, passaram a ser utilizados como o tratamento padrão para diferentes doenças. Desta forma, muitos compostos bioativos responsáveis pelos efeitos biológicos de extratos foram descobertos e tiveram a sua estrutura química elucidada. Alguns exemplos clássicos de fármacos descobertos desta forma são a morfina, o agente ativo no ópio, e a digoxina, um digitálico oriundo da flor *Digitalis lanata*. Como também, há antibacterianos (como a “penicilina”, por Fleming em 1928) e outras classes de antibióticos que foram descobertos e se tornaram medicamentos com eficácia e comercializado pelas indústrias farmacêuticas (LAHLOU, 2013; RODRIGUES, 2018).

Devido à grande diversidade estrutural e química dos produtos naturais, além de suas importantes propriedades farmacológicas, houve um ressurgimento do interesse pelos produtos naturais nos anos 1990 e 2000, uma vez que entre os novos fármacos no período de 1994 a 2007 quase metade dos compostos aprovados foram baseados em produtos naturais (RODRIGUES, 2018).

2.2 Família Rubiaceae

Descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1789, a família Rubiaceae tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L. (Rubium, em latim), referente à tinta vermelha produzida pelas raízes das plantas deste gênero, muito empregado para tingir tecidos. Na classificação do Reino das Plantas, Rubiaceae está inserida no grande grupo das Angiospermas e representa a quarta família com maior número de espécies vegetais, sendo superada apenas por Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae (SILVA, 2018).

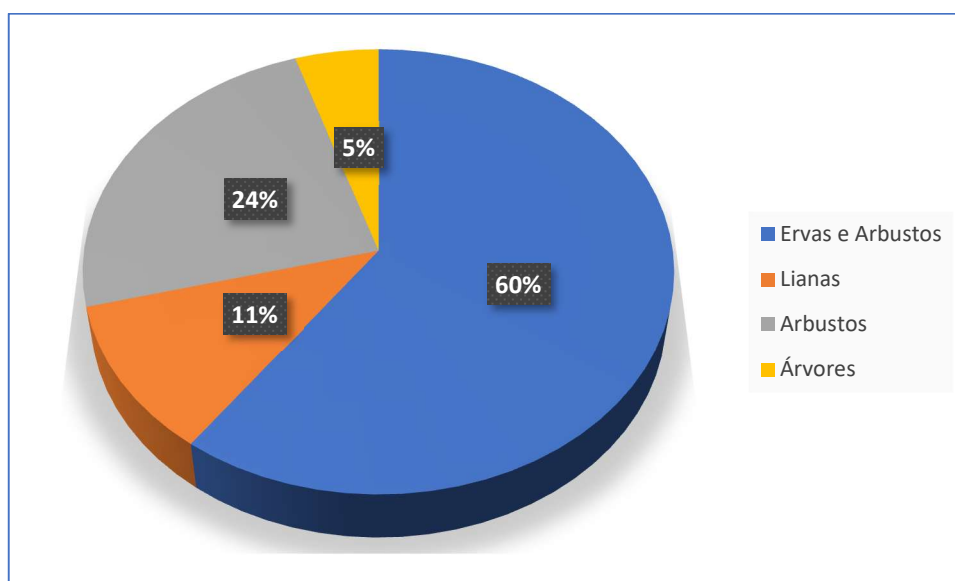
A família Rubiaceae é uma das maiores famílias pertencentes às dicotiledôneas e uma das famílias mais complexas do ponto de vista taxonômico. Fato comprovado pelas inúmeras alterações ocorrentes ao longo dos anos na sua organização interna. Sua

classificação a define pertencente ao grupo das Asteridae, subgrupo das Euasteridae I, ordem Gentianales. Com base em dados moleculares, pesquisas filogenéticas sugerem sua segregação em três subfamílias: Rubioideae (18 tribos), Cinchonoideae (9 tribos) e Ixoroideae (15 tribos) (BALDIN, 2015).

Encontrada nos biomas brasileiros como Mata Atlântica, Cerrado e na Amazônia, está representada por 18 tribos, abrange cerca de 1.400 espécies já descritas no Brasil, as quais pertencem a 120 gêneros. Entre seus exemplares, encontram-se ervas, subarbustos, arbustos, árvores, e em menor representatividade, as lianas (Figura 1). Mais de 80% dos gêneros são constituídos, predominantemente, por espécies lenhosas (SOUZA et al., 2013).

As espécies da família Rubiaceae possuem grande relevância econômica, que são exploradas na utilização popular por suas propriedades alimentícias (como a *Coffea arabica* L. e *C. robusta* que constituem a matéria prima do café), ornamentais (como a *Gardenia* ssp.) e também medicinais (como, por exemplo, a *Psychotria colorata* que possui propriedades analgésicas, e a *Uncaria schreb*, utilizada para tratamento de feridas e infecções causadas por fungos e bactérias). Como fitoterápico, um exemplo é a *Uncaria tomentosa*, conhecida como Unha de Gato, que auxilia no tratamento sintomático de dores articulares e musculares agudas, agindo como anti-inflamatório (VIANNA et al., 2016; BALDIN, 2015; SOUZA & LORENZI, 2005; ANVISA, 2018).

Figura 1. Distribuição das espécies de Rubiaceae quanto às formas de vida (hábito)



Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2013.

A família é quimicamente rica em metabólitos secundários, sendo já descritos iridóides, terpenóides, flavonóides, taninos, quinonas e, principalmente, alcalóides bioativos. Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos nitrogenados, com grande diversidade estrutural e atividade biológica, notadamente como anti-inflamatório, antioxidante e broncodilatador. Além disto, peptídeos macrocíclicos purificados de várias plantas da família Rubiaceae, como o café (*Coffea arabica*) também são encontrados (MARTINS & NUNES, 2015; BALDIN, 2015; PICCHI et al., 2009).

Além das espécies com importância econômica, gastronômica e medicinais, a família Rubiaceae ainda apresenta espécies com propriedades inseticidas, como a *Palicourea marcgravii* St. Hil. Os estudos fitoquímicos envolvendo espécies do gênero *Alibertia* relataram a presença de iridóides, flavonóides, fenóis, alcalóides, taninos, saponinas, ésteres de ácido cafeico, e triterpenos como os ácidos oleanólico e ursólico (SILVA, 2018).

Com distribuição cosmopolita, a família Rubiaceae está centrada nos trópicos, configurando uma das principais famílias da flora nacional e incluem, aproximadamente, 650 gêneros e mais de 13 mil espécies, dentre os quais se destacam os seguintes gêneros em relação ao número de espécies: *Psychoria* (1.500), *Galium* (400), *Ixora* (400), *Pavetta* (400), *Hedyotis* (400), *Terrenna* (350), *Randia* (250), *Gardenia* (250), *Palicourea* (250), *Mussaenda* (200), *Borreria* (150) e *Rondeletia* (125). Das espécies descritas, cerca de 1.400 delas são encontradas no território brasileiro (FERREIRA JUNIOR & VIEIRA, 2015).

Morfologicamente, as espécies dessa família apresentam folhas opostas, simples, eventualmente modificadas em espinhos. Sua inflorescência normalmente é cimosa, podendo formar um glomérulo ou ser reduzida a uma flor. O fruto apresenta formato de cápsula com esquizocarpo, drupa ou baga (SILVA, 2018; SOUZA & LORENZI, 2005).

Com base neste conhecimento, é interessante considerar que, paralelamente aos conceitos teóricos, os efeitos benéficos em relação à saúde, prevenção e ou até mesmo no tratamento das doenças, se dá ao conteúdo de substâncias químicas presentes nos alimentos ou seus produtos. Várias classes de substâncias são consideradas bioativas, como por exemplo os carotenóides, compostos fenólicos, fitoesteróis, tocotrienóis, compostos organosulfurados, carboidratos não digeríveis, dentre outras (HIRAI et al., 2010; HASANI-RANJBAR et al., 2009; RODRIGUEZ et. al., 2006).

2.2.1 Gênero da Família Rubiaceae

Em 1731, Jussieu reuniu 31 gêneros em um Ordo, o qual nomeou, com base no gênero *Rubia* L., “Rubiaceae”. Para isso, serviram de base as características compartilhadas por esses gêneros, como folhas opostas, raramente verticiladas, pecíolos unidos na base por estípulas e ovário ínfero. A partir daí, esta é considerada a combinação de caracteres morfológicos mais pontual e constante encontrada em Rubiaceae, o que favorece o reconhecimento de membros da família. Rubiaceae é composta por cerca de 620 gêneros e mais de 13000 espécies. Estes números corroboram estimativas de que Rubiaceae seja a quarta família de Angiospermas em número de espécies, depois de Asteraceae, Orchidaceae e Leguminosae (DAVIS et al., 2009; ZAPPI, 2003).

Os gêneros de Rubiaceae estão distribuídos em quatro subfamílias principais: Cinchonoideae (*Cinchona*, fonte de quinino e outros compostos de valor terapêutico); Ixoroideae (*Coffea*, do conhecido Cafeeiro; *Coffea arábica*, fonte de uma das bebidas mais populares no Brasil, bem como de vários compostos com atividade farmacológica; *Genipa*, do jenipapo brasileiro; e *Gardenia*, valiosa fonte de espécies ornamentais); Antirrhoideae (*Guettarda*) e Rubioideae (*Psychotria*, que abrange diversas espécies com compostos de ação no SNC e muito usadas em rituais, especialmente na Amazônia; *Cephaelis* da *C. ipecacuanha*, árvore importante, fonte de emetina e outros constituintes; *Borreria* e *Dioidea*, com espécies popularmente conhecidas como Poaia, comuns em terrenos baldios; e *Palicourea*, que compreende uma das espécies medicinais). Abrangendo assim, desde plantas medicinais utilizada popularmente, até plantas com elevado valor comercial, como as plantas ornamentais e da cultura do café. Bem como para outros diferentes usos, como alimentícia, madeireira, construção civil, acaricida, veneno, tinturas, rituais religiosos, forrageira, apícola e artesanal (STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

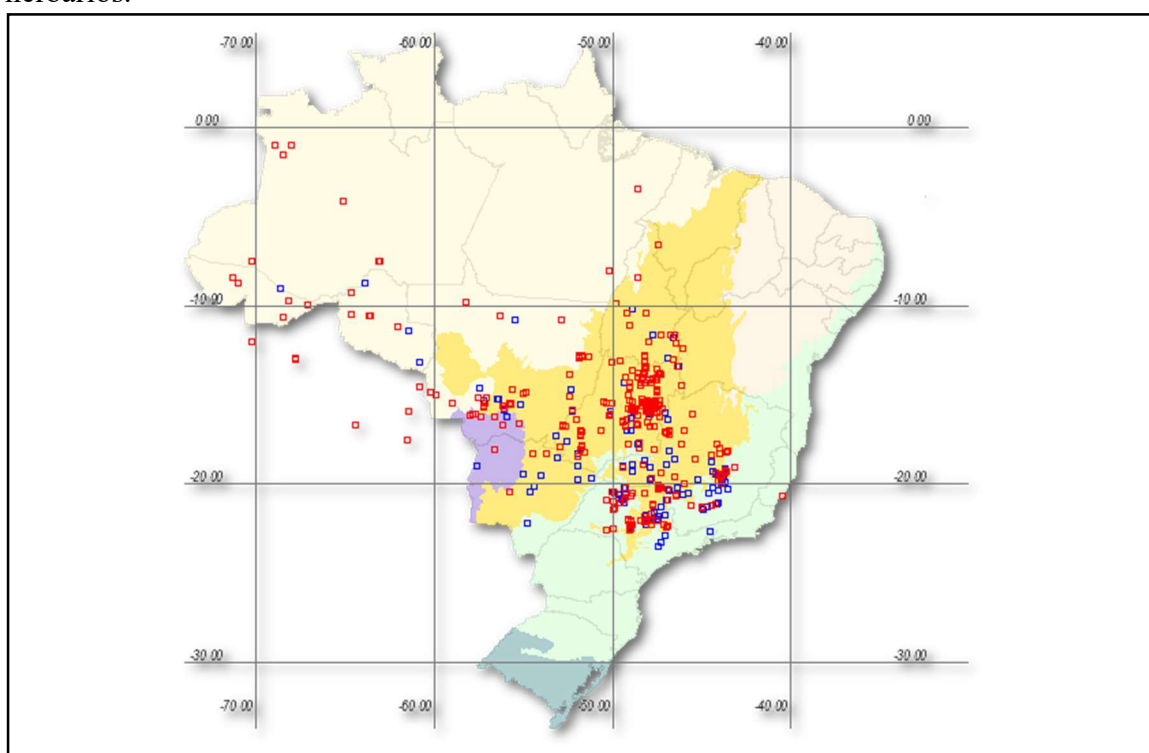
2.2.2 *Rudgea viburnoides* Benth (Palicoureeae, Rubiaceae)

Rudgea viburnoides Benth é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, também conhecida popularmente como congonha de bugre, congonha, bugre e porangaba, sendo comum no cerrado brasileiro. A partir de dados de registro e coleta desta espécie vegetal no Brasil, pode-se observar registros principalmente nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (Figura 2) (MONTEIRO et al., 2009; SpeciesLink, 2000).

Na medicina popular, são atribuídas a *R. viburnoides* propriedades anti-reumática, antissifilica, diurética, hipotensora e depurativa do sangue, sendo suas folhas utilizadas tradicionalmente sob a forma de chá para o tratamento da HAS e obesidade (ALMEIDA, 2011; NUNES et al., 2003).

R. viburnoides (Figura 3) é uma árvore de 4-5 m de altura, de copa globosa, com ramos densos. As flores são brancas, perfumadas e se agrupam em inflorescências do tipo panículas. A espécie floresce mais predominante entre os meses de agosto a setembro. Os frutos amadurecem, em sua maioria, em junho e julho, sendo muito procurados pelos pássaros (LORENZI, 1998).

Figura 2. Distribuição no Brasil de *Rudgea viburnoides* Benth coletadas e depositadas em herbários.



Fonte: Specieslink, 2020.

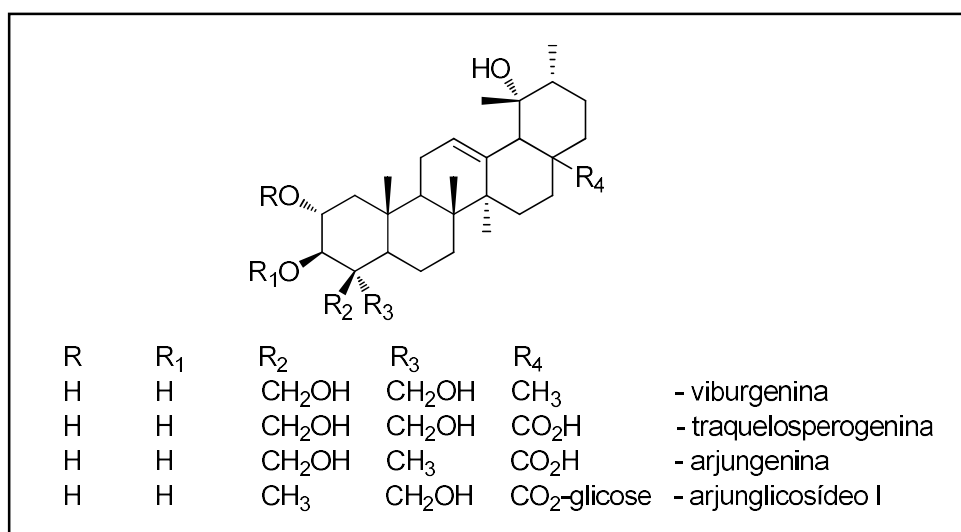
Figura 3. Fotos de *Rudgea viburnoides* (A) e suas inflorescências (B). Fonte: Lorenzi, 1998.



Apesar do extenso uso de *R. viburnoides* na medicina popular, os estudos químicos e biológicos sobre essa planta ainda são escassos. À prospecção fitoquímica e perfil cromatográfico realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) das folhas, evidenciam a presença de taninos, flavonóides, triterpenos, esteróides e saponinas (ALVES et al., 2004).

Os estudos químicos a partir das cascas dos frutos de *R. viburnoides* permitiram o isolamento dos triterpenos pentacíclicos viburgenina, traquelosperogenina e arjungenina, juntamente com as saponinas arjunglicossídeo I, traquelosperosídeo B-1 e E-1 (Figura 4). O triterpeno viburgenina apresentou moredada atividade contra o fungo *Cladosporium cladosporioides* (YOUNG et al., 1998).

