

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA-ESENFAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-PPGCF

JOSÉ CLEMENTINO NETO

**Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis  
vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**

Maceió

2015

JOSÉ CLEMENTINO NETO

**Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

Maceió

2015

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

C626s Clementino Neto, José.  
Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético / José Clementino Neto. – 2015.

70 f. : il.

Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 60-70.

1. Infarto do miocárdio - Ratos. 2. Isoproterenol - Utilização. 3. Própolis Vermelha – Efeito cardioprotetor. I. Título.

CDU: 615.221

JOSÉ CLEMENTINO NETO

**Investigação do efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados por modelo simpatomimético**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

**Aprovado em: 18/03/2015**

**BANCA EXAMINADORA**



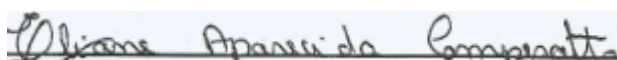
**Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro - UFAL**

**Orientadora**



**Profa. Dra. Maria Aline Fidelis Barros de Moura - UFAL**

**Examinadora**



**Profa. Dra. Eliane Aparecida Camposatto - UFAL**

**Examinadora**

*Dedico este trabalho:*

À minha mãe, Marilene Siqueira de Miranda, ao meu irmão, Rodrigo Miranda Clementino, e à minha namorada Luana Rodrigues da Silva, por tudo que eles representam, por serem pessoas maravilhosas, e por sempre terem me apoiado e acreditado em mim.

Ao meu pai, José Clementino Filho (*in memoria*), por ter sido o maior responsável por essa vitória, o meu principal incentivador e minha principal fonte de caráter, honestidade, humildade, bondade e força de vontade.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todos os momentos bons que me proporcionou.

À minha orientadora, profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, por todos os ensinamentos passados a mim, pela atenção, respeito e paciência prestada.

Ao prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, da UFAL, pelo fornecimento do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, objeto deste estudo.

Ao mestrando José Marcos de Oliveira, pelo compartilhamento de informações referentes ao extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.

A todos os docentes vinculados ao programa de pós graduação em ciências farmacêuticas (PPGCF) da UFAL, por contribuírem para a solidificação e desenvolvimento dos meus conhecimentos.

A todos os alunos que fazem parte do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFC) da UFAL, onde este estudo foi desenvolvido.

À segunda turma de mestrado do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas (PPGCF) da UFAL, por todos os momentos compartilhados.

Aos meus avós maternos, Maria Siqueira de Miranda e João Batista de Miranda, por todo carinho e amor ofertado durante todos estes anos.

À minha mãe, Marilene Siqueira de Miranda, por todo amor, carinho e apoio fornecido.

Aos meus tios João Maria Clementino, Marcos Antônio Clementino, Márcia Cerqueira Clementino, João Batista Rodrigues e Weidila Siqueira de Miranda, por todo apoio, atenção e solidariedade oferecidas.

Ao meu irmão, Rodrigo Miranda Clementino, por todos os momentos divertidos e construtivos que passamos juntos.

À minha namorada, Luana Rodrigues Da Silva, por todo companheirismo, amizade e dedicação prestados.

À FAPEAL e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

**José Clementino Neto**

## RESUMO

A própolis é uma substância natural resinosa produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, por meio de diversas fontes vegetais e de variadas partes das plantas. Sua composição química é complexa e diversificada. A própolis vermelha é um tipo de própolis oriunda dos manguezais do nordeste brasileiro. Algumas atividades biológicas são associadas à própolis vermelha, dentre elas, atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. O presente estudo foi realizado para avaliar o efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de alagoas (EHAPV) em ratos induzidos ao infarto com isoproterenol. Para a caracterização química do EHAPV foi realizado a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultra-violeta (CLAE-UV). Ratos Wistar machos (200-300 g) foram divididos em 5 grupos (Controle=0,3 mL de salina v.o. durante 30 dias) (ISO= infartados com isoproterenol 85 mg/kg s.c. por 2 dias consecutivos) (EHAPV 50, 75 e 150 mg/kg, respectivamente, por via oral durante 30 dias e submetidos ao infarto com isoproterenol 85 mg/kg s.c. nos 29º e 30º dias de tratamento). No 31º dia os animais foram eutanasiados, os soros foram coletados e incubados em Kits bioquímicos para avaliação de biomarcadores de danos teciduais como creatino-quinase fração total (CK-NAC) e fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), colesterol total (COL) e triglicérides (TRI). Para as análises morfológicas, foram medidos o peso cardíaco, as espessuras ventriculares esquerda e direita, suas variações e aumentos relativos, e a razão entre o peso cardíaco e peso corpóreo (Pcard, EVE, EVD, Pcard/Pcorp). Para as análises *post mortem* os corações foram seccionados e submetidos ao teste colorimétrico de cloreto de trifeniltetrazólio 1% (TTC 1%). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  e.p.m. e analisados estatisticamente por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-keuls. Considerados significantes quando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. controle; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$ , +++ $p < 0,001$  vs. ISO; • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  vs. EHAPV 50 mg/kg + ISO. 14 substâncias diferentes foram identificadas no EHAPV, dentre elas, alguns flavonoides e ácidos fenólicos. EVE (G1=  $3,8 \pm 0,4$ ; G2=  $4,9 \pm 0,1^{***}$ ; G3=  $4,6 \pm 0,2^{***}$ ; G4=  $3,8 \pm 0,2^{***/+}$ ; G5=  $3,8 \pm 0,2^{***/+}$  mm), Pcard/Pcorp ( $4,20 \pm 0,12$ ;  $5,43 \pm 0,10^{***}$ ;  $4,71 \pm 0,20^{+++}$ ;  $4,77 \pm 0,20^{+++}$ ;  $4,78 \pm 0,20^{+++}$ ), CK-NAC ( $471,2 \pm 31,2$ ;  $1035 \pm 134,7^{***}$ ;  $697,7 \pm 47,6^{++}$ ;  $578,7 \pm 57,14^{+++}$ ;  $397,9 \pm 34,58^{+++/+}$  U/L), CK-MB ( $414,4 \pm 18,5$ ;  $740,8 \pm 77,3^{***}$ ;  $505,6 \pm 43,5^{+++}$ ;  $496,0 \pm 32,9^{++}$ ;  $376,8 \pm 6,3^{+++}$  U/L). Os resultados indicam que o EHAPV foi capaz de prevenir a hipertrofia concêntrica cardíaca, observado pela diminuição da EVE e do Pcard/Pcorp. Na análise bioquímica observou-se uma redução das atividades de CK-NAC e CK-MB após o tratamento com o EHAPV, nas três doses. Não houve diferença significativa nos níveis de LDH, COL e TRI nas três doses do EHAPV, quando comparadas ao controle. O teste colorimétrico revelou que não houve formação de áreas necróticas nos corações dos grupos tratados com o EHAPV, nas três doses. Estes resultados sugerem que o tratamento com o EHAPV foi capaz de promover uma atividade cardioprotetora frente ao infarto agudo do miocárdio.

Palavras-chaves: Infarto do miocárdio. Ratos. Isoproterenol. Própolis vermelha.



## ABSTRACT

Propolis is a natural resinous substance produced by bees of species *Apis mellifera*, through a variety of plant sources and various parts of the plants. Its chemical composition is complex and diverse. The red propolis is a type of propolis found in the mangroves of Brazilian northeastern. Some biological activities are associated with red propolis, among them, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. The present study was designed to evaluate the cardioprotective effect of hydroalcoholic extract of red propolis from Alagoas (HAERP) against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. For chemical characterization of HAERP was performed high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector (HPLC-UV). Male Wistar rats (200-300g) were divided into 5 groups (n = 5), (Control = 0.3 mL Saline p.o. for 30 days), (ISO = infarction by isoproterenol 85 mg/kg s.c. on 2 consecutive days), (HAERP 50, 75 and 150 mg/kg, respectively, orally for 30 days and underwent infarction with isoproterenol 85mg/kg s.c. in 29 and 30 days of treatment). On the 31st day the animals were euthanized, serum was collected and incubated in biochemical kits for the evaluation of creatine kinase total fraction (CK-NAC) and MB fraction (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), cholesterol total (COL) and triglycerides (TRI) markers of tissue damage. For morphometric analysis, were measured the weight cardiac, the thickness ventricular of left and right, its variations and relative increases, and reason cardiac weight by body weight (WC, TLV, TRV and WC/WB). For *postmortem* analysis the hearts were sectioned yet submitted to colorimetric test of triphenyltetrazolium chloride 1% (TTC1%). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM, and analyzed statistically by ANOVA one-way followed by Newman-keuls. Considered significant when \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. control; +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 vs. ISO; •p<0,05, ••p<0,01, •••p<0,001 vs. HAERP 50 mg/kg + ISO. 14 different substances were identified in HAERP, among them, some flavonoids and phenolic acids. TLV (G1= 3.8  $\pm$  0.4; G2= 4,9  $\pm$  0,1\*\*\*; G3= 4,6  $\pm$  0,2\*\*\*; G4= 3,8  $\pm$  0,2\*\*\*/+++; G5= 3,8  $\pm$  0,2\*\*\*/+++ mm), WC/WB (4,20  $\pm$  0,12; 5,43  $\pm$  0,10\*\*\*; 4,71  $\pm$  0,20+++; 4,77  $\pm$  0,20+++; 4,78  $\pm$  0,20+++), CK-NAC (471,2  $\pm$  31,2; 1035  $\pm$  134,7\*\*\*; 697,7  $\pm$  47,6++; 578,7  $\pm$  57,14+++ ; 397,9  $\pm$  34,58+++ U/L), CK-MB (414,4  $\pm$  18,5; 740,8  $\pm$  77,3\*\*\*; 505,6  $\pm$  43,5+++; 496,0  $\pm$  32,9++; 376,8  $\pm$  6,3+++ U/L). The results indicate that the treatment with HAERP was able to prevent hypertrophy concentric cardiac, it is observed that there is a decrease in TLV and WC/WB. In the biochemical analysis observed a reduction in counting enzyme CK-NAC and CK-MB fraction after treatment with HAERP in three doses. There was no significant change in LDH, COL and TRI counting, in three doses, when compared to control. The colorimetric test revealed there wasn't development necrotic areas in the heart. The results indicate that treatment with HAERP was able to promote protective activity in myocardial infarction.