Figura 4. Estruturas químicas de alguns constituintes isolados de *R. viburnoides*.



Os alcalóides, comuns em espécies da família Rubiaceae, tais como a ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Strokes, a quina (*Cinchona spp*) e a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* DC), não foram detectados nas folhas de *R. viburnoides* através dos testes clássicos aplicados em farmacognosia (ALMEIDA, 2011).

Do ponto de vista toxicológico, tanto para toxicidade oral aguda, quanto para necropsia em nível macro e microscópico nos órgãos analisados, não foram observados sinais de toxicidade nos ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*, de ambos os sexos, dos estudos tratados com extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*, com doses de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg (PUCCI et al., 2010; ALMEIDA, 2011).

Apesar de alguns estudos químicos, biológicos e toxicológicos realizados a partir de extratos de *R. viburnoides*, ainda há escassos dados na literatura e desta maneira pretendemos ampliar o conhecimento químico e biológico desta espécie, pois, como citado anteriormente, os efeitos colaterais fazem crescer o interesse em se estudar plantas com potencial para tratar a hipertensão arterial sistêmica.

2.2. Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa mundial de eventos fatais, representando 17,3 milhões de mortes por ano. O tratamento preventivo que reduz a DCV, mesmo que em uma pequena porcentagem, já pode diminuir substancialmente, a nível nacional e global, o número de pessoas que desenvolvem DCV e os custos de atendê-las (SACKS et al., 2017).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da DCV, a HAS destaca-se, exercendo exponte papel nas insuficiências renais e comprometimentos encefálicos. Porém, por ser uma doença de instalação progressiva, lenta e silenciosa, seu diagnóstico muitas vezes é realizado tardiamente, sendo portanto mais difícil seu controle e a prevenção dos seus efeitos sistêmicos (JONES & HALL, 2014).

A HAS está descrita como uma das principais causa de morte evitável nos países desenvolvidos, assim com sua exponente prevalência nos países em desenvolvimento. A falta de controle desta doença, aumenta notadamente o risco de DCV, principalmente cerebrovasculares e renais (JUHASZ et al., 2018).

Segundo a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2020), a HAS é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90mm Hg e está frequentemente associada a distúrbios metabólicos e às alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo. Embora não haja uma etiologia bem definida para a HAS, acredita-se que esta seja multifatorial, haja vista que os que fatores hereditários podem influenciar não mais do que 20 a 40% dos casos. Assim, os fatores ambientais, a dieta, o tabagismo, obesidade e o sedentarismo, supostamente exercem uma função importante para seu desenvolvimento (VEHASKARI; AVILES & MANNING, 2001).

Sabe-se também, que um dos precursores responsáveis por levar ao desenvolvimento de DCV é a disfunção endotelial, que pode ser explicada como um processo patológico sistêmico do endotélio, proveniente do desequilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. O endotélio vascular, camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa, regulando o tráfego de células e moléculas de diferentes tamanhos. Sua integridade é fundamental para a regulação do tono vascular, fluxo sanguíneo, perfusão tissular e proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (KAGOTA, 2012; BATLOUNI, 2011).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016), a participação da equipe multiprofissional (médicos, enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem, nutricionistas, psicólogos, assistentes sociais, fisioterapeutas, professores de educação física, farmacêuticos e agentes comunitários de saúde) promove melhor controle da HAS, o que se relaciona diretamente à adesão e participação do paciente ao tratamento medicamentoso e não medicamentoso. O tratamento não medicamento da HAS inclui controle de peso, acompanhamento nutricional, prática de exercícios físicos, cessação do tabagismo, controle de estresse, entre outros. Com relação ao tratamento medicamentoso,

os benefícios se mostram principalmente, com medicamentos em associação. Entre eles estão os diuréticos, os inibidores adrenérgicos (betabloqueadores, alfabloqueadores e de ação central), os inibidores da enzima conversora de angiotensina e os bloqueadores dos canais de cálcio.

O tratamento com medicamentos deverá ser realizado com uma ou mais classes de fármacos, dependendo da necessidade, para que as metas para a pressão arterial sejam obtidas. Este tratamento deve ser individualizado e baseado na capacidade do agente escolhido reduzir a morbimortalidade CV, no mecanismo fisiopatogênico predominante no paciente a ser tratado, nas características individuais, nas doenças associadas e nas condições socioeconômicas. Além, de ser observado os efeitos adversos, conforme demonstrado na Tabela 2, que podem prejudicar a adesão e a efetividade do tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Assim, devido ao interesse por se buscar formas de tratamento com menos efeitos colaterais e melhor acessibilidade econômica, vários extratos e compostos obtidos de plantas foram identificados *in vitro*, subjacentes aos efeitos hipotensores e anti-hipertensivos de espécies vegetais. Entre esses compostos utilizados na medicina popular em muitos países, estão os flavonóides e outros compostos fenólicos, comumente conhecidos como metabólitos secundários de plantas, distribuídos por toda a natureza, especialmente em certas plantas e alimentos. Esses alimentos ricos em flavonol, pode mediar uma redução da pressão arterial, aumentando a possibilidade de muitos flavonóis atuarem como agentes farmacológicos, pois muitos compostos fenólicos e flavonóides estudados, mostraram suas propriedades cardioprotetoras através de vários mecanismos, incluindo inibição da geração de ERO e disfunção mitocondrial (GAPAROTTO et al., 2011; TUNGMUNNITHUM, 2018).

Tabela 2. Anti-hipertensivos: efeitos adversos

Classes de anti-hipertensivos	Efeitos Adversos	Medicamentos
Diuréticos	Hipopotassemia Hipomagnesemia (arritmias) Hiperuricemia Intolerância à glicose	Furosemida Bumetanida Espironolactona Amilorida
Inibidores adrenérgicos a) Ação central b) Alfa-1 bloqueadores c) Betabloqueadores	Sonolência (a) Broncoespasmo (c) Sedação (a) Bradicardia excessiva (c) Boca seca (a) Depressão miocárdica (c) Fadiga (a) Insônia (c) Hipotensão Postural (a, b) Pesadelos (c) Impotência (a, c) Depressão Psíquica (c) Palpitação (b) Intolerância a glicose (c) Astenia (b, c)	Metildopa Clonidina Guanabenzona Carvedilol Nebivolol Propranolol Doxazosina Prazosina Terazosina
Vasodilatadores diretos	Retenção hídrica Taquicardia reflexa	Hidralazina Minoxidil
Antagonistas dos canais de cálcio	Cefaleia Tontura Rubor facial Edema periférico Hipertrofia gengival	Amlodipino Nifedipino Felodipino Verapamil Diltiazem
Antagonistas do receptor de angiotensina II	Tontura	Cozaar Atacand Avapro Micardis Diovan

Fonte: Adaptada de Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016.

2.2.1 Função Endotelial

O endotélio, um local ativo de síntese, pode ser considerado um excelente sistema autócrino, parácrino e endócrino do nosso organismo, que responde a múltiplos estímulos, produzindo e secretando vários compostos metabolicamente ativos, ademais de desempenhar ou impedir os efeitos de algumas substâncias circulantes. Desta forma, sua

importância e seu efeito no tônus vascular, foram descritos inicialmente em 1980 por Furchott e Zawadzki, que explicaram o efeito do relaxamento da artéria aorta em coelhos através da acetilcolina e que também dependia da presença de células endoteliais intactas. Assim, demonstraram que a acetilcolina interagiu com os receptores muscarínicos das células endoteliais, para ativar a liberação de substâncias que propiciavam o relaxamento do músculo liso, denominada, posteriormente, como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (BATLOUNI, 2001; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

Porém, somente quase uma década depois, Furchott e Ignarro demonstraram que o EDRF e o óxido nítrico eram a mesma substância. Posteriormente, estudos revelaram que as células endoteliais são aptas a sintetizar diversas substâncias vasoativas, classificadas como relaxantes e contráteis. Os EDRF são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDRH). Os fatores contráteis derivados do endotélio são a endorfina e o troboxano (FURCHGOTT et al., 1989; IGNARRO, 1989; BATLOUNI, 2001; DEANFIELD et al., 2007).

A descoberta de que a vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária realizada pelo EDRF aconteciam em paralelo com a secreção de NO, permitiu demonstrar adicionalmente que o NO era um EDRF. O NO constitui uma substância gasosa, inorgânica e incolor, sendo altamente reativa (RODRIGUES, 2018; BATLOUNI, 2001).

A síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógeno/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais ativadores da acetilcolina, ATP e bradicinina. O estímulo físico é realizado pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, chamada de força de cisalhamento, e o mecanismo pelo qual promove a formação de NO ainda não está completamente esclarecido. O que se conhece, é que as células endoteliais possuem mecanorreceptores que podem ativar diretamente os canais iônicos e as enzimas do grupo das proteínas quinases e fosfatases, que vão gerar a formação de segundos mensageiros, desencadeando uma série de reações químicas que envolvem a participação dos íons cálcio, até a vasodilatação propriamente dita (RODRIGUES, 2018).

Desta forma, as células endoteliais apresentam-se de forma dinâmica e respondem às alterações dos estímulos físicos e químicos, promovendo a síntese e liberação de substâncias vasoativas. O NO, quando liberado, mistura-se rapidamente das células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo. (BATLOUNI, 2011; RODRIGUES, 2018).

A perda da biodisponibilidade do NO, gera, entre outros aspectos disfunção endotelial, dita como a piora do relaxamento dependente do endotélio. Este desequilíbrio gera uma deficiência na vasodilatação dependente do endotélio, representando a característica funcional da disfunção endotelial, já que NO executa um importante papel na fisiologia da parede vascular, inibindo, por exemplo, a inflamação, proliferação celular e trombose (TEIXEIRA et al., 2014; DEANFIELD et al., 2007).

Apesar de não poder associar a disfunção endotelial à HAS como fator etiológico primário, as interações entre os mecanismos de contração e relaxamento, tanto no endotélio como nas células musculares lisas, são complexas. Sabe-se que a disfunção endotelial colabora com o mecanismo de desenvolvimento e piora do quadro hipertensivo, levando inclusive ao aumentando da proliferação de células musculares lisas, o que induz hipertrofia da parede vascular (STORCH et al., 2017).

Como os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial associados à HAS são múltiplos e estão relacionados ao tipo e à duração da HAS, bem como ao leito vascular investigado, alguns desses mecanismos podem estar ligados a redução da liberação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio, como o NO e EDHF; diminuição da biodisponibilidade desses fatores, principalmente o NO, por inativação oxidativa; a disfunção nas vias de conversão dos sinais dos fatores de relaxamento endoteliais; diminuição da sensibilidade da musculatura lisa vascular aos fatores de relaxamento e aumento da produção de fatores de contração produzidos pelo endotélio (BATLOUNI, 2011).

Sendo assim, há um vasto número de evidências sobre o papel central exercido pelo endotélio na fisiopatologia da HAS, principalmente pela ação de fatores de relaxamento e de contração, secretados pelas células endoteliais, e seus respectivos mediadores (Figura 5).

Figura 5. (1) Fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio, (2) fatores envolvidos nos processos de inibição e proliferação celular e (3) respectivos mediadores (centro).

ENDOTÉLIO			
Fatores relaxantes	1	2	Fatores Constrictores
EDRF/NO			Endotelinas
EDHF			PGH ₂ , TxA ₂
Prostaciclina			Radical O ₂ [•]
Bradicinina			Angiotensina II
CÉLULA MUSCULAR LISA VASCULAR			
Mediadores	3	3	Mediadores
GmPc, AmPc			PLC, PKC, Ca ²⁺
Fatores Inibidores do Crescimento	2	2	Fatores inibidores do crescimento
EDRF/NO			Endotelinas
Sulfato de heparan			Angiotensina II
TGF-β1			PDGFs
			IGF-ILs
HIPERTENSÃO			

Fonte: Adaptado de BATLOUNI, 2011.

2.2.2 Estresse Oxidativo

O conjunto de ações na formação de radicais livres ocorrem, geralmente, nas mitocôndrias, membranas celulares, e no citoplasma. Essas ações podem, especialmente, ser favorecidas pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de EROs (RODRIGUES, 2018).

Cerca de 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons, é metabolizado pelos organismos aeróbios em condições fisiológicas. O restante é utilizado por enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta. No entanto, cerca de 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, dando origem aos radicais livres (endógenos). Além dos radicais livres formados de forma endógena, há também a formação de radicais livres exógenos, ou seja, os radicais formados pela poluição atmosférica, raios-X e ultravioletas, cigarros, bebidas alcoólicas, alto níveis stress e consumo de gorduras saturadas (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; CUNHA et al., 2016).

Os radicais livres, quando não encontram nenhum outro radical livre para se ligar na tentativa de obter estabilidade, captam elétrons de outras moléculas saudáveis. A molécula que perdeu o elétron se transforma em outro radical livre, iniciando uma reação

em cadeia que danificará muitas células. Tal reação poderá ter caráter ilimitado, caso não houver a intervenção dos antioxidantes. Este processo, chamado oxidação, provoca morte celular (NEDEL, 2005).

Apesar dos efeitos prejudiciais do excesso de radicais livres, a presença destes é essencial para a manutenção de várias funções fisiológicas normais, como no processo de respiração celular (que ocorre nas mitocôndrias, a fim de gerar ATP), e aqueles radicais que são produzidos pelos macrófagos e neutrófilos, são usados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva a esses microrganismos (BARBOSA et al., 2010).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, tem sido chamado de estresse oxidativo, ou alteração redox. Tal desequilíbrio tem como consequência a oxidação de importantes elementos biológicos (lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA), o que leva a modificações químicas, e funcionais de tais elementos. Este desequilíbrio tem sido apontado como importante mecanismo de lesão de várias doenças como a HAS, câncer, Alzheimer entre outras (FERRON, 2020).

A pressão arterial pode sofrer influência pelo stress oxidativo, pelo envolvimento direto das espécies reativas ao oxigênio (EROS) no metabolismo do NO. A diminuição da disponibilidade do NO vascular e, conseqüentemente o seu efeito vasodilatador por ação do stress oxidativo, pode aumentar a pressão arterial pelo aumento da resistência vasculares sistêmica (VARIZI, 2008).

Além disso, a produção excessiva de EROS promove a produção direta de espécies citotóxicas e a inativação de NO. Essa inativação leva à perda dos efeitos protetores do NO, como regulação do tônus arterial, inibição da inflamação local e da coagulação, como também da proliferação celular. A redução da disponibilidade do NO, pode aumentar a resistência vascular renal, amplificar a reabsorção tubular de sódio e água e, desta forma, provocar uma expansão do volume extracelular, com conseqüente aumento da pressão arterial. Adicionalmente a isso, o stress oxidativo pode promover a disfunção endotelial, pela redução do NO ou pela promoção da aterosclerose, pois fomentam a adesão de monócitos à parede vascular, a oxidação das moléculas LDL, a apoptose de células endoteliais, a formação das células espuma e o conseqüente desenvolvimento de estrias lipídicas e placas de ateroma (VARIZI, 2008; PINHO et al., 2010).

Para evitar que ocorra o estresse oxidativo, é imprescindível que haja um equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes no nosso organismo. Antioxidantes são

moléculas que impedem a oxidação de outras moléculas, muitas vezes sendo oxidadas. Devido à nossa atmosfera rica em oxigênio, todos os organismos vivos, incluindo bactérias, plantas e animais, adaptaram-se e desenvolveram defesas enzimáticas e não enzimáticas contra o estresse oxidativo crônico (LOPERENA & HARRISON, 2017).

2.2.2.a. Estresse Oxidativo e Antioxidantes Naturais

Fica claro o papel que o estresse oxidativo exerce na gênese e na progressão das DCV. O aumento da produção de radicais livres e diminuição da defesa dos antioxidantes, leva danos graves às macromoléculas e disfunção do metabolismo normal. Por este motivo, uma ingestão adequada de antioxidantes torna-se fundamental para pacientes portadores de HAS.

Os mecanismos de defesa induzidos pelo estresse oxidativo envolvem: mecanismos preventivos, mecanismos de reparo, defesas físicas, e as defesas antioxidantes. Existem três grandes tipos de defesas antioxidantes: (1) os antioxidantes diretos, “varredores” de radicais livres e quelantes, que podem suprimir diretamente a formação de radicais livres; (2) as enzimas antioxidantes e (3) os compostos que possuem propriedades antioxidantes, que são considerados antioxidantes indiretos. Compostos com propriedades antioxidantes indiretas podem afetar a formação de radicais livres, por exemplo, inibindo a atividade de enzimas pró-oxidantes (AFSHEEN et al, 2018; DENISOV, 2005).

As substâncias antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. As substâncias antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular (enzimáticos e não enzimáticos) ou por fontes exógenas (ou dietéticos), impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (PEREIRA & CARDOSO, 2012; AFSHEEN et al, 2018).

Os antioxidantes exógenos são muito diversos, sendo comumente encontrados em vegetais, como as vitaminas C e E, os carotenóides, os flavonóides e os compostos fenólicos. Os antioxidantes biológicos de baixo peso molecular de plantas medicinais são metabólitos secundários, que possuem atividades biológicas marcantes. Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos

sobre a saúde humana. Dentre seus benefícios à saúde humana destaca-se a redução da absorção do colesterol da dieta, com conseqüente redução dos níveis sanguíneos; a redução do risco de DCV, e inibição do crescimento de certos tipos de tumores malignos (PEREIRA & CARDOSO, 2012; BERG & LUBERT, 2008; SALGADO, 2009). Na tabela 3, estão relacionadas as EROS com os respectivos antioxidantes.

Os mais abundantes são os compostos fenólicos, destacando-se dentre eles os flavonóides. Esses, podem ser classificados em subgrupos como: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, isoflavonas, flavan-3-óis (catequinas), chalconas, auronas e antocianidinas. Os compostos polifenólicos, um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes e inibirem a atividade de muitas enzimas como as xantinas-oxidases, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres. Adicionalmente, efeitos biológicos como redução da fragilidade e permeabilidade capilares, bem como inibição da destruição do colágeno e agregação plaquetária (PEREIRA & CRADOSO, 2012; VALKO et al., 2007).

Tabela 3. EROS e os antioxidantes.

EROS	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Vitaminas, zinco, cobre, manganês, picnogenol
Radical peroxil (ROO^{\cdot})	Glutathiona peroxidase, selênio, cisteína	Vitamina E, selênio
Radical hidroxila (OH^{\cdot})	_____	Vitamina C, manitol, EDTA, picnogenol, dimetil sulfóxido
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Catalase Fe_2^+ Glutathiona Peroxidase	_____

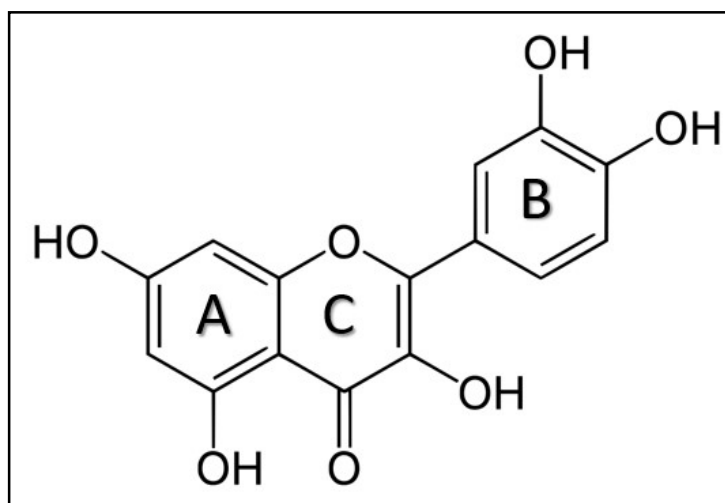
Fonte: VALKO et al., 2007.

Extratos de plantas ricos em componentes fenólicos podem ser considerados a principal razão por trás do potencial antioxidante das plantas medicinais. Muitos estudos relatam o potencial de extratos ricos em polifenóis e flavonoides no tratamento das alterações cardiovasculares, pois esses metabólitos apresentam várias propriedades terapêuticas, incluindo potencial antioxidante, cardioprotetor e anti-hipertensivo (ALMEIDA, 2011; AFSHEEN et al, 2018).

Os possíveis mecanismos no tratamento de DCV com flavonóides inclui sua capacidade de melhorar e/ou interromper a disfunção endotelial, reduzir a oxidação do LDL e inibir a agregação plaquetária. Assim, a atividade farmacológica desses compostos pode estar relacionada a suas propriedades antioxidantes e ao efeito vaso-regulador (PEREIRA & CARDOSO, 2012; ADEGBOLA, 2017).

A estrutura comum dos flavonoides consiste de dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por uma unidade de três carbonos (anel C). O anel A é um anel aromático que se encontra condensado ao anel C, sendo que este último é substituído nas posições 2 ou 3 por um grupo fenil (anel B), dando origem aos flavonoides e isoflavonoides respectivamente, sendo que a ocorrência dos isoflavonoides é menos comum (Figura 6). O interesse pela indústria farmacêutica por tais componentes é crescente, e justifica-se pelo fato dos compostos fenólicos e flavonóides apresentarem uma série de vantagens em relação a outros fármacos, principalmente com relação aos efeitos colaterais (PEREZ-VIZCAINO & FRAGA, 2018; ADEGBOLA et al., 2017).

Figura 6. Estrutura do flavonóide quercentina.



Fonte: Adaptado de Sun et al., 2008.

Dada à sua grande abundância nos vegetais, os flavonoides são importantes componentes da dieta humana e estão presentes na dieta de praticamente todos os animais herbívoros e onívoros. O nível de ingestão de flavonoides na dieta humana é considerado alto quando comparado com a ingestão de vitamina C (70mg/dia), vitamina E (7-10mg/dia), e carotenóides (2-3mg/dia). A ingestão de flavonoides pode variar entre 50 e 800mg/dia, dependendo do consumo de vegetais e frutas. Em particular, o vinho e o chá

preto apresentam elevada quantidade de flavonoides, aproximadamente 200mg por copo de vinho ou por xícara de chá. (CORCORAN et al., 2012).

Atualmente, devido à má alimentação e na necessidade da melhora nutricional das pessoas, o interesse na aplicação de extratos vegetais na indústria de alimentos cresceu, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes e efeitos associados à promoção da saúde. Assim, vêm se desenvolvendo novos produtos chamados de nutracêuticos, definidos como alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e ou tratamento de doenças. Esses produtos podem abranger desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos e produtos herbais até alimentos processados, como cereais, sopas e bebidas (TAJNER-CZOPEK, 2020).

Dessa forma, tem-se estabelecido que uma mistura complexa de substâncias químicas bioativas, como em frutas e vegetais, pode promover benefícios a saúde através de uma combinação de efeitos aditivos e sinérgicos. As substâncias químicas bioativas em frutas e vegetais podem ter complementaridade e ultrapassar o efeito das substâncias isoladas, exercendo diversas ações benéficas à saúde, como a diminuição do estresse oxidativo.

Referências Bibliográficas

- ADEGBOLA, P.; ADERIBIGBE, I.; HAMMED, W.; OMOTAYO, T. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review. *Am J Cardiovasc Dis*;7(2):19-32, 2017.
- AFSHEEN N., UR-REHMAN, K., JAHAN, N., IJAZ, M., MANZOO, A. R., KHAN, K. M., HINA A. Cardioprotective and Metabolomic Profiling of Selected Medicinal Plants against Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. p.1-17, 2018.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; NOBRE, I.B.C; MEIRA, P.R.M.; TUPINÁ, J.R. Uso de plantas medicinais em uma unidade de saúde da família no município de Juazeiro-BA. *Interfaces Científicas- Saúde e Ambiente, Aracajú*, v.1, n.1, p.9-18, 2011.
- ALVES, R.M.S.; STEHMANN, J.R.; ISAIAS R.M.S.; BRANDÃO, M.G. *Rev. Bras. Farmacogn.* 14: 49-56, 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição, p.152-153, 2018.

- BALBINOT, S.; VELASQUEZ, P. G.; DUSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro-Paraná. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Campinas, v.15, n.4, p.632-638, 2013.
- BALDIN, T. Anatomia do Lenho de Gênero *Calycophyllum* A. DC. (Rubiaceae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Santa Maria, 2015.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. *Ver. Bras. Hipertens* 8:328-38, 2011.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, K. M. B.; ALFENAS, R.C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V.P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, vol.23, n.4, pp.629-643. ISSN 1415-5273, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13.pdf>. Acesso em: 20/04/2020.
- BERG, J. M. T., LUBERT, J. *Bioquímica*. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.
- BRITISH CARDIAC SOCIETY; BRITISH HYPERTENSION SOCIETY; DIABETES UK; HEART UK; PRIMARY CARE CARDIOVASCULAR SOCIETY; STROKE ASSOCIATION. JBS 2: Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart. Suppl* 5:v1-52; 91, 2005.
- BRODY, D. E.; BRODY, A. R. *As Sete Maiores Descobertas Científicas da História, Parte 2*. Cia da Letras, São Paulo, 2000.
- CARNEIRO, M. R. B.; SANTOS, M. L. Importância relativa de espécies com potencial uso medicinal na Flora do Centro Oeste do Brasil. *FRONTEIRAS: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, Anápolis, v.3, n.2, p.145-163, 2014.
- CARRIL, E.P.U.; GARCÍA, A. A. Metabolismo secundário de plantas. *REDUCA*, v.2, n.3, p.119-145, 2009.
- CEFALU, W.T.; YE, J.; WANG, Z. Efficacy of Dietary Supplementation with Botanicals on Carbohydrate Metabolism in Humans. *Endoc. Metabol. & Imm. Disorders - Drug Targets*, v.8, p.78-81, 2008.
- CHADWICK, D.J; MARSH, J. *Bioactive Compounds from Plants*. Volume 154 de *Novartis Foundation Symposia*. 2008.
- COLET, C. D. F.; MARANGON, M.; SCHWAMBACH, K. H. Uso de Medicamentos por 51 Hipertensos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v.27, n.6, p.403-408, 2014.
- COCK IE. The safe usage of herbal medicines: counter-indications, cross-reactivity and toxicity. *Pharmacogn.Commun.* 5(1):2, 2015.

- CORCORAN MP, MCKAY DL, BLUMBERG JB. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 31(3), p.176-89, 2012.
- CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Fundamentos químicos da ação dos radicais no organismo. *DIVERSITAS JOURNAL.* Santana do Ipanema/AL. vol 1, n. 1, p.08-13, jan./abr. 2016.
- DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; RUHSAM, M.; MOAT, J. & BRUMMITT, N.A. A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* (96), p.68–78, 2009.
- DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 13 Mar 2007.
- DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKANEN, O.; KIEC-WILK, B.; MYKKANEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Brit. J. Nutrit.*, v.99, p.ES109-ES117, 2008.
- DENISOV, E. T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 981, 2005.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre/Florianópolis, 6 Ed. UFRGS/Ed. da UFSC, 2010.
- FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES, S.L.M; QUEIROZ, S.R.R.Q. *Medicamentos a partir de Plantas Medicinais.* Academia Brasileira de Ciências, 1998.
- FERREIRA JUNIOR, M.; VIEIRA, A.O.S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss. na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. *Hoehnea*, v. 42, n. 2, p. 289-336, 2015.
- FERRON, A. J. T. Suplementação com licopeno: Influência sobre o estado redox e a modulação β -adrenérgica cardíaca em modelo experimental de obesidade induzida por dieta. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” - Faculdade De Medicina. Botucatu, 2020.
- FREITAS, P.C.M.; PUCCI, L.L; VIEIRA, M.S.; LINO JR, R.S. Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum. *Journal of Ethnopharmacology.* v.134, p.501-3, 2011.
- FREIRE, A. K. S.; ALVES, N.C.C.; SANTIAGO, E.J.P.; TAVARES, A.S.; TEIXEIRA, D.S.; CARVALHO, I.A.; MELO, M. C.P.; NEGRO-DELLACQUA, M. Panorama no

Brasil das doenças cardiovasculares dos últimos quatorze anos na perspectiva da promoção à saúde. *Revista Saúde e Desenvolvimento*. vol.11, n.9, 2017.

- FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB Journal*, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, Jul 1989.

- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 27 Nov 1980.

- GASPAROTTO, A.Jr.; GASPAROTTO, F.M.; LOURENÇO, E.L.B.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; SILVA-SANTOS, J.E.; MARQUES, M.C.A.; KASSUYA, C.A.L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus L.*: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, p.363-372, 2011.

- HASANI-RANJBAR, S.; NAYEBI, N.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World. J. Gastroenterol.*, v.15, n.25, p.3073-3085, 2009.

- HERBÁRIO DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL (CGMS), HERBÁRIO DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ (ESA), HERBARIUM UBERLANDENSE (HUFU), HERBÁRIO LAURO PIRES XAVIER (JPB), HERBÁRIO MONTES CLAROS (MCMG), HERBÁRIO DO CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE (SORO) disponível na rede speciesLink (<http://www.splink.org.br>) em 24 de Março de 2020 às 11:26.

- HIRAI, S.; TAKAHASHI, N.; TSUYOSHI, G.; LIN, S.; UEMURA, T.; YU, R.; KAWADA, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of Inflamm.*, v.2010, Article ID 367838, p. 1-8, 2010.

- IGNARRO, L. J. Biological Actions and Properties of Endothelium-Derived Nitric Oxide Formed and Released From Artery and Vein. *Circulation Research*. 65:1-21, 1989.

- JONES, D.W.; HALL, H.E. Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension*, v.43, n.1, 2014.

- JUHASZ, A.; WU, J.; HISADA, M.; TSUKADA, T.; JEONG, M.H. Efficacy and safety of azilsartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker, in Korean patients with essential hypertension. *Clinical Hypertension*, v. 24, 7 Feb 2018.

- KAGOTA, S. High salt intake impairs vascular nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 302, n. 1, p. 344–351, 1 Jul 2012.
- LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 04, pp. 17-31. 2013.
- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.
- LOPES, G. A. D.; FELICIANO, L.M.; DINIZ, E.E.S.; ALVES, M.J.Q.F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). *Revista Ciência em Extensão*, v.6, n.2, p.143-155, 2010.
- LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative stress and hypertensive diseases. *Medical Clinics of North America*, v. 101, n. 1, p. 169–193, Jan 2017.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v.2, p.373.1998.
- MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C; VEIGA-JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.79, n.5, p.727-747, 2004.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*. 20, p.13422-13495, 2015.
- MONTEIRO, J.C.; MATTA, S.L.P.; PREDES, F.S.; OLIVEIRA, T.T. Liver Morphology and Morphometry and Plasma Biochemical Parameters of Wistar Rats that Received Leaf Infusion of *Rudgea viburnoides* Benth. (Rubiaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.52 n.2: p. 407-412, 2009.
- MORADI, M.T.; ASADI-SAMANI, M.; BAHMANI, M. Hypotensive medicinal plants according to ethnobotanical evidence of Iran: A systematic review. *Int. J. Pharmtech Res.*9, p.416-126, 2016).
- MORAIS, S. M. M.; FILHO, R. B. (Org.) Produtos naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza: Ed. UECE, 2007.
- NEDEL, D.R. Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Farmácia - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Ijuí, 2005.

- NEWMAN, D. J.; CRAIG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661, 2016.
- NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul *Rev. Bras. Farmacogn.*, V. 13, n. 2, p.83-92, 2003.
- OIGMAN, H.; NADRUZ, W. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020.
- PICCHI, D.G.; ALTEI, W.F.; SAITO, M.S.; BOLZANI, V.S.; CILLI, E.M. Peptídeos Cíclicos De Biomassa Vegetal: Características, Diversidade, Biossíntese E Atividades Biológicas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 5, 1262-1277, 2009.
- PINHO, R. A.; ARAÚJO, M. C.; GHISI, G. L. M., BENETTI, M. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. *Arq Bras Cardiol.* 94(4): 549-55, 2010.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidants. *J. Biotec. Biodivers.* v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.
- PUCCI, L.L. et al. Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre). *Latin American Journal of Pharmacy.* v.29, n.1, p.30-37, 2010.
- PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C.G. Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 646, p.10- 12, 2018.
- RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. A comparison of plants utilized in ritual healing by two Brazilian cultures: Quilombolas and Indians. *Journal of Psychoactive Drugs* 38, 285–295, 2003.
- RODRIGUES, L. F. Avaliação da função endotelial e dos parâmetros do estado redox como marcadores da programação fetal mediada por dieta hipersódica em prole de ratos Wistar. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018.
- RODRIGUEZ, E.B.; FLAVIER, M.E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; AMAYA-FARFÁN, J. Phytochemicals and functional foods. Current situation and prospect for developing countries. *Seg. Alim. Nutri.*, v.13, n.1, p.1-22, 2006.
- *Rudgea* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20852>>. Acesso em 06 de março de 2020.
- SACKS, F.M.; LICHTENSTEIN, A.H.; WU, J.H.Y.; APPLE, L.J.; CREAGER, M.A.; KRIS-ETHERTON, P.M.; MILLER, M.; RIMM, E.B.; RUDEL, L.L.; ROBINSON, J.G.;

STONE, N.J.; HORN, L.V.V. Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 15 jun, 2017.