KEYWORDS: Myocardial infarction. Rats. Isoproterenol. Red propolis.

“Os dois dias mais importantes da sua vida são: o dia em que você nasceu e o dia em que você descobre o porquê”

(Mark Twain)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Estrutura química do isoproterenol .....	28
<b>Figura 2-</b> Esquema representativo do delineamento experimental .....	34
<b>Figura 3-</b> Cromatograma do EHAPV na concentração de 1000 µg/mL .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Análise morfométrica (**A:** Pcard; **B:** Pcard/Pcorp; **C:** ARPcard) dos corações de ratos submetidos ao infarto ..... 41
- Gráfico 2-** Análise morfométrica (**A:** EVD **B:** EVE; **C:**  $\Delta$ EVD; **D:**  $\Delta$ EVE; **E:** AREVE; **F:** AREVD) dos corações de ratos submetidos ao infarto ..... 43
- Gráfico 3-** Análise enzimática das creatino-fosfoquinases (**A:** creatino-quinase total (CK-NAC), **B:** creatino-quinase fração MB (CK-MB)) de ratos submetidos ao infarto..44
- Gráfico 4;** Análise enzimática (**A:** aspartato amino transferase (AST), **B:** alanina amino transferase (ALT), **C:** lactato desidrogenase (LDH), **D:** colesterol total, **E:** triglicérides) de ratos submetidos ao infarto ..... 46

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ALT	Alanina amino transferase
AMPC	3'-5' adenosina monofosfato cíclico
AREVD	Aumento relativo da espessura ventricular direita
AREVE	Aumento relativo da espessura ventricular esquerda
ARPCard	Aumento relativo do peso cardíaco
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CAC	Calcificação arterial coronariana
CEUA	Comitê de ética em uso de animais
CK-MB	Creatino-quinase fração MB
CK-NAC	Creatino-quinase fração total
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COL	Colesterol total
COX	Ciclooxigenase
EHAPV	Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EVD	Espessura ventricular direita
EVE	Espessura ventricular esquerda
Gs	Proteína G estimulatória
G-6-PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ISO	Isoproterenol
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipooxigenase
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase
Pcard	Peso médio dos corações
Pcard/Pcorp	Razão entre peso cardíaco e peso corpóreo
PCR	Proteína C-reativa
PKa	Proteína cinase a
REDOX	Redução-oxidação
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento celular beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPF	1,3,5- trifeniformazan
TRI	Triglicérides
TTC 1%	Cloreto de trifeniltetrazólio a 1%
UV	Ultra- violeta
$\Delta$ EVD	Varição da espessura ventricular direita
$\Delta$ EVE	Varição da espessura ventricular esquerda
6-PG	6-fosfogluconato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações sobre o infarto agudo do miocárdio .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Produtos naturais com atividade cardioprotetora e a própolis vermelha.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Cardiomiopatia induzida pelo isoproterenol .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERAIS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Própolis vermelha .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Substâncias .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Aparelhagem .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção do EHAPV .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização química do EHAPV por meio de CLAE-UV .....</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Preparo da solução do EHAPV .....</b>	<b>33</b>
<b>5.4</b>	<b>Indução do infarto agudo do miocárdio .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>34</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação do efeito do EHAPV nos parâmetros morfométricos de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>35</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Peso médio dos corações (Pcard), aumento relativo do peso cardíaco (ARPCard) e razão entre peso cardíaco e peso corpóreo (Pcard/Pcorp) .....</b>	<b>35</b>

5.6.2 Espessuras ventriculares .....	35
<b>5.7 Avaliação do efeito do EHAPV nos parâmetros bioquímicos de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>35</b>
5.7.1 Creatino-quinase total (CK-NAC) e Creatino-quinase fração MB (CK-MB) .....	36
5.7.2 Lactato Desidrogenase (LDH) .....	36
5.7.3 Aspartato Amino Transferase (AST) .....	36
5.7.4 Alanina Amino Transferase (ALT) .....	36
5.7.5 Colesterol total .....	37
5.7.6 Triglicérides .....	37
<b>5.8 Avaliação do efeito do EHAPV sobre os parâmetros macroscópicos no músculo estriado cardíaco de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>37</b>
<b>5.9 Peso médio corporal dos ratos .....</b>	<b>38</b>
<b>5.10 Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 Caracterização química do EHAPV por meio de CLAE-UV .....</b>	<b>39</b>
<b>6.2 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros morfométricos de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>40</b>
6.2.1 Medidas do Pcard, ARPcard e Pcard/Pcorp .....	40
6.2.2 Determinação das EVD, EVE, $\Delta$ EVD, $\Delta$ EVE, AREVD e AREVE .....	42
<b>6.3 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros bioquímicos de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>44</b>
6.3.1 Níveis plasmáticos de CK-NAC e CK-MB .....	44
6.3.2 Níveis plasmáticos de AST, ALT, LDH, COL e TRI .....	45
<b>6.4 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros macroscópicos no músculo estriado cardíaco de ratos submetidos ao infarto .....</b>	<b>47</b>
<b>6.5 Peso médio corporal .....</b>	<b>48</b>



<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, incluindo o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), apresentam elevada morbimortalidade, e acometem pessoas de ambos os sexos em todo o mundo (PATTEL et al., 2010). O IAM pode ser definido como uma doença que leva a uma série de alterações cardíacas, em decorrência de um estado de isquemia prolongada, o que dificulta o suplemento de oxigênio ao miocárdio, resultando em mudanças no sistema cardiovascular (THYGESEN et al., 2012).

O diagnóstico do IAM se baseia na identificação dessas alterações, como por exemplo, as mudanças observáveis no âmbito clínico, compreendendo alterações eletrocardiográficas, e no âmbito laboratorial, como a elevação de alguns parâmetros hemodinâmicos e bioquímicos. O tratamento farmacológico a longo prazo é caracterizado pelo uso de algumas classes de fármacos, dentre elas, antiplaquetários,  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, entre outras, com o objetivo de evitar possíveis reincidências (SBC, 2014).

Vários modelos experimentais, que reproduzem o IAM em animais, vêm sendo utilizados para se tentar descobrir novos fármacos com potencial cardioprotetor. Um destes modelos é o de indução do infarto por uma droga simpatomimética, o isoproterenol. Esta, é uma catecolamina sintética, que em altas doses, promove alterações hemodinâmicas, morfológicas, bioquímicas, eletrolíticas e histológicas nos animais, mimetizando as características fisiopatológicas do infarto. Além disso, este modelo detém de boas especificidade e reprodutibilidade, de baixo custo e fácil execução, tornando-se uma excelente ferramenta farmacológica para se investigar uma possível atividade cardioprotetora de produtos naturais (RAHMATHULLA; DEVI, 2013).

Estudos recentes mostram que produtos naturais constituídos quimicamente por flavonoides e ácidos fenólicos, e que apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória, conseguem promover este efeito cardioprotetor através de alguns mecanismos, dentre eles, por restauração dos níveis séricos de biomarcadores enzimáticos do IAM (PATEL, 2012), diminuição do estado hipertrófico característico do IAM (SINGH et al., 2011) e inibição da formação de áreas necróticas no coração (MOHAN et al., 2010).

A própolis vermelha é uma substância natural resinosa produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* por meio do exsudato do caule da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae). Se caracteriza por ser um novo tipo de própolis brasileira, encontrada nos manguezais do nordeste do país. Esta substância apresenta uma composição química diversificada e rica em flavonoides e ácidos fenólicos, dentre outros (SILVA, 2008).

Alguns estudos associam a própolis vermelha a variadas atividades biológicas, como por exemplo, atividade citotóxica para células tumorais (ALENCAR et al., 2007), anti-inflamatória, por prevenir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (BUENO-SILVA et al., 2013), bactericida para *staphylococcus aureus* e antioxidante (CABRAL et al., 2009).

Com base na composição química e nas atividades biológicas associadas à própolis vermelha, decidiu-se avaliar um possível efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos infartados com o modelo de indução por uma droga simpatomimética, o isoproterenol.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações sobre o infarto agudo do miocárdio

O IAM pode ser conceituado como um estado de necrose do miocárdio em decorrência de um processo de isquemia prolongada (Li et al., 2012). Geralmente essa isquemia é ocasionada por trombose e/ou vasoespasmos decorrentes da presença de uma placa aterosclerótica, que impede o suprimento metabólico ao coração (DAVIES, 2000). Desta forma, passa a existir um desequilíbrio entre as concentrações de oxigênio ofertada e demandada ao miocárdio, levando então ao quadro de infarto (SBC, 2009).

Em consequência ao processo de isquemia, ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que sobrecarrega as defesas antioxidantes endógenas, acarretando em um desbalanço REDOX intracelular. As principais ERO, dentre elas, os radicais livres superóxido e hidroxila, e os não radicais, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, passam a atuar como eletrófilos, atacando os principais componentes celulares incluindo proteínas, carboidratos, fosfolipídios de membrana e DNA, desencadeando uma sinalização pró-inflamatória (QIN; YAP; WOODMAN, 2009).

O sistema imune estimula a sinalização de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1 e 6 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), resultando no aumento da migração de células leucocitárias, dentre elas, neutrófilos, monócitos e macrófagos. A ação local destas células apresenta como consequência o surgimento de muco, aumento da secreção inflamatória e edema cardíaco, contribuindo para o quadro característico de infarto (NAHRENDORF; PITTET; SWIRSKI, 2010).

São variados os fatores de risco para o IAM, e eles podem ser divididos em três grandes categorias gerais: fatores de risco não modificáveis como idade, sexo e histórico familiar; fatores de risco modificáveis como tabagismo, consumo de álcool, inatividade física, má alimentação, hipertensão, diabetes, dislipidemia e síndrome metabólica; e fatores de risco emergentes, dentre eles, proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio, calcificação arterial coronariana (CAC), homocisteína, lipoproteína de baixa densidade (LDL). A intervenção direta sobre os fatores de risco modificáveis torna-se de fundamental importância no âmbito da prevenção primária e combate ao IAM. Alimentação saudável, prática de exercício regular, término do hábito de fumar,

e uma redução na ingestão de álcool, constituem algumas das medidas a serem realizadas e que têm reflexo direto sobre o estilo de vida do indivíduo. Também são recomendados os medicamentos destinados ao tratamento da hipertensão e da hipercolesterolemia (BOATENG; SANBORN, 2013).

Considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, o IAM, caracterizado períodos atrás por ser uma doença predominantemente vista em países desenvolvidos, se torna cada vez mais comum em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas sofrem pelo menos um episódio de IAM por ano (BASSAND et al., 2007). No Brasil, o IAM é responsável por cerca de 60 mil óbitos por ano, sendo considerado a principal causa isolada de morte no país. Não se conhece o número de infartos que ocorre anualmente no país, entretanto, estima-se em torno de 300 a 400 mil casos anuais, ou seja, a cada 5 a 7 casos ocorre um óbito (SBC, 2004).

Os pacientes com IAM apresentam geralmente um sintoma específico, uma dor no peito, profunda e visceral, caracterizada por compressão. Este sintoma é decorrente de uma via reflexa neural, com envolvimento dos nervos torácicos e cervicais. Inicialmente local, esta dor pode migrar para outras regiões como a região epigástrica, ombros, braços, região interescapular, mandíbula e pescoço. Um forte preditor de IAM é a migração desta dor para ambos os braços. Cerca de 20% dos pacientes (diabéticos, idosos, pós-operatório ou mulheres) não apresentam essa dor característica. Nesses pacientes podem ser observados apenas sintomas atípicos, como palidez, mal estar e taquicardia, dificultando o diagnóstico (FUSTER et al., 2009).

O quadro clínico, a elevação dos marcadores bioquímicos de necrose e as alterações eletrocardiográficas constituem o diagnóstico do IAM. Tendo em vista a variabilidade dos sintomas e o fato de que a elevação dos biomarcadores se inicia cerca de seis horas após o surgimento da dor, um instrumento importante para o diagnóstico e determinação da conduta é o eletrocardiograma. Pacientes com histórico sugestivo, sintomas característicos e que apresentam alteração no segmento ST do eletrocardiograma são candidatos a serem submetidos a uma imediata reperfusão (PESARO; SERRANO; NICOLAU, 2004).

De acordo com o tempo de evolução, o miocárdio passa a sofrer progressiva agressão representada pelas áreas de isquemia, lesão e necrose, sucessivamente. Distúrbios eletrolíticos, alterações morfológicas reversíveis e danos definitivos caracterizam respectivamente estas etapas. As mais variadas apresentações clínicas, que variam desde mal estar e palidez a infarto com ou sem supradesnível do segmento ST, se correlacionam com a especificidade de cada uma destas etapas. Portanto, o manejo adequado do IAM compreende um rápido diagnóstico, a desobstrução imediata da coronária obstruída, manutenção do fluxo obtido, profilaxia da embolização distal e reversão de possíveis arritmias, distúrbios mecânicos e falência cardíaca (BRAUNWALD; ZIPES; LIBBY, 2001).

Algumas enzimas citosólicas, dentre elas, troponina I, creatino-quinase frações total e MB (CK-NAC e CKA-MB), lactato desidrogenase (LDH), aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) servem como parâmetros bioquímicos sensíveis para avaliar a gravidade do IAM. O aumento das atividades destas enzimas marcadoras no soro é indicativo de dano celular e perda da integridade funcional e permeabilidade da membrana celular (SABEENA et al., 2004).

A intensidade das atividades da AST e ALT séricas começam a elevar 3 a 8 horas após o início da lesão do miocárdio com níveis de pico, em média, em 24 horas, retornando aos níveis normais em 3 a 6 dias. A LDH tem sua atividade aumentada no soro em um período de 6 a 12 horas após o início do infarto, e atinge um pico máximo em cerca de 48 horas, onde permanece elevada por 4 a 14 dias antes de voltar à normalidade. A troponina I aparece no sangue 3 a 4 horas após o episódio agudo e permanece elevada durante o mesmo período de tempo do LDH (NIGAN, 2007).

Já os níveis séricos de CK-MB fornecem informações úteis sobre a extensão e tempo de lesão do miocárdio, começando a aumentar entre 3 a 5 horas após o início do infarto, atingindo um pico máximo em um tempo de 16 a 20 horas, e permanecendo no platô durante cerca de 30 horas. A elevação dos níveis séricos de CK-NAC ocorre no mesmo período de tempo da de CK-MB, entretanto permanece no platô por um período maior, de 72 horas (MOTTA, 2011).

Dentre as principais alterações morfológicas cardíacas decorrentes do infarto, destaca-se a hipertrofia dos cardiomiócitos, que se caracteriza por ser uma resposta

celular a um aumento na tensão biomecânica. A hipertrofia cardíaca, eventualmente, normaliza o aumento da tensão da parede, respondendo desta forma ao estímulo inicial (VAKILI; OKIN; DEVEREUX, 2001). O padrão de hipertrofia que acomete o coração em resposta ao infarto é o do tipo concêntrico, caracterizado por um aumento na relação entre a espessura da parede ventricular e o raio do ventrículo esquerdo, com manutenção ou diminuição do diâmetro diastólico final (JUNIOR; FRACHINNI, 2001). Embora a hipertrofia seja uma resposta adaptativa à sinalização fisiopatológica necessária para se manter o débito cardíaco, a hipertrofia prolongada, por sua vez, está associada a um aumento significativo no risco de morte súbita ou progressão da insuficiência cardíaca, independentemente dos níveis pressóricos e de outros fatores de risco (MATHEW et al., 2001).

As medidas a serem adotadas no tratamento inicial do IAM consistem no alívio da dor, na identificação imediata de alterações no segmento ST via eletrocardiograma, no início da reperfusão, na avaliação e no tratamento de anormalidades hemodinâmicas (ANTMAN et al., 2008). O tratamento sequencial à intervenção inicial ao IAM pode ser separado em duas vias, dependendo ou não se o paciente apresenta uma elevação do segmento ST. Para os pacientes que apresentam variação neste segmento, com sintomas por até 12 horas, a terapia de reperfusão surge como a alternativa adequada. É importante classificar os pacientes de acordo com o risco de novas doenças coronarianas após o IAM, e tomar medidas para evitá-las. Nos pacientes que apresentam alto risco, as intervenções coronárias devem ser consideradas. Oxigênio, nitroglicerina e sulfato de morfina são comumente utilizados para obtenção do alívio da dor, durante o tratamento inicial (WRIGHT et al., 2011).

Para o tratamento farmacológico a longo prazo, destaca-se a utilização de antiagregantes plaquetários (ácido acetilsalicílico) e derivados tienopiridínicos (clopidogrel) com a finalidade de se combater o processo de agregação plaquetária, de  $\beta$ -bloqueadores (metoprolol) para o controle das taquiarritmias e hipertensão, bloqueadores do sistema renina-angiotensina (captopril) e bloqueadores de canais de cálcio (verapamil) para evitar o remodelamento cardíaco e hipertensão, respectivamente, além de agentes hipolipemiantes. Essas classes de fármacos se mostram eficazes em evitar possíveis reincidências do IAM (SBC, 2014).

O tratamento de pacientes com IAM tem evoluído significativamente nas duas últimas décadas, através do surgimento de novas opções terapêuticas. Dentre as

novidades destacam-se as estratégias de genes modulando favoravelmente a inflamação, remodelamento cardíaco, estresse oxidativo e angiogênese, testadas em estudos com animais e que podem resultar em uma evolução ainda maior no quadro atual de tratamento ideal para os pacientes. Nesse contexto, surge a inovadora terapia com células tronco, em que células provenientes da medula óssea induzem a miogênese e angiogênese, levando à regeneração do miocárdio infartado. Esta terapia, desenvolvida em modelos pré-clínicos, se mostra promissora para modificar os quadros de tratamentos atuais para o IAM (WHITE; CHEW, 2008).

## **2.2 Produtos naturais com atividade cardioprotetora e a própolis vermelha**

Os produtos naturais têm demonstrado grande importância no desenvolvimento de novos fármacos. Estima-se que cerca de 64% de todos os medicamentos tenham algum produto natural em sua composição, incluindo produtos naturais não modificados e substâncias sintetizadas com base em produtos naturais. A diversidade química dos metabólitos secundários é uma das razões para o contínuo interesse científico nestes produtos (VALLI et al., 2013).

As plantas medicinais constituem uma importante fonte de produtos naturais ativos, que diferem muito em termos de estrutura e propriedades biológicas e, desta forma, desempenham um papel importante no desenvolvimento de uma variedade de doenças humanas, incluindo doenças cardiovasculares, como o IAM (LI et al., 2014). Nesse contexto, são vários os produtos naturais que têm sido estudados e relacionados a um possível efeito cardioprotetor.

A espécie *Amaranthus viridis* Linn (Amaranthaceae), composta quimicamente por flavonoides, terpenoides e compostos fenólicos, por exemplo, induz o efeito cardioprotetor em decorrência de um aumento dos antioxidantes endógenos e inibição da peroxidação lipídica da membrana (SARAVANAN et al., 2013). Estudo realizado por AHMED E UROOJ (2012) mostra um efeito cardioprotetor do extrato acetônico da casca do caule da espécie *Ficus racemosa* Linn (Moraceae), rica em compostos polifenólicos, através da diminuição dos níveis plasmáticos de CK-MB, LDH, AST e ALT.

Foi observado que o extrato etanólico das partes aéreas de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), constituído de flavonoides e compostos fenólicos, apresenta efeito cardioprotetor, por promover supressão da elevação do seguimento ST do



eletrocardiograma, diminuir as áreas de necrose e fibroses do miocárdio, evitar uma redução drástica da contratilidade ventricular esquerda e aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, característica do infarto, além de suprimir o aumento dos níveis de malondialdeído, na atividade antioxidante (FATHIAZAD et al., 2012).