- SALGADO, J. M. Guia dos Funcionais: Dieta Alimentar para Manter a Saúde e Evitar Doenças. Rio de Janeiro: Ediouro, 192p. 2009.

- SANTOS, C. V. C. Avaliação do efeito dos extratos aquoso e metanólico da *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Aroeira) sobre culturas de esplenócitos murinos e sobre a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia. 2014.

- SANTOS FILHO, N. N. D. Levantamento etnobotânico e triagem fitoquímica de plantas medicinais da comunidade Quilombola “Nazaré do Bruno” Caxias, Maranhão, Brasil.

53º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/7/2360-12810.html>>. Acesso em: 05 jun. 20.

- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308–313, ago. 2004.

- SILVA, R. M. Bioefetividade de Extato Etanólico de espécies de Rubiaceae sobre *Plutella xylostella* L., 1958 (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2018.

- SILVA, S. et al. Conhecimento e uso de plantas medicinais em uma comunidade rural no município de Cuitegi, Paraíba, Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, v.8, n.1, p.248-265, 2014.

- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. da Universidade, 1999.

-SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Disponível em: <http://www.sbh.org.br/geral/noticias.asp?id=69>. Acesso em: 18 jun. 2017.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf. Acesso em: 23 março 2020.

- SOUSA, L. A; BAUTISTA, H. P; JARDIM, J. G. Diversidade florística de Rubiaceae na Serra da Fumaça – complexo de Serras da Jacobina, Bahia, Brasil, *Bioata Neotrop.* (online). Vol. 13, n.3, pp. 289-314, 2013.

- SOUZA, P.; CRESTANI, S.; SILVA, R.C.V.; GASPAROTTO, F.; KASSUYA, C.A.L.; SILVA-SANTOS, J.E.; JUNIOR, A.G. Involvement of bradykinin and prostaglandins in

the diuretic effects of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.149, n.1, p.157-161, 2013.

- SOUZA, V. C.; LORENZI, H, *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira*. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

- STASI, L.C.D.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2a edição, revista e ampliada. Editora UNESP, p.492-493, 2002.

- STORCH, A.S.; MATTOS, J.D.; ALVES, R.; GALDINO, I.S.; ROCHA, H.N.M. *Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações*. *International Journal of Cardiovascular Sciences*;30(3), p.262-273, 2017.

- SUN, S.; CHEN, W; CAO, W; ZHANG, F.; SONG, J.; TIAN, C. Research on the chelation between quercetin and Cr (III) ion by density functional theory (DFT) method. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, v. 860, n. 1-3, p 40-44, 2008.

- TAJNER-CZOPEK, A.; GERTCHEN, M.; RYTEL, E.; KITA, A.; KUCHARSKA, A.Z.; SOKÓL-LETTOWSKA, A. Study of Antioxidant Activity of some Medicinal Plants Having High Content of Caffeic Acid Derivatives. *Antioxidants*. 9(412), p.3-23, 2020. Disponível em <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/5/412>. Acesso em 17/05/2020.

- TEIXEIRA, B. C.; LOPES, AL.L.; MACEDO, R,C,O; CORREA, C.S.; RAMIS, T,R; RIBEIRO, J.L.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 13, n. 2, p. 108–115, abr. 2014.

- TESTON, E. F.; CECÍLIO, H. P. M., SANTOS, A. L.; ARRUDA, G. O.; RADOVANOVIC, C. A. T.; MARCON, S. S. Fatores associados às doenças cardiovasculares em adultos. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, p. 95-102. 2016.

- TUNG MUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* (5), p.1-16, 2018.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 39, p. 44–84, 2007.

- VAZIRI, N. D. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran J Kidney Dis*. 2:1-10, 2008.

- VEHASKARI, V. M.; AVILES, D. H.; MANNING, J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney International*, v. 59, n. 1, p. 238–245, Jan 2001.

- VIANNA, U.R., OLIVEIRA, F. A., CARVALHO, J. R., BARBOSA, J. M. *Tópicos Especiais em Ciência Animal V. 1a Edição*. Alegre, ES: CAUFES, 2016.

- YANG, C-Y.; WANG, J.; ZHAO, Y.; SHEN, L.; JIANG, X.; XIE, Z-G.; LIANG, N.; ZHANG, L.; CHEN, Z-H. Anti-diabetic effects of Panax notoginseng saponins and its major anti-hyperglycemic components. *J. Ethnopharmacol.*, v.130, p.231-236, 2010.
- YOUNG, M. C.M.; ARAÚJO, A. R.; SILVA C.A.; LOPES, M.N.; TREVISAN, L.M. V., BOLZANI, V.S. Triterpenes and Saponins from *Rudgea viburnioides* *J. Nat. Prod.* (61), p. 936-938, 1998.
- ZAPPI, D. Revision of *Rudgea* (Rubiaceae) in Southeastern and Southern Brazil. *Kew Bulletin*, Vol. 58, No. 3, p. 513-596, 2003.

CAPÍTULO II - ARTIGO

PROLONGED ADMINISTRATION OF RUDGEA VIBURNOIDES BENTH. PREVENTS IMPAIRMENT OF REDOX STATUS, RENAL DYSFUNCTION, AND CARDIOVASCULAR DAMAGE IN 2K1C-HYPERTENSIVE RATS BY INHIBIT ACE ACTIVITY AND NO-GMPC PATHWAY ACTIVATION

Fernanda Viana Paulin^b, Rhanany Alan Calloi Palozzi^a, Bethânia Rosa Lorençone^a, Arthur Ladeira Macedo^c, Lucas Pires Guarnier^a, Cleide Adriane Signor Tirloni^a, Paulo Vitor Moreira Romão^a, and Denise Brentan Silva^{b*}, Arquimedes Gasparotto Junior^{a**}

^a*Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LEFaC), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.*

^b*Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.*

^c*Programa de Pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.*

*Corresponding author at: Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. Tel.: +55 (67) 3410-2333, Fax: +55 (67) 3410-2321. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição

(FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Box 549, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil. Tel: +55 (67) 3345-7366.

** Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. Fax: +55 (67) 3410 – 2321. E-mail address: arquimedesjunior@ufgd.edu.br (A. Gasparotto Junior), denise.brentan@ufms.br (D. B. Silva).

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae), popularly known as “congonha” and “porangaba” is an important medicinal specie extensively distributed throughout the Brazilian Cerrado. In Brazilian folk medicine, this species is used as hypotensive, antiarrhythmic, diuretic, blood depurative, in slimming diets and to treat kidney and bladder infections. However, there are no reports in the literature proving its cardiovascular effects. **Aim:** To evaluate the effects of the prolonged administration of an aqueous extract obtained from leaves of *R. viburnoides* (AERV) on impairment of redox status, renal dysfunction, and cardiovascular damage in 2K1C hypertensive rats. **Material and Methods:** First, AERV was obtained by accelerated solvent extraction using water and its chemical constituents were identified by LC-DAD-EM. Then, an acute toxicological study was performed in female Wistar rats. Renovascular hypertension (two-kidneys, one-clip model) was surgically induced in male Wistar rats. The sham-operated group was used as negative control. AERV was orally administered at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, daily, for 28 days, 5 weeks after surgery. Metoprolol (20 mg/kg) was used as standard antihypertensive drug. Renal function was evaluated by diuresis on days 1, 7, 14, 21 and 28. Urinary electrolytes, pH and density were also measured. On 29^o day electrocardiography, blood pressure and heart rate were recorded. Blood samples were obtained for serum measurement of Na⁺, K⁺, urea and creatinine, and for evaluation of plasmatic angiotensin converting enzyme activity. Heart and mesenteric vascular beds were isolated for cardiac morphometry and evaluation of the vascular reactivity, respectively. Additionally, aorta rings were isolated for measurement of cyclic guanosine monophosphate levels. Finally, samples from aorta, heart and kidney were collected for evaluation of the tecidual redox status. **Results:** Main compounds identified from AERV were glycosylated iridoids, chlorogenic acids, glycosylated triterpenes, O-glycosylated flavonols, triterpenoid saponins and others. No signs of acute toxicity were observed after AERV single-dose treatment. Prolonged treatment with AERV was able to

preserve urine excretion and the electrolyte levels (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Cl⁻) in hypertensive rats in a similar manner to Sham-operated group. Furthermore, AERV-treatment was able to revert the electrocardiographic changes and the rise of blood pressure and heart rate in 2K1C hypertensive rats. In addition, prolonged AERV-administration reversed left ventricular hypertrophy and changes in vascular reactivity induced by hypertension. This effect was associated with a positive modulation of the tecidual redox status, NO/cGMP pathway activation and angiotensin converting enzyme inhibition, indicating a potential mechanism for the renal and cardiovascular effects of AERV. **Conclusion:** A 28-days AERV-treatment reduces the progression of the cardiorenal disease in 2K1C hypertensive rats. These effects seem to be involved with an important attenuation of oxidative stress, angiotensin converting enzyme inhibition, and NO/cGMP pathway activation.

Keywords: Antihypertensive; antioxidant; cardioprotective; diuretic; renoprotective, iridoid.

Abbreviations: 2K1C: two kidney, one clip; ACE: angiotensin converting enzyme; ACh: acetylcholine; AERV: aqueous extract from *Rudgea viburnoides*; ANOVA: analysis of variance; BW: body weight; Ca⁺⁺: calcium; CAT: catalase; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; Cl⁻: chloride; DBP: diastolic blood pressure; e-NOS: endothelial nitric oxide sintase; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; EI: excretion load; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; HR: heart rate; HR-MS: high-resolution mass spectrometry; e-NOS: endothelial nitric oxide sintase; K⁺: potassium; LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry; LPO: lipoperoxides; MAP: mean arterial pressure; MVB: mesenteric vascular bed; Na⁺: sodium; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO: nitric oxide; Phe: phenylephrine; PP: perfusion pressure; PSS: physiological saline solution; RAS: renin angiotensin system; RH: renovascular hypertension; ROS: reactive oxygen species; SBP: systolic blood pressure; S.E.M: standard error of the mean; Sham: placebo surgery; SNP: sodium nitroprusside; SOD: superoxide dismutase; UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography.

1. Introduction

Hypertension is a multifactorial disease characterized by sustained elevation of the blood pressure (BP) levels. Worldwide, hypertension affects 1.13 billion people and is

an important risk factor for cardiovascular diseases like atherosclerosis, heart attack and stroke, as well as chronic kidney disease (Brown et al., 2003; WHO, 2013).

According to the 2017 Guidelines for Arterial Hypertension Management in Primary Health Care in Portuguese Language Countries, Brazil has 17 million hypertensive patients, and cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death. The outlook is that by 2025, this number is expected to grow 80% due mainly to smoking, sedentary lifestyle, obesity, poor diet and high alcohol consumption (Oliveira et al., 2017).

The treatment and control of hypertension include drugs (mainly beta blockers, calcium channel blockers, diuretics and renin-angiotensin system inhibitors) and changes in lifestyle, such as regular physical exercise, healthy eating and body weight control. These measures are mainly aimed at preventing cardiovascular complications and metabolic changes due to hypertension (Lopatowska et al., 2018). Allied to this, the uses of alternative therapies have increased substantially, mainly in underdeveloped or developing countries (Balogun and Ashafa, 2019).

The use and consumption of medicinal plants in Brazil as a therapeutic resource is a very common practice among those with hypertension, being used and disseminated by populations over several generations (de Moura and Resende, 2016). One of the medicinal plants widely used by Brazilian population in the treatment of hypertension is *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) popularly known as ‘congonha de bugre’, ‘congonha’, ‘bugre’ and ‘porangaba’. This species is very common in the Brazilian cerrado (Alves et al., 2004; Silva and Proença, 2008). In the folk medicine *R. viburnoides* leaves is used as hypotensive, antiarrhythmic, diuretic, blood depurative, in slimming diets and to treat kidney and bladder infections (Nunes et al., 2003).

Studies on this species are still scarce, especially regarding its pharmacological properties. Preclinical studies have reported nephroprotective (Galdino et al., 2017), diuretic (Pucci et al., 2010), lipid-lowering and anti-inflammatory effects (Almeida et al., 2018). In addition, no toxic effects were reported after acute administration of the ethanolic extract obtained from the leaves of *R. viburnoides* in rats and mice (Pucci et al., 2010). Among the main compounds, chlorogenic and caffeic acids, flavonoids (Alves et al., 2004; Almeida et al., 2018), triterpenes and saponins (Young et al., 1998) stand out.

Considering that the *R. viburnoides* are widely used by the oral route by Brazilian population due to its possible hypotensive effects, it is interesting to investigate if the crude extract from leaves of this species is able to promote cardioprotective effect in hypertensive rats. Thus, the aim of this study was evaluate the prolonged administration of

an aqueous extract obtained from leaves of *R. viburnoides* (AERV) on impairment of redox status, renal dysfunction, and cardiovascular damage in 2K1C-hypertensive rats.

2. Material and Methods

2.1. Drugs

The following drugs, salts and solutions were used: xylazine and ketamine hydrochloride (Syntec, São Paulo, SP, Brazil) and heparin (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brazil). Acetylcholine chloride, phenylephrine, angiotensin II, indomethacin, metoprolol, sodium nitroprusside, NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, dextrose, ethylenediaminetetraacetic acid, 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, 5,5'-dithiobis, bovine serum albumin, ethylenediaminetetraacetic acid, reduced glutathione, Tris-HCl, and xylenol orange were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were obtained in analytical grade.

2.2. Phytochemical study

2.2.1. Plant material and extract preparation

Rudgea (Cham.) Benth. leaves were collected at the Private Natural Heritage Reserve of the Federal University of Mato Grosso do Sul (RPPN/UFMS) (S20°30'32.0''–W54°36'57.7''), in July of 2018. The plant was identified and voucher specimens were deposited at CGMS Herbarium under number 74319.

The leaves were dried in an oven with air circulation at temperature of 50 °C for 48 h. The dry material was ground using an analytical mill (IKA®- A11, basic Analytical mill). Then, an aliquot of this powder was crushed at a mixer mill to standardize the grain size powder which was used for the extraction.

An aliquot of 496 g of the powder was submitted to extraction on an accelerated solvent extractor Dionex™ ASE™. Three cycles of 4 min using hexane and parameters of 100 °C, purge of 100 s and rinse of 60% were made to degrease the sample. Then, two cycles of 4 min using distilled water, 100 °C, rinse of 100% and purge of 60 s were made

to obtain the aqueous extract of leaves of *Rudgea viburnoides* (AERV). This extract was then lyophilized, yielding 49.02 g of dry AERV, and maintained at -20 °C, and resuspended in filtered water to preclinical assays.

2.2.2. Chemical analyses by LC-DAD-MS

An amount of 2 mg of AERV was solubilized on 1 mL of methanol:water (1:1, -v/v) and analyzed on UFLC Shimadzu Proeminence chromatographic system coupled to a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics). The mass spectrometer is composed byhas an electrospray ion source and analyzers quadrupole – time-of-flight. A Kinetex C18 chromatographic column (Phenomenex, 2.6 μ m, 100A, 150 \times 2.1 mm,) was used in the analyses, applying the flow 0.3 mL/min and volume injection of 5 μ L. All the LC and MS parameters were the same described by Tolouei et al. (2019) using both, negative and positive ion mode. The molecular formulae were determined based on the accurate mass considering errors up \pm 5 ppm and mSigma below 30.

2.3. Pre-clinical studies

2.3.1. Animals

Male and female Wistar rats (13-14 weeks) were obtained from the Federal University of Grande Dourados (UFGD). Animals were randomized and housed in plastic cages, with environmental enrichment, at 22 ± 2 °C under 12/12 h light dark cycle, $55 \pm 10\%$ humidity conditions, and ad libitum access to food and water. Before the onset of all experiments, animals were left for ten days to acclimatize to laboratory conditions. All procedures involving animals were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals from UFMS (protocol: 947/2018) and conducted in accordance with Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the United States National Health Institute.

2.3.2. Toxicological assessment

Oral acute toxicity was evaluated in accordance with the protocol 425 described by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) in 2008. Three single doses of AERV (30, 300 and 2000 mg/kg) or water (1 mL/kg) were administered to fasted female rats (n = 8) by oral gavage. Following administration, animals were closely

observed during the first 24 hours and daily for 14 consecutive days. Mortality, body weight gain, food and water consumption were daily observed and recorded. In addition, animal behaviour was individually observed according to the five parameters of the Hippocratic screening, which aims to analyze conscious state, activity and coordination of motor system and muscle toning, activities on the central nervous system, corneal and headset reflexes and activities on the autonomic nervous system (Malone and Robichaud, 1962). On day 15 after administration, overnight fasted rats were euthanized by isoflurane anesthesia (inhalation) followed by exsanguination. Heart, lung, spleen, liver, kidneys, uterus and ovaries were removed, weighed, macroscopically examined and the relative organ weight calculated. Heart, liver and kidney samples were fixed in 10% buffered formalin. After fixation, organ samples were dehydrated with increasing absolute ethanol concentrations, diaphanized in xylene and embedded in paraffin wax. Samples were sectioned and stained with hematoxylin/eosin (H & E). Analyses were performed under light microscopy (40X).

2.3.3. Pharmacological studies

2.3.3.1. Hypertension induction (Goldblatt model; two kidneys, one clip; 2K1C)

Initially, male rats were anesthetized by intraperitoneal route (ketamine 100 mg/kg plus xylazine 20 mg/kg). Then, animals were submitted to laparotomy and the left renal artery was isolated and a silver clip with 1.5 mm lumen was placed to partially limit blood flow (Umar et al., 2010). In some animals (Sham-operated), the ovaries were not removed and the artery was not clipped. After the procedure, animals were hydrated with saline solution (2 ml/ animal, subcutaneously, single administration), and received antiinflammatory (indomethacin, 2 mg/kg, orally, every 12 hours, during 3 days) and antibiotic (enrofloxacin, 10 mg/kg, subcutaneously, single dose). Systolic blood pressure (SBP) was weekly measured (for 28 days) by the tail-cuff method. Only animals with SBP above 140 mm Hg were used in experiments.

2.3.3.2. Experimental design

Five weeks after surgery, animals were randomized and divided into 6 groups (n = 8-10). Rats were treated once a day (by gavage), during 28 days, with vehicle (filtered water; positive control), metoprolol (MPL, 20 mg/kg, standard antihypertensive drug) or

AERV (30, 100 or 300 mg/kg). The Sham-operated group (NC: negative control) was treated with vehicle only.

2.3.3.3. Renal function

The renal function was evaluated according to methods previously described by Gasparotto Junior et al. (2009). Weekly, immediately after treatments, rats were placed in metabolic cages and urine was collected for 8 h. Urinary volume was measured and expressed as ml/100 g of body weight. Urinary sodium (Na⁺), potassium (K⁺), chloride (Cl⁻) and calcium (Ca⁺²) levels were quantified in an ion selective meter (COBAS INTEGRA 400 plus; Roche®). pH was determined on fresh urine samples using digital pH meter (Q400MT; Quimis Instruments, Brazil). Density was estimated by handheld refractometer (NO107; Nova Instruments, Brazil). Excretion load (El) of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and Ca⁺² was obtained by multiplying the concentration of electrolytes (mEq/l) by the urinary flow (ml/min). Results are expressed as $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$.

2.3.3.4. Electrocardiography

At the end of the experimental period the rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) by intramuscular route (IM). After anesthesia all of the rats were kept in the dorsal decubitus position. Four alligator clip electrodes (RL, RA, LL, and LA) were positioned in the folds of both elbows and both knees. The V1 electrode was positioned in the 4th intercostal space to the right of the sternum. The V2 electrode was positioned in the 4th intercostal space to the left of the sternum. The V3 electrode was positioned midway between V2 and V4. The V4 electrode was positioned in the 5th intercostal space at the midclavicular line. The V5 electrode was positioned inside the axillary line at the same level as V4. The V6 electrode was positioned at the midaxillary line at the same level as V4 and V5. A small amount of 70% alcohol was applied to each interface of the electrodes for less interference and better electrical conduction. An acclimatization time of 5 min elapsed, and then cardiographic electrical waves were recorded for 5 min. Electrocardiography was recorded using an electrocardiography recorder (WinCardio, Micromed, Brasília, Brazil).

2.3.3.5. Blood pressure assessment

After electrocardiography, all of the rats subcutaneously received a bolus injection of heparin (50 IU). Tracheotomy was then performed to allow the animals to

spontaneously breathe. The left carotid artery was then isolated, cannulated, and connected to a pressure transducer coupled to a PowerLab® recording system and an application program (Chart, v 4.1; all from ADI Instruments, Castle Hill, Australia), and systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and mean arterial pressure (MAP) were recorded. Changes in SBP, DBP, and MAP were recorded for 20 min.

2.3.3.6. Biochemical parameters

After the arterial pressure measurements, blood samples were collected from the left carotid artery. Serum was obtained by centrifugation at 1,500g for 10 min. Sodium, potassium, urea and creatinine levels were measured using an automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 plus). The serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity was determined by indirect fluorimetry according to methods described by Santos et al. (1985).

2.3.3.7. Mesenteric vascular beds (MVBs) reactivity

After blood collection and before euthanasia, the MVBs were isolated and prepared for perfusion according to McGregor (1965). The organs were placed in a water-jacketed organ bath and perfused at 6 mL/min with PSS (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.1 mM dextrose, and 0.03 mM EDTA) at 37°C and gassed with 95% O₂/5% CO₂. Changes in the perfusion pressure (PP; mmHg) were detected by a pressure transducer coupled to a PowerLab® recording system and an application program (Chart, v 4.1; all from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). After equilibration for 30 min, the integrity of preparation was checked by a bolus injection of 120 mmol KCl. Phenylephrine (Phe; 0.1, 0.3, and 1 nmol; 10-30 µL) and angiotensin II (Ang II; 0.1, 0.3, and 1 nmol; 10-30 µL) were then administered. After a new equilibration period (30 min), the kidneys were continuously perfused with PSS plus 3 µM Phe to induce a prolonged increase in PP. Under these conditions, vascular reactivity to sodium nitroprusside (SNP; 1, 3, and 10 pmol; 10-30 µL) and acetylcholine (ACh; 1, 3, and 10 pmol; 10-30 µL) was evaluated. An equilibration period of 15 min was allowed between each drug administration.

2.3.3.8. Relative weight and histopathological analysis of the heart and left ventricle morphometry

After euthanasia by an intravenous injection of 19.1% potassium chloride, the heart was removed, longitudinally sectioned, and cleaned. The relative weight of the heart was determined ($WT\% = \text{absolute organ weight} \times 100 / \text{body weight}$). Part of the cardiac tissue was placed in 10% buffered formalin. The samples were then dehydrated in alcohol, cleared with xylene, and embedded in paraffin. Samples were sectioned (5 mm), stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope. Image data acquisition and analysis were performed using Motic Images Plus 2.0 software.

2.3.3.9. Cardiac and vascular redox status

After euthanasia, part of the heart, aorta and right kidney tissue were removed and homogenized in K^+ phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), in a 1:10 dilution. Superoxide dismutase (SOD) was analyzed by the method of pyrogallol oxidation (Gao et al., 1998). Lipid peroxidation (LPO) rate was measured by the FOX method according to protocol described by Jiang et al. (1992). Catalase (Cat) activity was measured based on a previously described technique (Beers and Sizer, 1952). The results were expressed by the amount of protein in the homogenates, determined by a method described elsewhere (Bradford, 1976).

2.3.4. Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) measurement

The role of AERV on cGMP levels was evaluated according to methods described by Estancial et al. (2015). For this, the aortic rings from 2K1C rats (2-3 mm; n = 5) were removed and mounted in an organ bath with Krebs-Henseleit solution (composition in mm: 117 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4$, 1.2 KH_2PO_4 , 25 $NaHCO_3$ and 11 glucose) at 37 °C and gassed with 95% O_2 /5% CO_2 . A resting period of 1 h, under tension of 2 grams, was allowed before experiments. Then, aortic rings were then incubated for 15 min with SNP (10 μ m), or AERV in different concentrations (0.001, 0.003, and 0.01 mg/ml) in the absence and in the presence of soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor ODQ (100 μ m, 30 min). Then, tissues were removed, frozen, homogenized in trichloroacetic acid (5% wt/vol), centrifuged (10 min at 4 °C at 1500 g) and the supernatant was collected. Methods for antibody incubation, and the measurement of intracellular cGMP were performed as described in commercially available kits (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, USA). All experiments were performed in triplicate.

2.4. Statistical analyses

Data were analyzed for homogeneity of variance and normal distribution. Differences among means were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. The significance level was set at 95% ($p < 0.05$) and results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.).

3. Results

3.1. Chemical constituents from AERV

The leave aqueous extract from *R. viburnoides* was analyzed by LC-DAD-MS and its constituents were annotated (Figure 1, Table 1).

Peaks 1, 2 and 3 presented deprotonated ions at m/z 191.0534, 341.1095 and 191.0209, which were compatible to molecular formulae $C_7H_{12}O_6$, $C_{12}H_{22}O_{11}$ and $C_6H_8O_7$, respectively. They were putatively annotated as quinic acid (1), di-O-hexoside (2) and citric acid (3). The compounds 5 and 7 showed UV spectra similar to caffeic acid chromophores ($\lambda_{max} \approx 299$ and 325 nm) (Silva et al., 2013). The fragment ions at m/z 191 and 179 are relative to quinic acid and caffeic acid, and the relative abundance of ion m/z 179 was used to suggest the esterification position of quinic acid (Clifford et al., 2003). Thus, the metabolites 5 and 6 were identified as 3-O-E-caffeoyl quinic acid and 5-O-E-caffeoyl quinic acid and they were confirmed by injection of authentic standards.

The peaks 6 and 8 did not presented absorption on UV and showed deprotonated ions at m/z 431.1195 ($C_{18}H_{24}O_{12}$) and 413.1084 ($C_{18}H_{22}O_{11}$). The losses of hexosyl (162u) and subsequently of a water molecule (18 u), as well as the losses of a cetene (C_2H_2O , 42u) and carbon dioxide (CO_2 , 44u) suggested for both compounds the presence of hexosyl, acetyl and carboxylic acid groups in the structures of 6 and 8. For example, the fragment ions m/z 251 [M-H-hexosyl- H_2O]-, 165 [M-H-hexosyl- H_2O - C_2H_2O - CO]- and 191 [M-H-hexosyl- H_2O - C_2H_2O].

They were putatively annotated as the iridoids asperulosidic acid and asperuloside, which showed similar spectral data reported for them and they were identified in Rubiaceae family (Wang et al., 2020, Zhao et al., 2018, Li et al., 2008).

The characteristic UV absorption bands of 9 (265 and 355 nm) and (265 and 346nm), suggested that these compounds are flavonols (Silva et al., 2013). Compounds 59 and 11 displayed deprotonated ion at m/z 609.1472 and 593.1521, indicating molecular formulas of $C_{27}H_{30}O_{16}$ and $C_{27}H_{30}O_{15}$ respectively. Both compounds showed a loss of 308

u that is relative to hexosyl and deoxyhexosyl substituents, and ions aglycones showed m/z 301 (9) and 285 (11). In this way, 9 and 11 were putatively identified as O-hexosyl-deoxyhexosyl-quercetin and O-hexosyl-deoxyhexosyl-kaempferol (de Villiers, Venter and Pasch, 2016).

The isomers 12 and 13 showed ions at m/z 681.3823 and 681.3832 [M-H]⁻ and suggested the molecular formula of C₃₆H₅₈O₁₂. The fragmentation pattern of these compounds was basically the same, the product ions m/z 519 was yielded from loss of a hexosyl group (162 u). The ions with m/z 407 and 207 are relative to a retro Diels-Alder (RDA) cleavage of the ring C (double bond on C₁₂), followed by dehydration. The ion m/z 407 is relative to rings D and E moiety O-linked to the H group, while the m/z 207 represents the rings A and B. In this way, 12 and 13 were identified trachelosperosides B-1 or E-1 (Abe and Yamauchi, 1987a). These compounds were already reported from *R. viburnioides* by Young and co-workers (1998).

Finally, compounds 15 and 16 were annotated as triterpenoid saponins. The compound 16 m/z 955.4914 [M-H]⁻, (C₄₈H₇₆O₁₉) showed sequential losses of 162 and 176u suggesting the substituents hexosyl and glucuronyl, and these losses yielded aglycone the fragment ion m/z 455 (C₃₀H₄₇O₃) relative to aglycone. Compound 15 (m/z 1087.5303 [M-H]⁻, C₅₃H₈₄O₂₃) was very similar to 16, but with an additional substituent O-pentosyl and the data suggests that they are bisdesmosidic saponins (Kanwal et al., 2018).

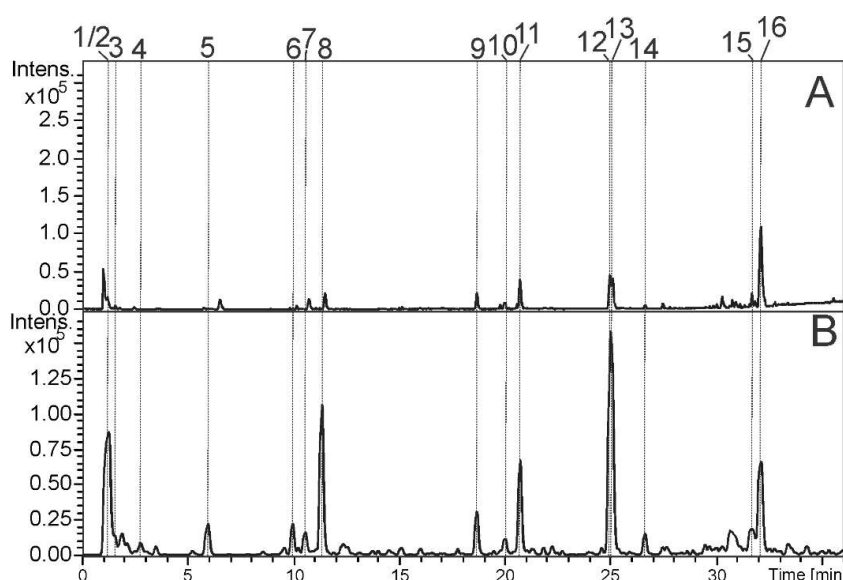


Figure 1. Base peak chromatograms from leaves aqueous extract of *Rudgea viburnoides* (AERV) obtained in positive (A) and negative ion modes (B).

Table 1. Metabolites identified from aqueous extract obtained from leaves of *R. viburnoides* (AERV) by LC-DAD-MS/MS.

Peak	RT (min)	UV (nm)	MF	Positive ion mode (m/z)	Negative ion mode (m/z)		Compound
				MS [M+H] ⁺	MS [M-H] ⁻	MS/MS	
1	1.1	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	193.0696	191.0534	191 (bp), 173	Quinic acid
2	1.1	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	341.1095	191(bp)	di-O-hexoside
3	1.5	-	C ₆ H ₈ O ₇	193.0367	191.0209	-	Citric acid
4	2.7	-	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	373.1113	371.0991	191, 173 (bp)	Glycosylated iridoid
5	5.9	295 ^{sh} , 325	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1006	353.0873	191 (bp), 179	3-O-E-caffeoylquinic acid st
6	9.9	-	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	-	431.1195	251, 165 (bp)	Asperulosidic acid
7	10.5	295 ^{sh} , 325	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1021	353.0873	191 (bp), 179	5-O-E-caffeoylquinic acid st
8	11.3	-	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	415.1223	413.1084	191, 147 (bp)	Asperuloside
9	18.7	265, 355	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1595	609.1472	300 (bp), 301, 271, 255, 243	O-hexosyl-deoxyhexosyl quercetin
10	20.0	-	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₁	507.2822	505.2655	191 (bp)	Unknown
11	20.8	265, 346	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1644	593.1521	327, 285 (bp), 284, 255, 277, 162	O-hexosyl-deoxyhexosyl kaempferol
12	25.0	-	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	683.3967	681.3823	519 (bp), 501, 407, 207	Trachelosperosides B-1 or E-1
13	25.1	-	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	683.3981	681.3832	519 (bp), 501, 489, 457, 407, 207	Trachelosperosides B-1 or E-1
14	26.6	-	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	667.4027	665.3757	503 (bp), 441, 409	Triterpene glycosylated (Arjunoglucoside I)
15	32.1	-	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	1089.5298	1087.5303	925 (bp), 793, 631, 613, 569, 469, 455, 353, 161	O-glucoronyl-hexosyl-pentosyl O-hexosyl triterpene
16	32.2	-	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	957.5026	955.4914	793 (bp), 749, 731, 631, 613, 569, 551, 455, 337, 179	O-glucoronyl-hexosyl O-hexosyl triterpene

RT: retention time; sh: shoulder; bp: base peak; st: confirmed by injection of authentic standard.