O extrato hidroalcoólico das sementes da espécie *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae), composta quimicamente por compostos polifenólicos (ácido ferúlico e ácido cafeico) e flavonoides (quercetina, isoquercetina e rutina), detém de efeito cardioprotetor, uma vez que, aumenta os níveis de antioxidantes endógenos e ATPases no tecido cardíaco, além de evitar aumento dos níveis de lipídios e de marcadores de dano cardíaco, encontrados no plasma (PATEL, 2012). Estudo realizado por SINGH et al., (2011), relaciona o extrato hidroalcoólico das raízes da espécie *Acorus calamus* Linn (Araceae), composta por terpenos, fenilpropanoides e flavonoides, com um potencial efeito protetor cardiovascular. Este efeito é alcançado em virtude de diminuições na relação peso do coração/peso corpóreo, da calcineurina, no conteúdo de óxido nítrico e nos níveis de LDH, e aumento da glutathiona peroxidase.

PRINCE (2013), demonstra em seu estudo uma atividade cardioprotetora para epicatequina, um flavonoide bastante encontrado em alguns alimentos. O possível mecanismo para este efeito consiste na eliminação de radicais livres, acarretando desta forma, em uma diminuição dos níveis de cálcio, aumento das enzimas antioxidantes, da cadeia respiratória, da glutathiona reduzida e adenosina trifosfato. TWARI et al., (2009), realizaram um estudo que avaliou uma potencial atividade cardioprotetora da miricetina, um flavonoide presente na espécie *Vitis vinífera* Linn (Vitaceae), e puderam observar a presença de tal efeito em decorrência da diminuição da frequência cardíaca e dos níveis plasmáticos de CK-MB, LDH e AST, além da inibição das alterações de reatividade vascular e dos padrões do eletrocardiograma.

De acordo com PRINCE E SATHYA (2012), a quercetina, um flavonoide encontrado em uma série de alimentos como, chá, vinho, frutas, legumes e ervas, possui atividade cardioprotetora. O pré-tratamento com a quercetina promoveu uma diminuição nos níveis séricos de CK-MB e LDH, e também nos produtos de peroxidação lipídica, além de aumentar os níveis de antioxidantes endógenos e restaurar a cadeia respiratória para próximo do normal, em ratos wistar. MADHESH E VAIYAPURI (2013), ao realizarem um estudo com o flavonoide luteolina, observaram

que o objeto do estudo apresenta efeito cardioprotetor por promover diminuição da peroxidação lipídica e dos níveis séricos dos biomarcadores enzimáticos do IAM.

Além de vários flavonoides apresentarem atividade cardioprotetora, alguns ácidos fenólicos também detêm deste efeito. O ácido p-cumárico, por exemplo, promove a proteção do coração por inibição do estresse oxidativo (PRINCE; ROY, 2013). O ácido cafeico apresenta efeito cardioprotetor por promover diminuição dos influxos de íons cálcio e sódio na célula cardíaca, sendo a base de sua ação antiarrítmica (CHANG et al., 2013). YOGEEETA et al., (2006), mostram uma interação sinérgica entre ácido ferúlico e ácido ascórbico, ao diminuir a peroxidação lipídica e aumentar antioxidantes endógenos, promovendo efeito cardioprotetor em ratos.

A própolis é uma substância natural resinosa produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera*, por meio de diversas fontes vegetais e de variadas partes das plantas, como por exemplo, broto, botões florais e exsudatos resinosos. Ela é usada na colmeia para selar buracos, suavizar as paredes internas, e proteger a entrada contra eventuais predadores (BANKOVA, 2005). Em geral, a própolis é constituída de cera de abelha, resina (frequentemente contendo compostos voláteis e fenólicos) e outros componentes menores, como açúcares, aminoácidos e pólen. A resina é derivada do material vegetal que as abelhas coletam a partir das plantas, sendo responsável por sua atividade biológica. Sua composição química é, portanto, dependente da vegetação que se localiza nas regiões que circundam as colmeias (SALATINO et al., 2005).

A utilização da própolis em muitos países, como fonte de alimento e na medicina popular, tem aumentado nas últimas décadas. Sua composição variada e rica em compostos biologicamente ativos tem sido reportada a ensaios de atividades antibacteriana (LUSTOSA et al., 2008), antifúngica (YANG et al., 2011), anti-inflamatória (NAITO et al., 2007), antitumoral (DIAZ-CARBALLO et al., 2008), antioxidante e antiviral (ALVES, 2006).

No Brasil são encontrados 13 grupos de própolis, classificados de acordo com sua origem geográfica, composição química e origem vegetal. Os grupos 1 a 5 são encontrados na região sul, mais precisamente nos estados do Rio Grande do Sul (1 e 2) e Paraná (3, 4 e 5), e têm colorações amarela, castanha clara, castanha escura e castanha esverdeada, respectivamente. Os grupos 6 a 11 podem ser encontrados na

região nordeste, nos estados da Bahia (6 e 7), Pernambuco (8 e 9), Ceará (10) e Piauí (11), e se caracterizam por coloração marrom (6 e 7), castanha (8) e amarela (9, 10, 11). O grupo 12 é proveniente de São Paulo, sudeste do país, e pode apresentar coloração verde ou marrom esverdeada. O 13º grupo se faz presente nos manguezais do nordeste brasileiro e apresenta coloração vermelha (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

A própolis verde (grupo 12) se caracteriza por ter uma composição química rica em alquenos, álcoois, ésteres, terpenos, ácidos benzóicos, aldeídos e cetonas (NUNES; GURREIRO, 2011). A própolis marrom (Grupos 6 e 7) é constituída por benzofenonas, ácidos gordos e alguns terpenoides (CASTRO et al., 2009). As própolis de coloração castanha proveniente do paraná (grupos 3, 4 e 5) detém de compostos fenólicos, fenilpropanoides e flavonas. As própolis amarelas (grupos 9, 10 e 11) e marrom (grupo 8) se caracterizam por apresentarem em sua composição compostos fenólicos e grande concentração de ácido caféico (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). As própolis dos grupos 1 e 2 tem constituições químicas com altos níveis de monoterpenos (SIMIONATTO et al., 2012).

A própolis vermelha, provém do exsudato do caule da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae) (SILVA, 2008). Sua coloração vermelha se deve a presença de dois pigmentos: retusapurpurinas A e B (PICCINELLI et al., 2011). Foi classificada por PARK et al., (2002), como sendo pertencente do 13º grupo de própolis (um novo grupo de própolis oriundo dos manguezais do nordeste brasileiro), possuindo compostos bioativos nunca antes encontrados em outros tipos de própolis já estudados (ALENCAR et al., 2007). Flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonois, flavanois, isoflavonoides e chalconas) e ácidos fenólicos caracterizam sua composição química (FROZZA et al., 2013), e algumas destas substâncias são responsáveis por certas atividades biológicas (OLDONI, 2011).

Alguns estudos vêm sendo realizados associando a própolis vermelha a uma série de atividades biológicas. Estudo desenvolvido por CABRAL et al., (2009), por exemplo, concluiu que o extrato etanólico de própolis vermelha possui alta atividade antioxidante e bactericida para *Staphylococcus aureus*. Outro estudo, desenvolvido por ALENCAR et al., (2007), mostra que a própolis vermelha apresentou atividade citotóxica para células tumorais. BUENO-SILVA et al., (2013), demonstraram que o

extrato etanólico de própolis vermelha apresentou efeito anti-inflamatório, por prevenir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

A própolis vermelha é caracterizada por ser quimicamente rica em alguns compostos, dentre eles, flavonoides, e estes contribuem diretamente para as suas atividades biológicas (WILLIAMS et al., 2004). São diversos os estudos que demonstram as atividades biológicas de flavonoides, dentre eles, atividade antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2005), antiparasitária (DA SILVA et al., 2008), cardioprotetora (GELEIJNSE; HOLLMAN, 2008), hipoglicemiante (CAZAROLLI, 2008), entre outras.

Os flavonoides interagem com espécies radicalares, originando radicais mais estáveis e menos reativos (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002). A diminuição da quantidade de radicais livres circulantes na corrente sanguínea permite uma prevenção à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), atribuindo aos flavonoides efeitos protetores sobre as doenças coronarianas. Um outro fator importante é a capacidade de anti-agregação plaquetária devido à inibição da cascata de ativação da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase (LOX), o que diminui o processo inflamatório do vaso e a agregação plaquetária (YAO et al., 2004).

### **2.3 Cardiomiopatia induzida por isoproterenol**

A homeostasia, estado de equilíbrio dinâmico do organismo, é mantida pela ação do sistema nervoso autônomo (SNA), por meio dos sistemas nervosos simpático e parassimpático (FLORAS, 2009). Estes, atuam sobre o sistema cardiovascular, através de neurotransmissores, que quando liberados no coração modificam o débito cardíaco, alterando a frequência cardíaca e a força de contração das fibras miocárdicas de forma antagônica e equilibrada (MANCIA; GRASSI, 2014). Entretanto, a ativação inadequada e excessiva de um desses sistemas, o simpático, tem sido retratada como uma das principais causas das doenças cardíacas. A hiperestimulação simpática acarreta em uma maior ativação de canais de cálcio e inativação dos canais de potássio, originando remodelamento cardíaco, hipertrofia adaptativa do miocárdio, arritmias ventriculares, fibrilação atrial, isquemia e IAM (TRIPOSKIADES et al., 2009).

Os mediadores do sistema nervoso simpático são as catecolaminas, substâncias simpaticomiméticas constituídas por um grupo catecol (diidroxibenzeno

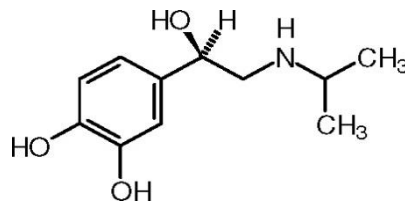
em posição orto) e um grupo amina. As principais catecolaminas endógenas são a adrenalina, noradrenalina e dopamina. A primeira está diretamente relacionada a um estado de excitação, alerta, enquanto que as outras duas desempenham uma ação fundamental, a nível fisiológico, na condução e efetivação de estímulos nervosos. Diante disso, vários fármacos passaram a ser produzidos a partir destas catecolaminas, como por exemplo, o isoproterenol, a terbutalina e a dobutamina (PEASTON; WEINKOVE, 2004).