3.2. Toxicological findings

No changes in behavior nor deaths were recorded during the 14-day observation period. Animals treated with all doses of AERV presented a significant reduction on feed consumption and body weigh gain. Regarding the relative organ weight, there not significant difference among rats treated with AERV when compared to the control. No gross changes were observed in heart, lung, liver, spleen, kidneys, ovaries and uterus as well as no histopathological changes in heart, liver and kidneys (data not shown).

3.3. Effects on urinary volume and renal electrolyte excretion

On the 1st day of treatment, none of the experimental groups had significant differences in urinary volume excreted (Table 2). On the other hand, animals in the negative control, ESAERV 30 and 100 mg/kg had a significant reduction in renal excretion of Na^+ , Ca^{2+} , and Cl^- when compared to Sham-operated animals. Interestingly, animals treated with AERV (300 mg/kg) or METO presented urinary Na^+ , Ca^{2+} , and Cl^- values similar to those of the Sham-operated group. The urinary density of the negative control group was significantly lower than that found in the Sham-operated group. All other parameters evaluated were not altered by any of the treatments performed.

Table 2. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 1st day of treatment.

Group	Urinary Volume (ml/100g/8h)	El _{Na⁺} (μEq/min/100g)	El _{K⁺} (μEq/min/100g)	El _{Ca²⁺} (μEq/min/100g)	El _{Cl⁻} (μEq/min/100g)	pH	Density
Sham	3.771 ± 0.188	1.694 ± 0.108	0.571 ± 0.029	0.021 ± 0.001	1.902 ± 0.113	8.5 ± 0.04	1015 ± 0.84
C-	4.517 ± 0.219	0.826 ± 0.006 ^b	0.546 ± 0.010	0.012 ± 0.002 ^b	0.981 ± 0.016 ^b	8.3 ± 0.02	1010 ± 0.28 ^b
ESRV (30 mg/kg)	3.665 ± 0.021	0.887 ± 0.087 ^b	0.615 ± 0.032	0.007 ± 0.001 ^b	1.021 ± 0.029 ^b	8.7 ± 0.13	1015 ± 0.42
ESRV (100 mg/kg)	3.831 ± 0.445	0.878 ± 0.057 ^b	0.614 ± 0.045	0.012 ± 0.001 ^b	1.026 ± 0.074 ^b	8.7 ± 0.15	1015 ± 0.42
ESRV (300 mg/kg)	3.279 ± 0.129	1.473 ± 0.054 ^a	0.554 ± 0.018	0.029 ± 0.001 ^a	1.653 ± 0.025 ^a	8.6 ± 0.05	1016 ± 1.52
METO (25 mg/kg)	4.378 ± 0.223	1.651 ± 0.082 ^a	0.520 ± 0.069	0.022 ± 0.003 ^a	1.791 ± 0.038 ^a	8.1 ± 0.17	1014 ± 1.15

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; *p < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

The effects of oral administration of AERV on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on the 7th day of treatment are presented in Table 3. At this time, animals in the negative control or AERV (30, 100, and 300 mg/kg) groups had a significant reduction in urinary volume when compared to the sham-operated animals. In addition, negative control and ESRV AERV 30 and 100 mg/kg groups showed a significant increase in urinary density. On the other hand, animals treated with METO or AERV 300 mg/kg showed an important reduction in urinary density when compared to negative control group. None of the treatments performed significantly altered the elimination of electrolytes or the urinary pH.

Table 3. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 7th day of treatment.

Group	Urinary Volume (ml/100g/8h)	El _{Na+} (μEq/min/100g)	El _{K+} (μEq/min/100g)	El _{Ca2+} (μEq/min/100g)	El _{Cl-} (μEq/min/100g)	pH	Density
Sham	5.272 ± 0.224	1.207 ± 0.087	0.591 ± 0.031	0.011 ± 0.001	1.348 ± 0.194	7.8 ± 0.06	1007 ± 0.42
C-	3.862 ± 0.613 ^b	1.261 ± 0.124	0.597 ± 0.034	0.013 ± 0.003	1.344 ± 0.127	7.7 ± 0.05	1013 ± 0.57 ^b
ESRV (30 mg/kg)	3.661 ± 0.208 ^b	1.178 ± 0.026	0.570 ± 0.011	0.009 ± 0.001	1.319 ± 0.122	7.8 ± 0.07	1017 ± 1.11 ^b
ESRV (100 mg/kg)	2.939 ± 0.396 ^b	0.906 ± 0.096	0.438 ± 0.022	0.009 ± 0.001	0.971 ± 0.106	7.8 ± 0.11	1017 ± 1.83 ^b
ESRV (300 mg/kg)	3.513 ± 0.334 ^b	0.702 ± 0.268	0.396 ± 0.099	0.008 ± 0.004	0.803 ± 0.314	7.6 ± 0.14	1006 ± 2.30 ^a
METO (25 mg/kg)	4.043 ± 0.333	1.181 ± 0.140	0.540 ± 0.078	0.009 ± 0.006	1.295 ± 0.182	7.7 ± 0.02	1008 ± 0.57 ^a

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; ^ap < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

On the 14th day of treatment, negative control animals showed a significant reduction in urinary volume and renal excretion of Na⁺, Ca²⁺ and Cl⁻. The animals treated with AERV at doses of 30 and 100 mg/kg showed the urinary volume and the renal elimination of electrolytes in a very similar way to the animals of the negative control (Table 4). Interestingly, all animals treated with AERV at its highest dose (300 mg/kg) did not present significant differences in the urinary volume or renal excretion of Na⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ when compared to the Sham-operated group. On the other hand, animals that received METO showed a significant reduction in the Ca²⁺ and Cl⁻ elimination when compared to the Sham-operated group, although the final urinary volume was not significantly altered (Table 4).

Table 4. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 14th day of treatment.

Group	Urinary Volume (ml/100g/8h)	El _{Na+} (μEq/min/100g)	El _{K+} (μEq/min/100g)	El _{Ca2+} (μEq/min/100g)	El _{Cl-} (μEq/min/100g)	pH	Density
Sham	4.319 ± 0.399	1.363 ± 0.101	0.635 ± 0.057	0.034 ± 0.002	1.853 ± 0.124	7.8 ± 0.02	1016 ± 0.96
C-	3.389 ± 0.032 ^b	0.846 ± 0.049 ^b	0.809 ± 0.101	0.017 ± 0.003 ^b	1.376 ± 0.096 ^b	7.8 ± 0.14	1018 ± 0.80
ESRV (30 mg/kg)	3.139 ± 0.186 ^b	0.893 ± 0.028 ^b	0.641 ± 0.049	0.018 ± 0.002 ^b	1.340 ± 0.016 ^b	7.7 ± 0.20	1018 ± 1.23
ESRV (100 mg/kg)	2.794 ± 0.407 ^b	1.193 ± 0.141	0.658 ± 0.076	0.012 ± 0.002 ^b	1.003 ± 0.153 ^b	7.6 ± 0.16	1015 ± 0.73
ESRV (300 mg/kg)	4.350 ± 0.164 ^a	1.319 ± 0.023 ^a	0.796 ± 0.129	0.040 ± 0.009 ^a	1.807 ± 0.082 ^a	7.7 ± 0.02	1016 ± 0.28
METO (25 mg/kg)	3.975 ± 0.050 ^a	1.169 ± 0.118	0.652 ± 0.009	0.009 ± 0.002 ^b	1.190 ± 0.134 ^b	7.6 ± 0.08	1017 ± 1.15

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; ^ap < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

The effects of oral administration of AERV on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on the 21st day of treatment are presented in Table 5. Rats in the negative control group continued to present a significant reduction of urinary volume and renal excretion of K^+ and Ca^{2+} . Similarly, animals receiving METO showed a significant reduction in urinary volume and renal Ca^{2+} and Cl^- excretion. In addition, animals treated with AERV at doses of 30 and 100 mg/kg showed a significant reduction in urinary volume when compared to animals of the Sham-operated group. On the other hand, hypertensive rats treated with ESRV AERV (300 mg/kg) had their renal function preserved, with effects similar to those obtained with Sham-operated animals. The urinary density of the negative control rats, METO, or AERV at doses of 30 and 100 mg/kg were significantly higher than the animals in the Sham or AERV groups at their highest dose (300 mg/kg).

On the 28th day of treatment, all hypertensive rats that received no treatment had a significant reduction in urinary volume and Na^+ , Ca^{2+} and Cl^- excretion when compared to Sham-operated rats (Table 6). Similar to what was observed in previous weeks, METO-treated rats also showed a significant reduction in urinary volume and renal elimination of Ca^{2+} and Cl^- . The animals receiving doses of 30 and 100 mg/kg of AERV continued to show a significant reduction in urinary volume and renal elimination of Ca^{2+} , accompanied by normalization of urinary elimination of Na^+ , K^+ and Cl^- (Table 6). On the other hand, all animals treated with ESRV AERV at its high dose had urinary volume and electrolyte excretion similar to the Sham-operated rats. In addition, urinary density remained significantly increased in animals of the negative control or AERV at dose of 30 mg/kg (Table 6).

Table 5. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 21st day of treatment.

Group	Urinary Volume (ml/100g/8h)	El _{Na+} (μEq/min/100g)	El _{K+} (μEq/min/100g)	El _{Ca2+} (μEq/min/100g)	El _{Cl-} (μEq/min/100g)	pH	Density
Sham	5.111 ± 0.117	1.319 ± 0.144	0.667 ± 0.030	0.020 ± 0.001	1.486 ± 0.041	7.2 ± 0.12	1012 ± 0.55
C-	3.209 ± 0.422 ^b	1.157 ± 0.182	0.419 ± 0.069 ^b	0.007 ± 0.004 ^b	1.279 ± 0.196	7.3 ± 0.12	1018 ± 1.15 ^b
ESRV (30 mg/kg)	3.143 ± 0.040 ^b	1.192 ± 0.011	0.523 ± 0.015	0.027 ± 0.001 ^a	1.422 ± 0.015	7.6 ± 0.17	1022 ± 0.73 ^b
ESRV (100 mg/kg)	3.712 ± 0.099 ^b	1.295 ± 0.028	0.565 ± 0.013	0.018 ± 0.002 ^a	1.417 ± 0.052	7.6 ± 0.19	1017 ± 1.11 ^b
ESRV (300 mg/kg)	4.387 ± 0.264 ^a	0.899 ± 0.169	0.781 ± 0.013 ^a	0.041 ± 0.002 ^a	1.344 ± 0.060	7.3 ± 0.11	1012 ± 1.73 ^a
METO (25 mg/kg)	3.062 ± 0.022 ^b	0.880 ± 0.182	0.495 ± 0.099	0.009 ± 0.003 ^b	0.892 ± 0.213 ^b	7.3 ± 0.34	1019 ± 0.28 ^b

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; ^ap < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

Table 6. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on urinary volume and electrolyte excretion, pH and density on 28th day of treatment.

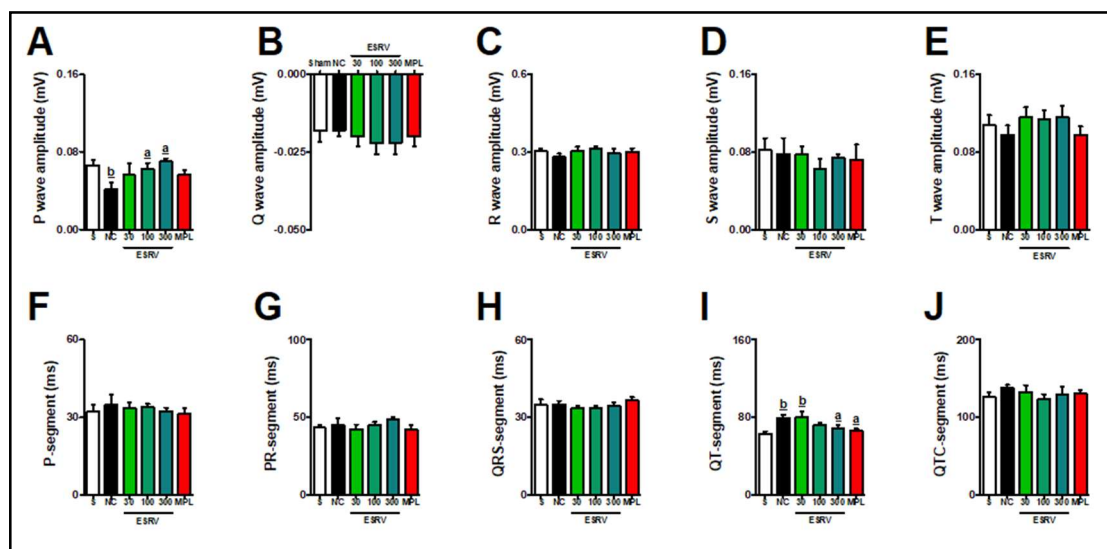
Group	Urinary Volume (ml/100g/8h)	El _{Na+} (μEq/min/100g)	El _{K+} (μEq/min/100g)	El _{Ca2+} (μEq/min/100g)	El _{Cl-} (μEq/min/100g)	pH	Density
Sham	4.196 ± 0.098	1.348 ± 0.086	0.639 ± 0.026	0.063 ± 0.005	1.532 ± 0.081	7.4 ± 0.17	1015 ± 0.91
C-	3.350 ± 0.064 ^b	0.860 ± 0.022 ^b	0.680 ± 0.010	0.020 ± 0.001 ^b	1.039 ± 0.027 ^b	7.6 ± 0.18	1019 ± 0.57 ^b
ESRV (30 mg/kg)	3.504 ± 0.142 ^b	1.311 ± 0.102	0.681 ± 0.045	0.022 ± 0.003 ^b	1.527 ± 0.085 ^a	7.7 ± 0.17	1018 ± 0.42 ^b
ESRV (100 mg/kg)	3.449 ± 0.125 ^b	1.296 ± 0.071	0.608 ± 0.001	0.015 ± 0.001 ^b	1.413 ± 0.077 ^a	7.6 ± 0.14	1014 ± 0.55 ^a
ESRV (300 mg/kg)	3.927 ± 0.192 ^a	1.289 ± 0.079	0.667 ± 0.026	0.037 ± 0.016	1.465 ± 0.098 ^a	7.5 ± 0.12 ^a	1015 ± 0.57 ^a
METO (25 mg/kg)	3.433 ± 0.215 ^b	1.274 ± 0.159	0.678 ± 0.106	0.016 ± 0.003 ^b	1.165 ± 0.171	7.3 ± 0.11	1017 ± 2.30

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; *p < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

3.4. Effects on electrical cardiac activity

Fig. 2A-J shows quantitative electrocardiography data for Sham-operated and 2K1C-hypertensive rats that were treated with AERV (30, 100 and 300 mg/kg), MPL (20 mg/kg), or vehicle. We did not observe any significant changes in electrocardiographic characteristics of amplitude of the Q, R, S and T waves or the P, PR, QRS and QTC segments in any of the experimental groups. However, electrocardiographic changes were observed in hypertensive rats that were treated only with vehicle. We observed significant P wave shortening and prolongation of the QT segment (Fig. 2A and I). All of these alterations were prevented by treatment with AERV (mainly at doses of 100 and 300 mg/kg) and MPL. The values for all parameters that were evaluated in animals treated with AERV or MPL were statistically similar to Sham-operated rats.

Figure 2. Electrocardiographic quantitative data of Sham (S) or 2K1C-hypertensive rats treated with AERV (30, 100 and 300 mg/kg), MPL (20 mg/kg), or vehicle (NC). P (A), Q (B), R (C), S (D) and T-waves amplitudes (E) and P (F), PR (G), QRS (H), QT (I) and QTC-segments (J) are showed. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. AERV: aqueous extract from *Rudgea virbunoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control.

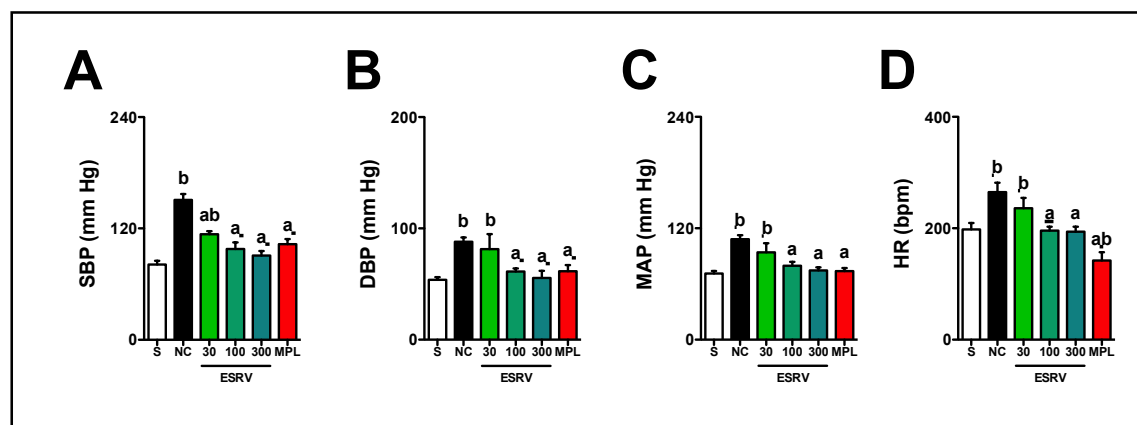


3.5 Effects on blood pressure

3.5.1 Effects on blood pressure and heart rate

The values obtained for blood pressures levels and heart rate for Sham-operated and 2K1C-ovariectomized rats treated with vehicle, MPL or AERV (30, 100, and 300 mg/kg) are shown in Fig. 3A-D. SBP, DBP, MAP, and HR of Sham-operated animals were 95 ± 3.9 , 53 ± 2.4 , 75 ± 3.6 mm Hg, and 198 ± 14 bpm, respectively. All animals in the negative control group presented a significant increase in blood pressure and heart rate, with values of 150 ± 6.2 , 88 ± 3.7 , 108 ± 4.3 mm Hg, and 264 ± 17 bpm for SBP, DBP, MAP, and HR, respectively. Prolonged oral treatments with AERV (At doses of 100 and 300 mg/kg) were able to prevent the significant increase in blood pressure and heart rate observed in animals of the negative control group. As expected, animals treated with MPL had an additional reduction in the HR even when compared to the Sham-operated group.

Figure 3: Prolonged oral administration of AERV obtained from *Rudgea virbunoides* reverses changes in blood pressure and heart rate induced by 2K1C hypertensive rats. SBP (A), DBP (B), MAP (C), and HR (D) are showed. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. AERV: aqueous extract from *Rudgea virbunoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control; S: Sham-operated group.



3.6. Effects on serum parameters

All rats with renovascular hypertension that were treated with vehicle alone (negative control) or with AERV at its lower dose (30 mg/kg) exhibited a significant increase in serum urea and creatinine levels compared with Sham-operated animals. Treatment with ESRV AERV (100 and 300 mg/kg) and METO prevented the increase in serum urea and creatinine levels, with values that were similar to Sham-operated group (Table 7). On the other hand, serum levels of Na^+ and K^+ were not significantly different between all experimental groups (Table 7).

All 2K1C hypertensive rats treated for 28 days with the vehicle or AERV at its lowest dose (30 mg/kg) showed a significant increase in the plasma ACE activity. On the other hand, 2K1C hypertensive rats treated with ESRV AERV at doses of 100 and 300 mg/kg or MPL showed a significant reduction in ACE activity, with values close to Sham-operated group (Table 7).

Tabela 7. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on serum Na⁺, K⁺, urea, creatinine, and plasmatic ACE activity on 28th day of treatment

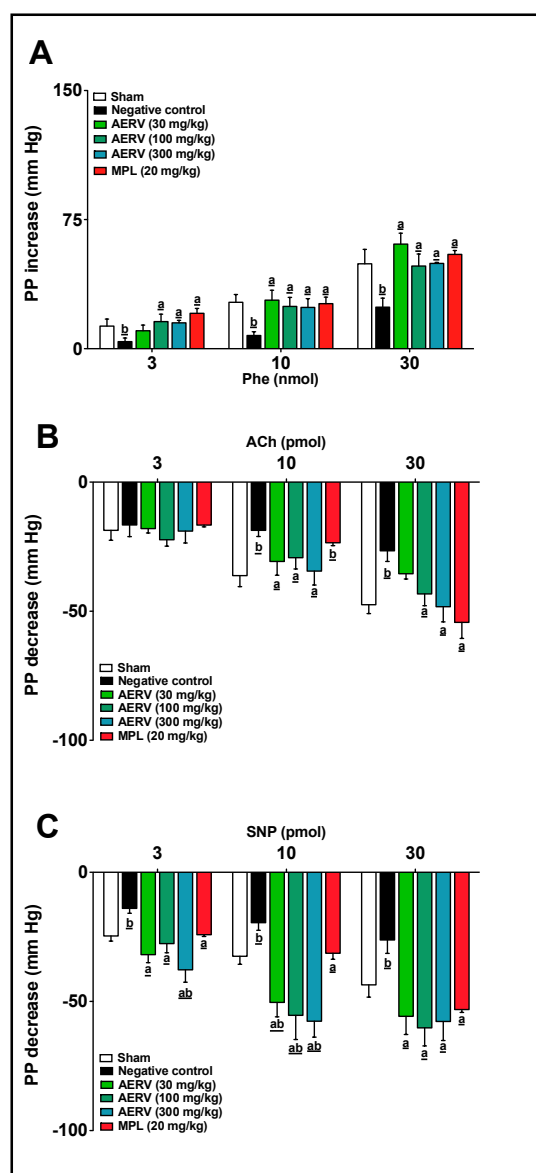
Group	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	ACE activity (mmol/min/mL)
Sham	126.5 ± 1.21	5.81 ± 0.22	57.32 ± 0.93	0.32 ± 0.02	85 ± 10.10
C-	130.2 ± 1.86	6.15 ± 0.35	85.80 ± 2.75 ^b	0.67 ± 0.03 ^b	155 ± 13.22 ^b
ESRV (30 mg/kg)	131.7 ± 1.99	6.22 ± 0.12	77.08 ± 1.56 ^b	0.59 ± 0.02 ^b	121 ± 9.11 ^b
ESRV (100 mg/kg)	129.9 ± 1.23	6.13 ± 0.51	56.63 ± 1.17	0.33 ± 0.01	98 ± 10.24 ^a
ESRV (300 mg/kg)	126.0 ± 2.03	5.77 ± 0.22	57.36 ± 1.23	0.35 ± 0.03	90 ± 12.11 ^a
METO (25 mg/kg)	129.1 ± 1.92	5.41 ± 0.21	58.22 ± 3.21	0.37 ± 0.05	100 ± 11.08 ^a

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; ^ap < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. El: Excreted load; METO: Metoprolol.

3.7. Effects on MVBs reactivity

In the negative control group, Phe administration induced a vasoconstrictive effect in the MVBs, which was ~50% lower than in Sham-operated rats (Fig. 4A). Similarly, the vasodilatory response to ACh and SNP was significantly lower in the negative control group when compared with normotensive rats (Fig. 4B and C). Prolonged treatment with AERV (at all doses) was able to prevent all changes, presenting a pattern of SNP-response significantly higher than that found in Sham-operated animals. Surprisingly, the response obtained with the AERV- treatment was significantly higher than that obtained with MPL.

Figura 4: Effects of the prolonged oral administration of AERV obtained from *Rudgea virbunoides* on mesenteric vascular reactivity of 2K1C-hypertensive rats. Effects of phenylephrine (A), acetylcholine (B), and sodium nitroprusside (C) are showed. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8-10) in comparison with NC (ap < 0.05) or Sham-operated rats (bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. ACh: acetylcholine; AERV: aqueous extract from *Rudgea virbunoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control; Phe: phenylephrine; PP: perfusion pressure; SNP: sodium nitroprusside.

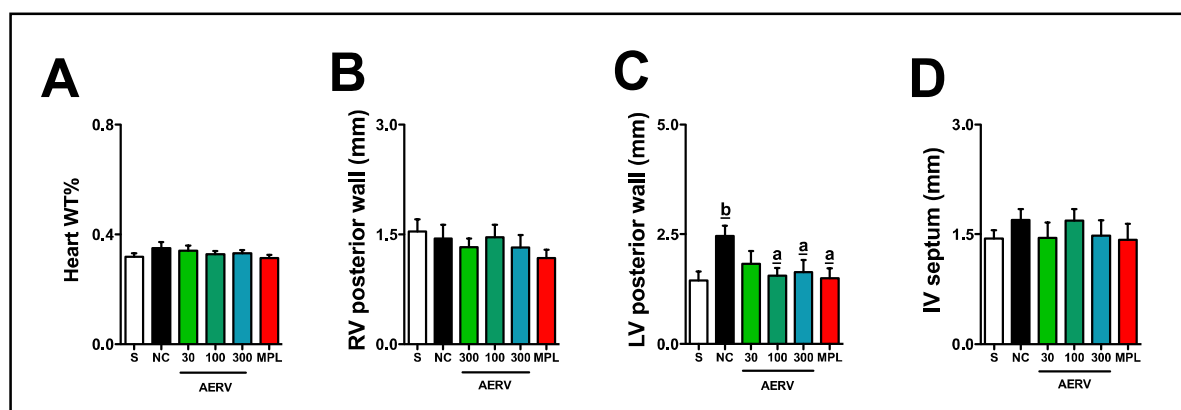


3.8. Effects on cardiac morphology

The relative weight of the heart (WT%) and morphometric measures of the right ventricle (RV), left ventricle (LV), and interventricular septum (IV) are shown in Fig. 5A-D. We observed a significant increase in the LV posterior wall thickness (1.45 ± 0.20 mm

vs. 2.46 ± 0.23 mm) in the negative control group compared with Sham-operated animals. Treatment with AERV and MPL reduced the thickness of the LV in 2K1C-hypertensive rats, with values that were similar to normotensive animals.

Figura 5. AERV treatment reduces heart histopathological changes induced by 2K1C-hypertensive rats. WT% of the heart (A), and morphometric data of right ventricle posterior wall (B), left ventricle posterior wall (C), and interventricular septum (D) are shown. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8-10$) in comparison with NC ($ap < 0.05$) or Sham-operated rats ($bp < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. AERV: aqueous extract from *Rudgea virbunoides*; MPL: metoprolol; NC: negative control; S: Sham-operated group.



3.9. Effects on cardiac and vascular redox status

The results obtained from tissue redox status are presented in Table 8. Renovascular hypertension increased lipid peroxidation levels by $\sim 60\%$ and 30% in the heart and aorta samples, respectively, when compared to Sham-operated animals. In addition, Cat and SOD activity were also significantly reduced in negative control rats. AERV-treatment (100 and 300 mg/kg) significantly raised SOD and Cat activity, besides prevented lipid peroxidation in all tissues evaluated. Unlike AERV, MPL was not able to reverse the changes found in heart and vascular tissues.

Tabela 8. Effects of oral administration of AERV obtained from *Rudgea viburnoides* on tissue redox status.

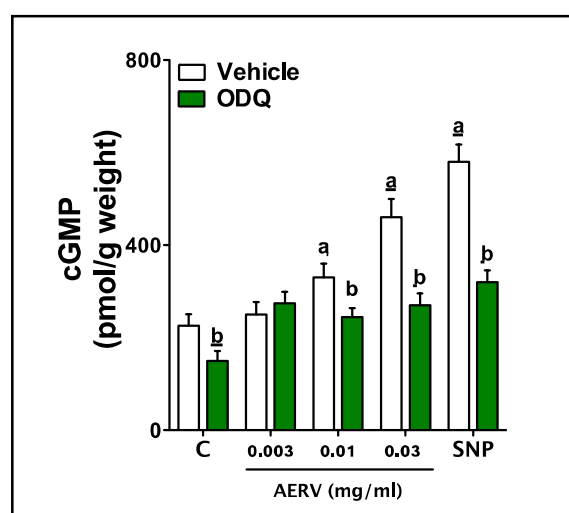
Parameter	Sham	C-	ESCC (30 mg/kg)	ESCC (100 mg/kg)	ESCC (300 mg/kg)	MPL (25 mg/kg)
Heart						
SOD	40.57 ± 1.61	30.54 ± 0.61 ^b	34.89 ± 1.49 ^b	38.03 ± 1.23 ^a	40.46 ± 1.40 ^a	34.84 ± 1.84 ^b
Cat	45.10 ± 4.33	25 ± 5.15 ^b	52 ± 6.68 ^a	45 ± 3.61 ^a	55 ± 9.21 ^a	28 ± 75.35 ^b
LPO	16.48 ± 0.97	25.17 ± 0.35 ^b	18.10 ± 0.65	17.99 ± 0.73	17.42 ± 0.59 ^a	17.93 ± 0.37
Aorta						
SOD	71.73 ± 5.00	62.37 ± 2.55	67.48 ± 1.36	68.61 ± 1.37	69.64 ± 1.73	62.83 ± 1.53
Cat	61 ± 3.79	41 ± 4.58 ^b	52 ± 5.79	58 ± 4.38 ^a	77 ± 4.25 ^a	49 ± 4.31 ^b
LPO	6.90 ± 0.53	8.54 ± 0.38 ^b	7.61 ± 0.41	7.29 ± 0.41	6.91 ± 0.47 ^a	7.22 ± 0.33

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 8-10 rats in each group in comparison with the negative control (C-; *p < 0.05) or Sham-operated group (^bp < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. MPL: Metoprolol. SOD: Superoxide dismutase (Unit of SOD/mg of protein); Cat: Catalase (Unit of SOD/mg of protein); LPO: lipoperoxides (nmol hydroperoxides/mg of protein).

3.10. Effects on intracellular cGMP levels

Incubation of AERV (0.01 and 0.03 mg/mL) with the aortic rings of 2K1C⁻ hypertensive rats increased the cGMP levels by ~ 39% and 81%, respectively, when compared with basal levels, whereas its co-incubation with ODQ (100 μm) completely abolished this effect. The NO-donor SNP increased the cGMP levels by ~ 106%, whereas co-incubation with ODQ completely vanished SNP-mediated increases in cGMP (Fig. 6).

Figura 6. Role of NO/cGMP pathway on the vascular effects of AERV. Intracellular cGMP levels from 2K1C-hypertensive rat aortic rings incubated with ESCC (0.003, 0.01, and 0.03 mg/ml) or sodium nitroprusside (SNP), in the absence and in the presence of ODQ (100 μm) are showed. The results show the mean ± S.E.M. of 8-10 preparations per group. p < 0.05 vs acontrol (C) or after incubation with bODQ.



4. Discussion

In our study we chose to use a renovascular hypertension (RH) model developed by Goldblatt et al. (1952) - i.e. 2K1C-model. Usually this pathology is caused by stenosis of the renal artery leading to the hypoperfusion of juxtaglomerular cells with sustained activation of the renin-angiotensin system (RAS). Although it accounts for only 1-2% of cases of hypertension in the adult population, it plays a significant role in the secondary causes of hypertension in young people. Furthermore, the disease is quite common in a patient with atherosclerosis and appears to be very frequent in certain high-risk populations. The most appropriate therapeutic procedures for HR are proper control of blood pressure levels, preventing ischemic nephropathy progression and biochemical and structural (vascular and cardiac) changes that lead to high morbidity and mortality rates (Samadian et al., 2017).