Há um longo período de tempo, vem sendo estudada e analisada a cardiotoxicidade das catecolaminas. Os primeiros relatos científicos datam do início do século XX para a adrenalina (ZIEGLER, 1905; PEARCE, 1906), e da segunda metade do mesmo século para a noradrenalina (SZAKACS; CANNON, 1958) e isoproterenol (RONA et al., 1959). Alguns fatores como Hipertrofia cardíaca, necrose do miocárdio, elevação de parâmetros bioquímicos, alterações eletrolíticas e membranares, contribuem para alguns destes efeitos tóxicos, caracterizando o que nos dias atuais se denomina de "cardiomiopatia induzida por catecolaminas" (DHALLA et al., 2001).

A busca por drogas com ação cardioprotetora, capazes de inibir a ocorrência de eventos cardíacos em situações de estresse ou esforço físico, para a utilização em pacientes portadores de cardiopatias isquêmicas, adquiriu grande relevância nas últimas décadas. Diante disso, apresenta-se o modelo experimental de IAM induzido pelo isoproterenol, reproduzido para facilitar o entendimento fisiopatológico e farmacológico de fármacos capazes de apresentar um potencial cardioprotetor e que possam vir a ser utilizados como adjuvantes na terapêutica do IAM (HEARSE, 2003).

O isoproterenol, também conhecido por isoprenalina, é caracterizado quimicamente pela presença de um grupo isopropila ligado ao grupamento amina, responsável por lhe conferir uma ação agonista  $\beta$ -adrenérgica com pequena afinidade para os receptores  $\alpha$ . A presença de grupos hidroxila nas posições 3 e 4 do anel benzênico de sua estrutura acarreta em uma potencialização desta ação adrenérgica e uma diminuição de seletividade para os diferentes tipos de receptores  $\alpha$ . O grupo hidroxila localizado no carbono  $\beta$  é responsável por aumentar a potência adrenérgica e diminuir a ação do isoproterenol no sistema nervoso central (SNC), em resultado do aumento da hidrofilia da molécula (Figura 1) (HOFFMAN, 2001).

**Figura 1:** estrutura química do isoproterenol.



Fonte: <https://www.lookfordiagnosis.com>

O isoproterenol interage com receptores metabotrópicos adrenérgicos,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Embora ele não seja seletivo acredita-se que no coração ocorra uma interação maior com o tipo  $\beta_1$ , devido a uma maior densidade deste no local. Ao se ligar ao seu receptor, o isoproterenol ativa uma proteína estimulatória, a Gs, que por sua vez ativa a adenilato ciclase (AC), uma enzima intracelular que fica aderida à membrana plasmática e que é responsável pela conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em 3' - 5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento de AMPc proporciona a ativação da proteína cinase dependente de AMPc, a PKa. Esta, por sua vez, fosforila canais de cálcio do tipo L presentes na membrana celular, aumentando o influxo de cálcio, e impede a entrada de íons cálcio no retículo sarcoplasmático, elevando ainda mais os níveis desses íons no meio intracelular. Em decorrência deste fato ocorre um aumento da velocidade e da força de contração cardíaca, além de uma elevação no débito cardíaco (MOURA; VIDAL, 2011).

A hipertrofia cardíaca, decorrente da hiperestimulação simpática promovida pelo isoproterenol, é caracterizada pela presença de um aumento da massa celular, sem aumento do número de células, aliados ao aumento do septo intraventricular, obstrução variável do fluxo ventricular, hipercontratilidade miocárdica e menor enchimento diastólico do ventrículo esquerdo (GOLDSTEIN, 1995). Este fenômeno parece envolver estimulação  $\beta_1$ -adrenérgica (MORISCO et al., 2001), ativação do fator de crescimento TGF- $\beta$  (Fator de transformação de crescimento celular beta) (TAIMOR; SCHLUTER; PIPÉR, 2001), participação do sistema renina- angiotensina (OCARANZA et al., 2002) e ação do estresse oxidativo (AMIN et al., 2001; CHEN et al., 2001). Associado à hipertrofia, o isoproterenol induz necrose nos ratos, localizada geralmente no vértice e no subendocárdio do ventrículo esquerdo e de maneira menos frequente no músculo papilar e no ventrículo direito. Alguns estudos com cardiomiócitos adultos descrevem um fenômeno apoptótico por ação do isoproterenol

(OLIVETTI et al., 2000). Este efeito parece ocorrer por ativação  $\beta$ 1-adrenérgica, sendo inibido por estimulação  $\beta$ 2-adrenérgica (COMMUNAL et al., 1999).

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, o isoproterenol caracteriza-se por diminuir a resistência vascular periférica induzindo a queda da pressão diastólica. A pressão sistólica mantém-se inalterada ou aumenta, enquanto que a pressão arterial média diminui. Efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos ocorrem a nível cardíaco. Ele promove, de um modo geral, o relaxamento dos músculos lisos quando tonificados, em especial os gastrintestinais e os brônquicos (HOFFMAN, 2001).

O isoproterenol leva a uma série de alterações celulares, em um período de 24 horas após sua administração. Dentre elas, destacam-se o surgimento de edemas intersticiais e intercelulares, turgência das fibras musculares, migração de células inflamatórias, hernização dos discos celulares, vacuolização extensa e agregação de células linfomononucleares. As principais alterações bioquímicas no conteúdo sanguíneo correspondem ao aumento dos níveis de aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), creatina-fosfoquinase (CK), glicose e triglicérides, além da elevação ou manutenção do colesterol total. As alterações dos eletrólitos no soro ocasionadas pelo isoproterenol começam a ocorrer 6 a 7 horas após a sua administração, caracterizando-se por uma diminuição nos níveis de sódio e cálcio e aumento de íons potássio. Transcorrido um período de 24 horas após sua administração os níveis de eletrólitos são normalizados, persistindo um aumento de íons cálcio (RAHMATHULLA; DEVI, 2013).

Além destas alterações, verifica-se também uma modificação da produção energética, caracterizada pela redução dos níveis de ATP e fosfatos de creatina, no miocárdio. Quanto à constituição da membrana celular, observa-se um rápido aumento de fosfolipídios, assim como também a sua metilação. Pode ser observado também o aumento da atividade das bombas de cálcio sarcoplasmáticas e reticulares, para contrapor o aumento de íons cálcio intracelular. Entretanto, a atividade diminuída do sistema antiporte sódio/cálcio do sarcolema e a posterior diminuição da atividade das bombas de cálcio do sarcolema e do retículo sarcoplasmático, originam a sobrecarga de íons cálcio intracelular (DHALLA, 2001).

Embora existam outros modelos experimentais de IAM, dentre eles, os de isquemia-reperfusão, crioscopia e oclusão coronária, o modelo de indução do IAM

através da administração do isoproterenol, por apresentar boa especificidade e reprodutibilidade, e ser considerado de fácil execução, baixo custo e não se exigir uma aparelhagem complexa, se apresenta como uma boa ferramenta farmacológica para investigar possível efeito cardioprotetor de produtos naturais.

Uma vez que a própolis vermelha, de composição rica em flavonoides e ácidos fenólicos, apresenta algumas atividades auxiliares à cardioproteção, dentre elas, antioxidante e anti-inflamatória, decidiu-se investigar um possível efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHAPV) em ratos infartados com o modelo de indução por isoproterenol.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar o efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico de Própolis vermelha (EHAPV), em ratos infartados por indução com isoproterenol.

#### **3.2 Específicos**

- Caracterizar o perfil químico do EHAPV por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector ultra-violeta (UV);
- Analisar os aspectos morfométricos nas relações peso/espessuras do miocárdio;
- Aferir as taxas séricas da creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), colesterol total (COL) e triglicérides (TRI);
- Determinar as áreas de lesões necróticas no miocárdio, avaliando a extensão do infarto instalado;

## **4 MATERIAIS**

### **4.1 Própolis vermelha**

A própolis vermelha utilizada neste estudo (81,25 g) foi coletada em abril de 2013, no apiário Ilha do Porto (Marechal Deodoro-Alagoas). Seus acesso e transporte foram autorizados pela coordenação do sistema de autorização de acesso ao patrimônio genético (COAPG). Estes procedimentos e as obtenção e caracterização química do EHAPV foram realizados em colaboração com o laboratório de controle de qualidade de fármacos e medicamentos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

### **4.2 Animais**

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando entre 200-300 g, provenientes do Biotério Central da UFAL.

Antes dos experimentos os animais foram mantidos com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, e com ventilação e temperatura ( $22\pm 1$  °C) controladas e constantes. Os animais foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 24 horas (fase clara: 6-18 horas/ fase escura: 18-6 horas). Todos os procedimentos experimentais com o EHAPV foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFAL sob o parecer n° 12A/2014.

### **4.3 Substâncias**

Cloreto de sódio (Vetec, Brasil), Tiopental sódico (Cristália prod. Quím e farmacêuticos®), Isoproterenol (Sigma Chemical, USA), Cremofor (Sigma Chemical, USA), Cloreto de trifetil tetrazólio (Merck®), Kits bioquímicos: CK-NAC liquiform, CK-MB liquiform, LDH liquiform, AST liquiform, ALT liquiform, colesterol liquiform, triglicérides liquiform (Labtest®), Etanol P.A (Merck®). Os padrões fitoquímicos foram obtidos da Sigma Chemical, USA.

### **4.4 Aparelhagem**

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas em uma centrífuga modelo 80-2B (CentriBio®) e as leituras realizadas em um analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-2000 (BIOPLUS®). As substâncias utilizadas foram pesadas em balança analítica MARTE® e os animais em balança semi-analítica SHIMADZU®.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Obtenção do EHAPV

A própolis vermelha foi submetida a um processo de maceração utilizando uma mistura hidroalcoólica (proporção: 80% de etanol mais 20% de água destilada). O extrato foi seco sob pressão reduzida em evaporador rotatório e após este processo foram obtidos 65 g de EHAPV, com rendimento de 80%.

### 5.2 Caracterização química do EHAPV por meio de CLAE-UV

O monitoramento do perfil fitoquímico da própolis vermelha de Alagoas foi realizado pelo método de análise CLAE-UV (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Shimpak C18 (250 mm x 4.6 mm id, 5µm) acoplada a uma pré coluna Phenomenex C18 (4.0 mm x 3.0 mm i.d.; 5 µm), ambas mantidas a 35°C. A fase móvel se caracterizou por um sistema gradiente, utilizando ácido fórmico/água (1:19 v/v) como solvente A e metanol grau CLAE como solvente B (JT Baker, Mallinckrodt, México). O fluxo da fase móvel foi de 0,80 mL/min e o detector ajustado para 281 nm. O gradiente de solventes foi programado da seguinte forma: 30% de B no tempo de 0 a 7 min, 40% de B em 15 min, 45% de B em 30 min, 60% de B em 40 min, 80% de B em 50 min, 90% de B em 60 min, reduzindo para 30% de B em 65 min e permanecendo isocrático até 70 min. As amostras de EHAPV foram injetadas em volume de 20 µL. Em corridas individuais, foram injetados os padrões fitoquímicos (catequina, epicatequina, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, liquiritigenina, quercetina, luteolina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, biochanina A e crisina) nas concentrações de 500 µg/mL, e o EHAPV, na concentração de 1000 µg/mL.

### 5.3 Preparo da solução do EHAPV

O extrato foi solubilizado em cremofor<sup>®</sup> e devidamente dissolvido, diariamente, em solução salina (0,9%), para obtenção das doses de 50, 75 e 150 mg/kg e subsequente realização do protocolo experimental. De acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, a concentração final de cremofor<sup>®</sup> (3%), não apresentava nenhuma interferência nos experimentos *in vivo*.

#### 5.4 Indução do infarto agudo do miocárdio

O modelo experimental de indução do infarto agudo do miocárdio se baseou na técnica descrita por RAJADURAI E PRINCE (2006), onde o isoproterenol, na dose de 85 mg/kg, foi dissolvido em solução salina (0,9%) e injetado por via subcutânea nos animais, durante dois dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre as 1ª e 2ª administrações.

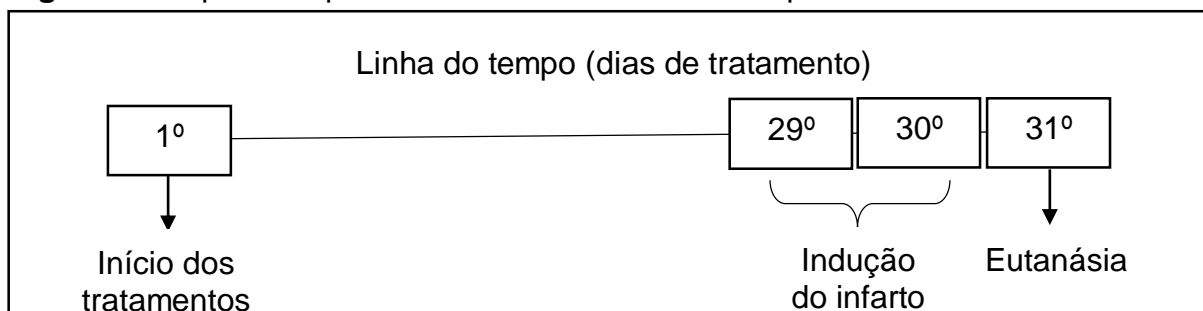
#### 5.5 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, com oito animais cada, como descrito abaixo:

- Grupo controle = tratado com solução salina (0,9%) e não submetido ao infarto;
- Grupo ISO = tratado com solução salina (0,9%) e submetido ao infarto;
- Grupo EHAPV 50 mg/kg + ISO = tratado com EHAPV na dose de 50 mg/kg e submetido ao infarto;
- Grupo EHAPV 75 mg/kg + ISO = tratado com EHAPV na dose de 75 mg/kg e submetido ao infarto;
- Grupo EHAPV 150 mg/kg + ISO = tratado com EHAPV na dose de 150 mg/kg e submetido ao infarto;

Os animais foram submetidos ao tratamento com solução salina (0,9%) ou EHAPV nas doses de 50, 75 e 150 mg/kg diariamente, durante um período de 30 dias. A indução do infarto se deu nos 29º e 30º dias. Ao final do tratamento, todos os grupos foram submetidos a testes *post mortem* (bioquímicos, morfométricos, e colorimétricos).

**Figura 2:** Esquema representativo do delineamento experimental.



Fonte: autor, 2015.

## **5.6 Avaliação do efeito do EHAPV nos parâmetros morfométricos de ratos submetidos ao infarto (WERNER; BOLSON; BATTISTI, 2001)**

### **5.6.1 Peso médio dos corações (Pcard), aumento relativo do peso cardíaco (ARPCard) e razão entre peso cardíaco e peso corpóreo (Pcard/Pcorp)**

Os cinco grupos de ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia (Tiopental sódico, 45 mg/Kg, i.p.) e os corações foram excisados. Logo após serem isolados (quando sem artérias aorta e veia cava, respectivamente) e desprovidos de tecidos conectivos, foram lavados com solução salina 0,9%, para retirada de coágulos sanguíneos, e em seguida pesados em balança analítica MARTE®, para obtenção do Pcard.

As diferenças de Pcard, foram quantificadas, em porcentagem, através do ARPCard. Com a finalidade de se evitar a influência do Pcorp sobre a análise do Pcard, realizou-se a normatização, por meio da razão Pcard/Pcorp.

### **5.6.2 Espessuras ventriculares**

Após terem sido lavados e pesados, os corações foram seccionados em posição longitudinal. Posteriormente, os ventrículos esquerdo e direito foram medidos através de escala milimetrada por meio de um paquímetro manual, obtendo as espessuras ventriculares esquerda e direita (EVE e EVD).

As diferenças das EVE e EVD foram quantificadas, em milímetros, através das variações das espessuras ventriculares esquerda e direita ( $\Delta$ EVE e  $\Delta$ EVD), e em porcentagem, por meio dos aumentos relativos das espessuras ventriculares esquerda e direita (AREVE e AREVD).

## **5.7 Avaliação do efeito do EHAPV nos parâmetros bioquímicos de ratos submetidos ao infarto**

As atividades da creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), colesterol total (COL) e triglicérides (TRI) foram medidas nos soros dos ratos com a finalidade de se avaliar a extensão da lesão cardíaca induzida pelo isoproterenol,. Os ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia e o sangue foi coletado através de punção cardíaca. Após ser coletado, o sangue foi inserido em tubos sem anticoagulante e centrifugado a 800 rpm por 5 minutos. Na sequência o soro foi coletado, separado e incubado em

kits bioquímicos (CK-NAC, CK-MB, LDH, AST, ALT, COL E TRI) Labtest<sup>®</sup>, e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-2000 (BIOPLUS<sup>®</sup>) (LI et al., 2012).

#### 5.7.1 Creatino-quinase total (CK-NAC) e Creatino-quinase fração MB (CK-MB)

A CK é responsável por catalisar a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), que por sua vez reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. Esta, na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A atividade de CK na amostra é proporcional à velocidade de incremento na absorvância em 340 nm.

#### 5.7.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH catalisa a conversão reversível de ácido láctico muscular em ácido pirúvico, um passo essencial nos processos metabólicos, que em última análise produzem a energia celular. A LDH catalisa a conversão do piruvato ao lactato na presença de NADH. A atividade da LDH na amostra é proporcional ao decréscimo da absorvância em 340 nm devido a oxidação do NADH.

#### 5.7.3 Aspartato Amino Transferase (AST)

A determinação de AST foi realizada por método enzimático cinético, usando kit Labtest<sup>®</sup>. A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. O oxalacetato por ação da malato desidrogenase é então reduzido a malato e a coenzima NADH é oxidada a NAD. A absorvância em 340 nm é resultante da oxidação do NADH e é proporcional a atividade da AST na amostra.

#### 5.7.4 Alanina Amino Transferase (ALT)

A determinação de ALT foi realizada por método enzimático cinético, usando kit Labtest<sup>®</sup>. A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340 nm, conseqüente à oxidação da coenzima NADH, é

monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional a atividade da ALT na amostra.

#### 5.7.5 Colesterol total

A determinação de colesterol total foi realizada pelo método colorimétrico ou do ponto final, utilizando kit Labtest®. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol estearase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

#### 5.7.6 Triglicérides

A determinação de triglicérides foi realizada pelo método colorimétrico ou do ponto final, utilizando kit Labtest®. A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que por sua vez, é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Em seguida ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra.

### **5.8 Avaliação do efeito do EHAPV sobre os parâmetros macroscópicos no músculo estriado cardíaco de ratos submetidos ao infarto**

Os animais dos cinco grupos foram eutanasiados conforme mencionado anteriormente. Na sequência os corações foram excisados e congelados por um período de 20 minutos, e depois seccionados em posição transversal em fatias de 3 a 5 mm. Após esse procedimento, os seguimentos dos corações foram imersos em solução de Cloreto de trifeniltetrazólio à 1% (TTC 1%) em meio tamponado (pH = 7,4) e mantidos em banho-maria, sob temperatura de 37°C por 20 minutos. Para verificar a existência de áreas necróticas decorrentes do infarto, as secções foram examinadas sob luz, e em seguida fotografadas (MOHAN et al., 2010).

## **5.9 Peso médio corporal dos ratos**

Para avaliação da massa corpórea, os ratos foram pesados em balança semi-analítica SHIMADZU, no início do tratamento (1º dia) e no dia da eutanásia (31º dia).