One of the first changes seen in HR is progressive reduction of renal function. Progressive renal failure gives rise to the cardiorenal syndrome, a clinical condition leading to heart and renal failures (Messerli et al., 2017). Significant reductions in the volume and urinary electrolyte concentration associated with increased serum creatinine levels indicate a negative prognosis on renal function (Bastard et al., 2019). In our study, 2K1C-hypertensive animals showed a significant time-dependent decline in renal function. At the end of 28 days serum creatinine and urea levels were significantly increased and renal function was markedly reduced. Prolonged treatment with AERV, especially at its highest doses, was able to prevent such changes, producing similar responses to normotensive animals. In spite of its hypotensive effect – MPL - a classic antihypertensive, was not able to reverse all alterations presented by HR, showing an inferior effectiveness to that obtained with the animals treated with AERV.

Another important consequence of sustained activation of RAS during RH is vascular functional changes and cardiac remodeling induced by hypertension. Pressure overload induces cardiac remodeling, consisting of diastolic dysfunction and concentric left ventricular hypertrophy. These changes are the most common cardiac complications of hypertension. As a final consequence, dilated cardiomyopathy is established with diastolic dysfunction and reduced ejection fraction (Messerli et al., 2017). Usually these complications can be detected by means of electrocardiographic evaluation, measurement of the ventricular wall, or by atrial and ventricular hemodynamic parameters (Ponikowski et al., 2016). We observed in the 2K1C-hypertensive rats important electrocardiographic

changes consistent with classic cardiac dysfunctions induced by hypertension. A significant P wave flattening and QT prolongation were observed in all no-treated hypertensive rats. Classically, changes in P-wave amplitude may reflect atrial overload, hypertrophy or dilation, a quite common alteration during hypertension and stroke (He et al., 2017). On the other hand, the QT interval, measured from the beginning of the QRS complex at the end of the T wave, is inversely proportional to the heart rate. Correction for heart rate should be made by dividing the QT interval measured by the square root of the preceding RR interval. This corrected measure is referred to as the QTc interval. Although the QTc interval was normal, the animals were tachycardic, and in this case, more subject to arrhythmias resulting from a prolonged QT interval (Postema and Wilde, 2014). It is worth noting that these alterations are quite common in hypertensive patients, especially when they already present considerable morphological changes. Data show that the QT interval may be increased in severe concentric and eccentric left ventricular hypertrophy (Kunisek et al., 2015). If we look at our results, we will see that animals with electrocardiographic abnormalities also present a significant thickening of the posterior ventricular wall, a fact that indicates an important correlation between hypertension, ventricular remodeling and cardiac electrical changes. In the meantime, the efficacy of AERV was surprising, since in addition to reducing blood pressure levels and heart rate, it also prevented cardiac morphological and electrocardiographic changes 2K1C-hypertensive animals.

The relationship between hypertension and endothelial function is now well established (Panza et al., 1990). Data suggest that the severity of hypertension is positively associated with the degree of impairment of endothelial function (Panza et al., 1995). It has been correlated for some time a complex and potentially bidirectional relationship between hypertension and endothelial dysfunction (Sander et al., 1999). In fact, oxidative stress and vascular inflammation are central features of endothelial dysfunction. Changes in reactive oxygen species (ROS) production from mitochondrial NADPH oxidase in hypertensive patients with high levels of angiotensin II appear to be one of the main involved (Doughan et al., 2008). Hypertensive stimuli, such as high salt and angiotensin II, promote the ROS-production in the heart, kidney and vasculature, contributing to endothelial dysfunction or others cardiovascular changes that occur in hypertensive patients (Harrison and Gongora, 2009). The HR model used in this study induced important changes in vascular redox status, leading to profound alterations in vascular reactivity of 2K1C-hypertensive rats.

There is strong evidence that reducing oxidative stress and vascular inflammation is capable of reversing hypertension-induced endothelial dysfunction (Widlansky et al., 2003). An emerging question that arose after the analysis of the abovementioned data was how much the cardiorenal protection induced by AERV is a consequence of a direct ROS-reduction or in an indirect way via RAS inhibition. The indirect effects were evident after concluding that AERV has a significant inhibitory effect on plasma ACE. Classic ACE inhibitors or drugs that indirectly inhibit RAS - such as MPL, a beta-blocker - may have hypotensive and antioxidant effects (Hanif et al., 2010; Hocht et al., 2017). In fact, in our study, we found an important reduction of lipoperoxides (LPO) in cardiac and vascular tissues of 2K1C-hypertensive rats. In addition, AERV was able to effectively modulate the activity of SOD and CAT, two important enzymes that constitute the first line of antioxidant tissue defense.

In an attempt to clarify if there is any antioxidant and cardioprotective effect induced by AERV independently of RAS inhibition, we decided to investigate whether AERV could directly activate the NO/cGMP pathway. Interestingly, we found a considerable increase in intracellular levels of cGMP in the aortic smooth muscle cells of 2K1C-hypertensive rats after exposure to AERV, suggesting independent activation of the NO/cGMP pathway. Classically the antioxidant and cardioprotective effects of NO are well known. Several drugs and natural products may attenuate NO inactivation by superoxide and other reactive oxygen species by exerting antioxidant effects (Bondonno et al., 2015; Pinheiro et al., 2017). In these cases, the production of NO can be induced independently of eNOS-activity. As in some cases after the administration of natural products, NO may also be formed from nitrite (Bondonno et al., 2015). Nitrite has shown antihypertensive effects in 2K1C-hypertensive rats by inhibition of vascular NADPH oxidase with consequent reduction of ROS production (Montenegro et al., 2011).

A limitation of our study was did not to show if there is any interrelation between ACE inhibition by AERV with NO/cGMP pathway activation; but the modulation of the tissue redox state appears to be an important point of convergence. Furthermore, it has not been clear to us if there is any hierarchy of response between the different secondary metabolites found in the AERV. Our phytochemical study showed that AERV presents polyphenolic compounds (glycosylated flavonols and chlorogenic acid), which in isolation or in a coordinated manner may induce pharmacological responses similar to those found here. In fact, the antihypertensive effects of several polyphenol-rich plants may occur via the NO-cGMP pathway and ACE inhibition (Hügel et al., 2016). Future studies can clarify

the true role of each of the compounds present in the AERV and show whether the effect evidenced in this work is due to only one compound, or to the lot of them acting in a synchronized way.

5. Conclusions

The data showed that a 28-days AERV-treatment reduces the progression of the cardiorenal disease in 2K1C hypertensive rats. These effects seem to be involved with an important attenuation of oxidative stress, angiotensin converting enzyme inhibition, and NO/cGMP pathway activation.

Author's contribution

All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; FVP, RACP, BRL, LPG, CAST, and PVMR conducted the experiments; LPG was involved with tecidual antioxidant system analysis; FVP, ALM and DBS was involved with the preparation and chemical analysis of extract; AGJ and DBS wereas responsible for data discussion, manuscript correction. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to the University Hospital of the Federal University of Grande Dourados for some biochemical analyzes. In addition, the authors also would like to thank FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and INAU (Instituto Nacional de áreas úmidas).

Conflict of interest

Authors declare there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grants from the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, 59/300.046/2015), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 449464/2014-8 and 309054/2016-8) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil).

References

Abe, F., Yamauchi, T., 1987a. Glycosides of 19 α -Hydroxyoleanane-Type Triterpenoids from *Trachelospermum asiaticum* (Trachelospermum. IV). Chem. Pharm. Bull. 35(5), 1833-1838.

Abe, F., Yamauchi, T., 1987b. Trachelosperosides, Glycosides of 19 α -Hydroxyursane-Type Triterpenoids from *Trachelospermum asiaticum* (Trachelospermum. III). Chem. Pharm. Bull. 35(5), 1748-1754.

Almeida, J.M.A., Ferreira, A.V.M., Oliveira, V.B., Oliveira, M.C., Teixeira, M.M., Brandão, M.G.L., 2018. Effects of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) Leaves on Metabolic and Inflammatory Dysfunction Induced by High Refined Carbohydrate-Containing Diet in Mice. J. Med. Food 21(12), 1266-1275.

Alves, R.M.S., Stehmann, J.R., Isaias, R.M.S., Brandão, M.G.L., 2004. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham) Benth., (Rubiaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 14(1), 49-56.

Balogun, F.O., Ashafa, A.O.T., 2019. A Review of Plants Used in South African Traditional Medicine for the Management and Treatment of Hypertension. Planta Med. 85(4), 312-334.

Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195(1), 133-140.

Bondonno, C.P., Croft, K.D., Ward, N., Considine, M.J., Hodgson, J.M., 2015. Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. *Nutr. Rev.* 73(4), 216-235.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brown, M.J., Cruickshank, J.K., Dominiczak, A.F., MacGregor, G.A., Poulter, N.R., Russell, G.I., Thom, S., Williams, B., 2003. Better blood pressure control: how to combine drugs. *J. Hum. Hypertens.* 17(2), 81-86.

Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S. and Kuhnert, N. (2003) Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911. <http://dx.doi.org/10.1021/jf026187q>

de Moura, R.S., Resende, Â.C., 2016. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açaí, an Amazon Plant. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 68(1), 19-26.

de Villiers, A., Venter, P., Pasch, H., 2016. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chrom. A* 1430, 16-78.

Doughan, A.K., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2008. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 102, 488–496.

Estancial, C.S., Rodrigues, R.L., De Nucci, G., Antunes, E., Mónica. F.Z., 2015.

Pharmacological characterization of the relaxation induced by the soluble guanylate cyclase activator, BAY 60-2770 in rabbit corpus cavernosum. *BJU Int.* 116(4), 657-664.

Galdino, P.M., Alexandre, L.N., Pacheco, L.F., Lino Junior, R.S., de Paula, J.R., Pedrino, G.R., Xavier, C.H., Ferreira, P.M., 2017. Nephroprotective effect of *Rudgea viburnoides*

(Cham.) Benth leaves on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.* 201, 100-107.

Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 41–45.

Gasparotto Junior, A., Boffo, M.A., Lourenço, E.L., Stefanello, M.E., Kassuya, C.A., Marques, M.C., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *J. Ethnopharmacol.* 122, 517-522.

Hanif, K., Bid, H.K., Konwar, R., 2010. Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertens. Res.* 33(1), 11-21.

Harrison, D.G., Gongora, M.C., 2009. Oxidative stress and hypertension. *Med. Clin. North Am.* 93, 621–635.

He, J., Tse, G., Korantzopoulos, P., Letsas, K.P., Ali-Hasan-Al-Saegh, S., Kamel, H., Li, G., Lip, G.Y.H., Liu, T., 2017. P-Wave Indices and Risk of Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* 48(8), 2066-2072.

Hocht, C., Bertera, F.M., Del Mauro, J.S., Santander Plantamura, Y., Taira, C.A., Polizio, A.H., 2017. What is the Real Efficacy of Beta-Blockers for the Treatment of Essential Hypertension? *Curr. Pharm. Des.* 23(31), 4658-4677.

Hügel, H.M., Jackson, N., May, B., Zhang, A.L., Xue, C.C., 2016. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine.* 23(2), 220-231.

Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.

Kanwal, N., Siddiqui, A.J., Haq, F.U., El-Seedi, H.R., Musharraf, S.G., 2018. Two-stage mass spectrometry approach for the analysis of triterpenoid glycosides in *Fagonia indica*. RSC Adv. 8(71), 41023-41031.

Kunisek, J., Zaputovic, L., Cubranic, Z., Kunisek, L., Zuvic Butorac, M., Lukin-Eskinja, K., Karlavaris, R., 2015. Influence of the left ventricular types on QT intervals in hypertensive patients. Anatol. J. Cardiol. 15(1), 33-39.

Li, C.-m., Zhang, X.-l., Xue, X.-y., Zhang, F.-f., Xu, Q., Liang, X.-m., 2008. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22(12), 1941-1954.

Lopatowska, P., Mlodawska, E., Tomaszuk-Kazberuk, A., Banach, M., Malyszko, J., 2018. Adhering to the principles of clinical pharmacology - the correct fixed combinations of antihypertensive drugs. Expert. Rev. Clin. Pharmacol. 11(2), 165-170.

Malone, M.H., Robichaud, R.C., 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. J. Nat. Prod. - Lloydia, 25, 320-331.

McGregor, D.D., 1965. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. J. Physiol. 177, 21-30.

Messerli, F.H., Rimoldi, S.F., Bangalore, S., 2017. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. JACC Heart Fail. 5(8), 543-551.

Montenegro, M.F., Amaral, J.H., Pinheiro, L.C., Sakamoto, E.K., Ferreira, G.C., Reis, R.I., Marçal, D.M., Pereira, R.P., Tanus-Santos, J.E., 2011. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. Free Radic. Biol. Med. 51(1), 144-152.

Nunes, G.P., Silva, M.F., Resende, U.M., Siqueira, J.M., 2003. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Rev. Bras. Farmacog. 13(2), 83-92.

Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD, 2008. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 1-8.

Oliveira, G.M.M., Mendes, M., Malachias, M.V.B., Morais, J., Moreira Filho, O., Coelho, A.S., Cappingana, D.P., Azevedo, V., Soares, I., Menete, A., Ferreira, B., Soares, M.B.P.C., Fernandes, M. 2017. 2017 Guidelines for Arterial Hypertension Management in Primary Health Care in Portuguese Language Countries. *Arq. Bras. Cardiol.* 109(5), 389-396.

Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E., Epstein, S.E., 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 323, 22–27.

Panza, J.A., García, C.E., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Cannon, R.O. 3rd., 1995. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 91, 1732–1738.

Pinheiro, L.C., Tanus-Santos, J.E., Castro, M.M., 2017. The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension. *Expert. Opin. Ther. Targets* 21(5):543-556.

Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G., Coats, A.J., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., van der Meer, P., 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail.* 18(8), 891-975.

Postema, P.G., Wilde, A.A., 2014. The measurement of the QT interval. *Curr. Cardiol. Rev.* 10(3), 287-294.

Pucci, L.L., Cunha, L.C., Tresvenzol, L.M., De Paula, J.R., Bozinis, M.C.V., De Freitas, P.C.M., 2010. Avaliação da toxicidade aguda oral e da atividade diurética da *Rudgea viburnoides*. Lat. Am. J. Pharm. 29(1), 30-37.

Samadian, F., Dalili, N., Jamalian, A., 2017. New Insights Into Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Renovascular Hypertension. Iran J. Kidney. Dis. 11(2), 79-89.

Sander, M., Chavoshan, B., Victor, R.G., 1999. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. Hypertension 33, 937–942.

Silva, C.S.P., Proença, C.E.B., 2008. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. Acta Bot. Bras. 22(2), 481-492.

Silva, D.B., Okano, L.T., Lopes, N.P. and de Oliveira, D.C., 2013. Flavanone glycosides from *Bidens gardneri* Bak.(Asteraceae). *Phytochemistry*, 96, 418-422.

Tolouei, S.E.L., Tirloni, C.A.S., Palozi, R.A.C., Schaedler, M.I., Guarnier, L.P., Silva, A.O., de Almeida, V.P., Budel, J.M., Souza, R.I.C., dos Santos, A.C., dos Santos, V.S., Silva, D.B., Dalsenter, P.R., Gasparotto Junior, A., 2019. *Celosia argentea* L. (Amaranthaceae) a vasodilator species from the Brazilian Cerrado – An ethnopharmacological report. J. Ethnopharmacol. 229, 115-126.

Umar, A., Imam, G., Yimi, W., Kerim, P., Tohti, I., Berké, B., Moore, N., 2010. Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats. Hypertens. Res. 33, 727–730.

Young, M.C., Araújo, A.R., da Silva, C.A., Lopes, M.N., Trevisan, L.M., Bolzani, V.S., 1998. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnoides*. J. Nat. Prod. 61(7):936-938.

Wang, M., Wang, Q., Yang, Q., Yan, X., Feng, S., Wang, Z., 2020. Comparison of Anthraquinones, Iridoid Glycosides and Triterpenoids in *Morinda officinalis* and *Morinda citrifolia* Using UPLC/Q-TOF-MS and Multivariate Statistical Analysis. *Molecules*, 25, 160; doi:10.3390/molecules25010160

WHO (World Health Organization)., 2013. High blood pressure: a public health priority. World Health Day 2013, Geneva, pp. 1-13.

Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F.Jr., Vita, J.A., 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 1149–1160.

Zhao, X., Wei, J., Yang, M., 2018. Simultaneous Analysis of Iridoid Glycosides and Anthraquinones in *Morinda officinalis* Using UPLC-QqQ-MS/MS and UPLC-Q/TOF-MS. *Molecules* 23, 1070; doi:10.3390/molecules23051070.