## **5.10 Análise estatística**

Todos os resultados obtidos foram expressos como a percentagem da média  $\pm$  o erro padrão da média (e.p.m.), e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se a análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Todos os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

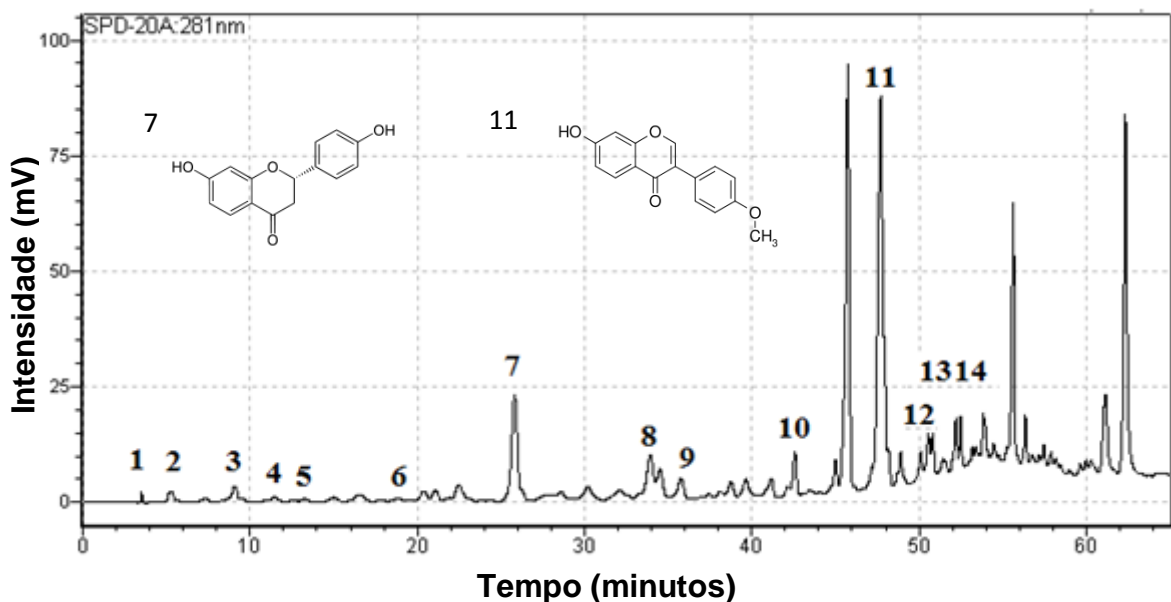


## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização química do EHAPV por meio de CLAE-UV

Com a realização da CLAE-UV, se identificou no EHAPV a presença de 14 substâncias diferentes, dentre elas, vários flavonoides, como os flavanois catequina (3 min) e epicatequina (4 min), os flavonois rutina (18 min) e quercetina (34 min), as flavonas luteolina (35 min) e crisina (52 min), os isoflavonoides formononetina (47 min) e biochanina A (51 min), as flavanonas liquiritigenina (26 min) e pinocembrina (50 min), e a chalcona isoliquiritigenina (42 min), além de alguns ácidos fenólicos como os ácido cafeico (9 min), ácido p-cumárico (11 min) e ácido ferúlico (13min). Os flavonoides em geral, são mais presentes que os ácidos fenólicos. Os constituintes majoritários identificados são: formononetina (isoflavonoide) e liquiritigenina (flavanona) (Figura 3).

**Figura 3:** Cromatograma do EHAPV na concentração de 1000 µg/mL.



(1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido cafeico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) liquiritigenina, (8) quercetina, (9) luteolina, (10) isoliquiritigenina, (11) formononetina, (12) pinocembrina, (13) biochanina A e (14) crisina.

Fonte: autor, 2015.

## 6.2 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros morfométricos de ratos submetidos ao infarto

### 6.2.1 Medidas do Pcard, ARPCard e Pcard/Pcorp

O perfil morfométrico do Pcard (Gráfico 1A) mostra que ocorreu um aumento significativo deste parâmetro ( $1100 \pm 100$ ;  $1400 \pm 100$  mg) no grupo ISO quando realizada comparação com o grupo controle. O mesmo ocorreu com o grupo do EHAPV na dose de 50 mg/kg ( $1100 \pm 100$ ;  $1300 \pm 100$  mg).

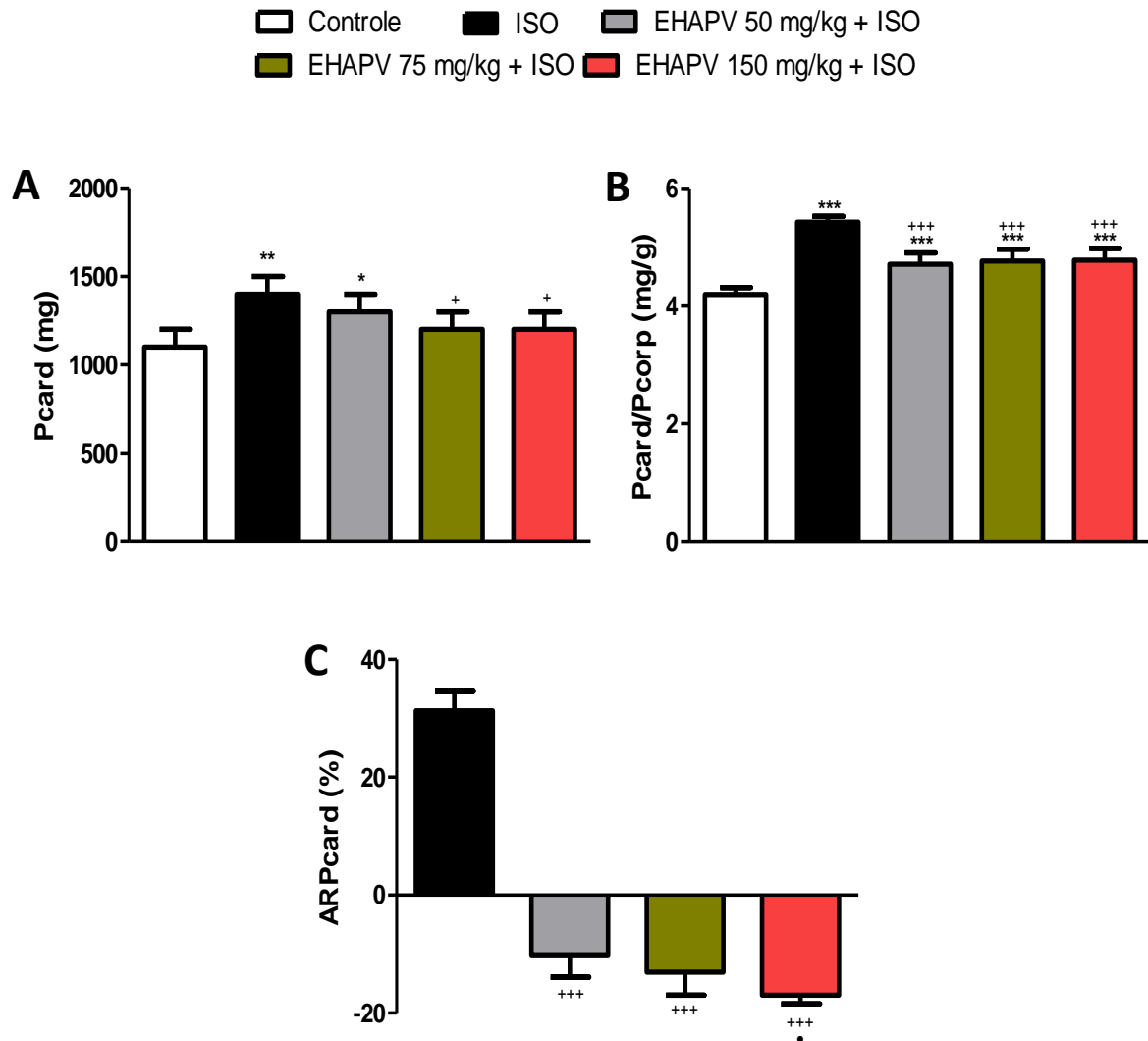
Já nos grupos tratados com o EHAPV nas doses de 75 e 150 mg/kg, respectivamente, houve uma diminuição significativa do Pcard ( $1400 \pm 100$ ;  $1200 \pm 100$ ;  $1200 \pm 100$  mg) quando comparado ao grupo ISO (Gráfico 1A).

Ao se analisar o gráfico 1B, nota-se um aumento significativo da razão Pcard/Pcorp ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $5,4 \pm 0,1$  mg/g) no grupo ISO em comparação com o grupo controle.

Em contrapartida, nos três grupos tratados com o EHAPV nas diferentes doses, embora tenha ocorrido uma diferença significativa para com o grupo controle, houve também uma diminuição significativa da razão Pcard/Pcorp ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $5,4 \pm 0,1$ ;  $4,7 \pm 0,2$ ;  $4,7 \pm 0,2$ ;  $4,7 \pm 0,2$  mg/g) quando comparados com o grupo ISO (Gráfico 1B).

O gráfico 1C, que analisa o ARPCard, demonstra uma diminuição significativa deste parâmetro ( $31,26 \pm 3,30$ ;  $-10,10 \pm 3,80$ ;  $-13,06 \pm 3,90$ ;  $17,00 \pm 1,50$  %), nos três grupos tratados com o EHAPV, ao serem comparados com o grupo ISO.

**Gráfico 1:** Análise morfométrica (**A:** Pcard; **B:** Pcard/Pcorp; **C:** ARPcard) dos corações de ratos submetidos ao infarto.



Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA one-way seguidos do pós-teste Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Controle; +  $p < 0,05$  +++  $p < 0,001$  vs. ISO; •  $p < 0,05$  vs. EHAPV 50 mg/Kg + ISO.  $n=5$ .

Fonte: autor, 2015.

### 6.2.2 Determinação das EVD, EVE, $\Delta$ EVD, $\Delta$ EVE, AREVD e AREVE

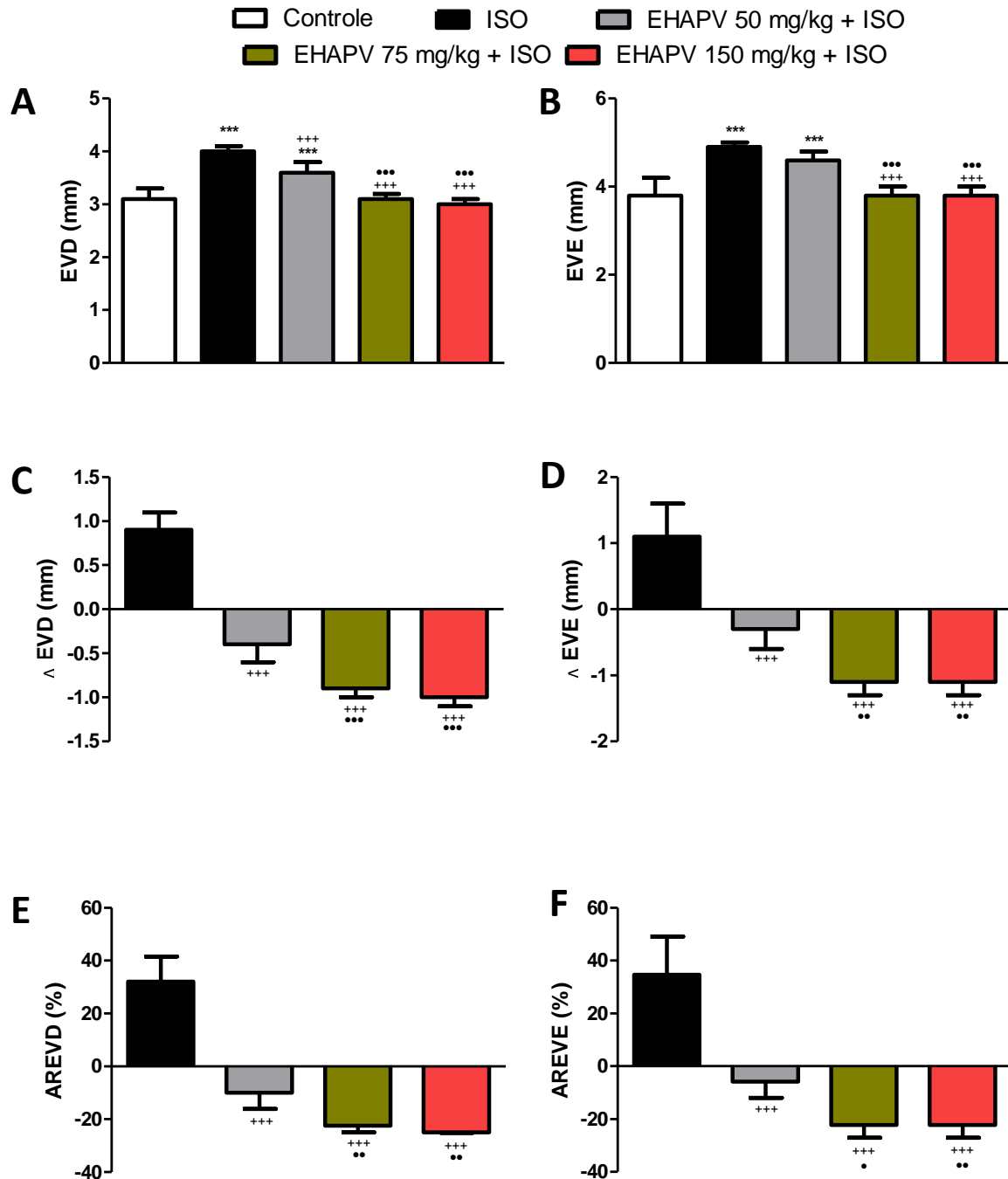
O perfil morfométrico das espessuras ventriculares direita ( $3,1 \pm 0,2$ ;  $4,0 \pm 0,1$  mm) e esquerda ( $3,8 \pm 0,4$ ;  $4,9 \pm 0,1$  mm) do grupo ISO é caracterizado por um aumento significativo destes parâmetros, quando realizada comparação com o grupo controle (Gráficos 2A e 2B).

O grupo tratado com EHAPV na dose de 50 mg/kg, também se apresenta diferente significativamente do grupo controle, em EVD ( $3,1 \pm 0,2$ ;  $3,6 \pm 0,2$  mm) e EVE ( $3,8 \pm 0,4$ ;  $4,6 \pm 0,2$  mm), embora tenha ocorrido uma diminuição significativa de EVD ( $4,0 \pm 0,1$ ;  $3,6 \pm 0,2$  mm) neste grupo ao ser comparado ao grupo ISO. Os grupos tratados com EHAPV nas doses de 75 e 150 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa em EVD ( $4,0 \pm 0,1$ ;  $3,6 \pm 0,2$ ;  $3,1 \pm 0,1$ ;  $3,0 \pm 0,1$  mm) e EVE ( $4,9 \pm 0,1$ ;  $4,6 \pm 0,2$ ;  $3,8 \pm 0,2$ ;  $3,8 \pm 0,2$  mm) quando comparados com os grupos ISO e EHAPV na dose de 50 mg/kg (Gráficos 2A e 2B).

Os gráficos 2C e 2D mostram que ocorreu uma diminuição significativa de  $\Delta$ EVD ( $0,9 \pm 0,2$ ;  $-0,4 \pm 0,2$ ;  $-0,9 \pm 0,1$ ;  $-1,0 \pm 0,1$  mm) e  $\Delta$ EVE ( $1,1 \pm 0,5$ ;  $-0,3 \pm 0,3$ ;  $-1,1 \pm 0,2$ ;  $-1,1 \pm 0,2$  mm) nos grupos tratados com as três doses de EHAPV em comparação com o grupo ISO. Além disso, houve uma diferença significativa entre os grupos do EHAPV nas doses de 75 e 150 mg/kg em relação a dose de 50 mg/kg.

Os gráficos 2E e 2F, que analisam os AREVD e AREVE, respectivamente, demonstram uma diminuição significativa em AREVD ( $32,0 \pm 9,5$ ;  $-10,0 \pm 6,1$ ;  $-22,5 \pm 2,5$ ;  $-25,0 \pm 0,1$  %) e AREVE ( $34,6 \pm 14,5$ ;  $-5,8 \pm 6,2$ ;  $-22,2 \pm 4,8$ ;  $-22,2 \pm 4,8$  %) nos grupos tratados com as três doses do EHAPV quando comparados com o grupo ISO, e uma diferença significativa entre as doses de 75 e 150 mg/kg em relação a dose de 50 mg/kg.

**Gráfico 2:** Análise morfométrica (**A:** EVD **B:** EVE; **C:**  $\Delta$ EVD; **D:**  $\Delta$ EVE; **E:** AREVD; **F:** AREVD) dos corações de ratos submetidos ao infarto.



Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA one-way seguidos do pós-teste Newman-Keuls. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Controle; +++  $p < 0,001$  vs. ISO; •  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. EHAPV 50 mg/Kg + ISO.  $n=5$ .

Fonte: autor, 2015.

### 6.3 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros bioquímicos de ratos submetidos ao infarto

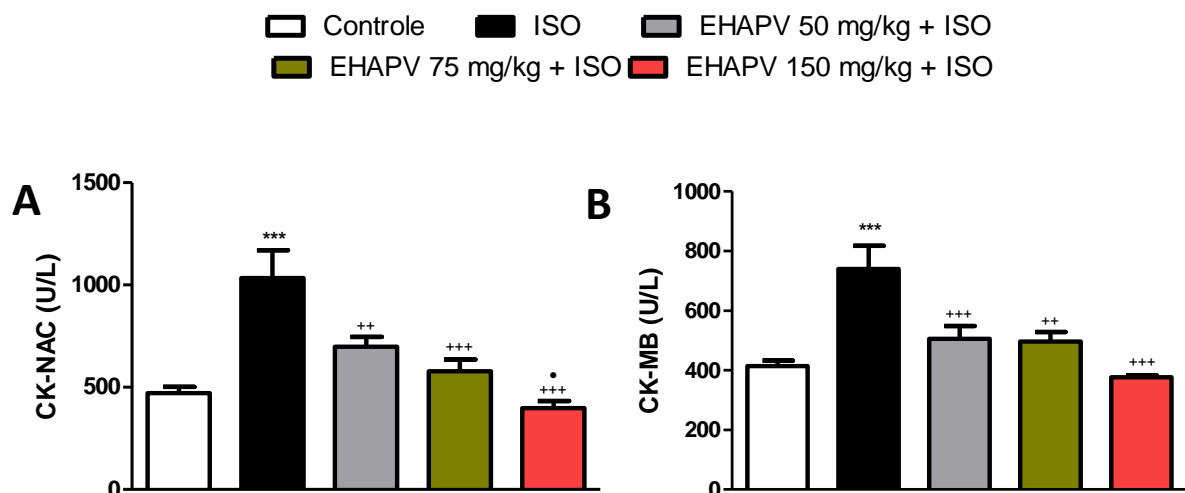
#### 6.3.1 Níveis plasmáticos de CK-NAC e CK-MB

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos tem-se o gráfico 3, o qual mostra que houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de CK-NAC ( $471,2 \pm 31,2$ ;  $1035,0 \pm 134,7$  U/L) e CK-MB ( $414,4 \pm 18,5$ ;  $740,8 \pm 77,3$  U/L) no grupo ISO em comparação com o grupo controle (Gráficos 3A e 3B).

Já nos três grupos tratados com EHAPV, houve uma diminuição significativa e dependente de dose nesses níveis plasmáticos, tanto de CK-NAC ( $1035,0 \pm 134,7$ ;  $697,7 \pm 47,6$ ;  $578,7 \pm 57,1$ ;  $397,9 \pm 34,6$  U/L) como CK-MB ( $740,8 \pm 77,3$ ;  $505,6 \pm 43,5$ ;  $496,0 \pm 32,9$ ;  $376,8 \pm 6,3$  U/L) quando comparados com o grupo ISO (Gráficos 3A e 3B).

No gráfico 3A ainda se faz presente uma diferença significativa entre os grupos do EHAPV, nas doses de 150 e 50 mg/kg.

**Gráfico 3:** Análise enzimática das creatino-fosfoquinases (**A:** creatino-quinase total (CK-NAC), **B:** creatino-quinase fração MB (CK-MB)) de ratos submetidos ao infarto.



Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA one-way seguidos do pós-teste Newman-Keuls. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Controle; ++  $p < 0,01$  vs. Controle; +++  $p < 0,001$  vs. ISO; •  $p < 0,05$  vs. EHAPV 50 mg/Kg + ISO.  $n=5$ .

Fonte: autor, 2015.

### 6.3.2 Níveis plasmáticos de AST, ALT, LDH, COL e TRI

O gráfico 4A mostra que houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de AST ( $151,0 \pm 15,7$ ;  $313,8 \pm 20,1$ ;  $239,6 \pm 28,9$ ;  $340,4 \pm 50,5$ ;  $372,6 \pm 19,9$  U/L) nos grupos ISO e EHAPV nas três doses, quando comparados ao grupo controle.

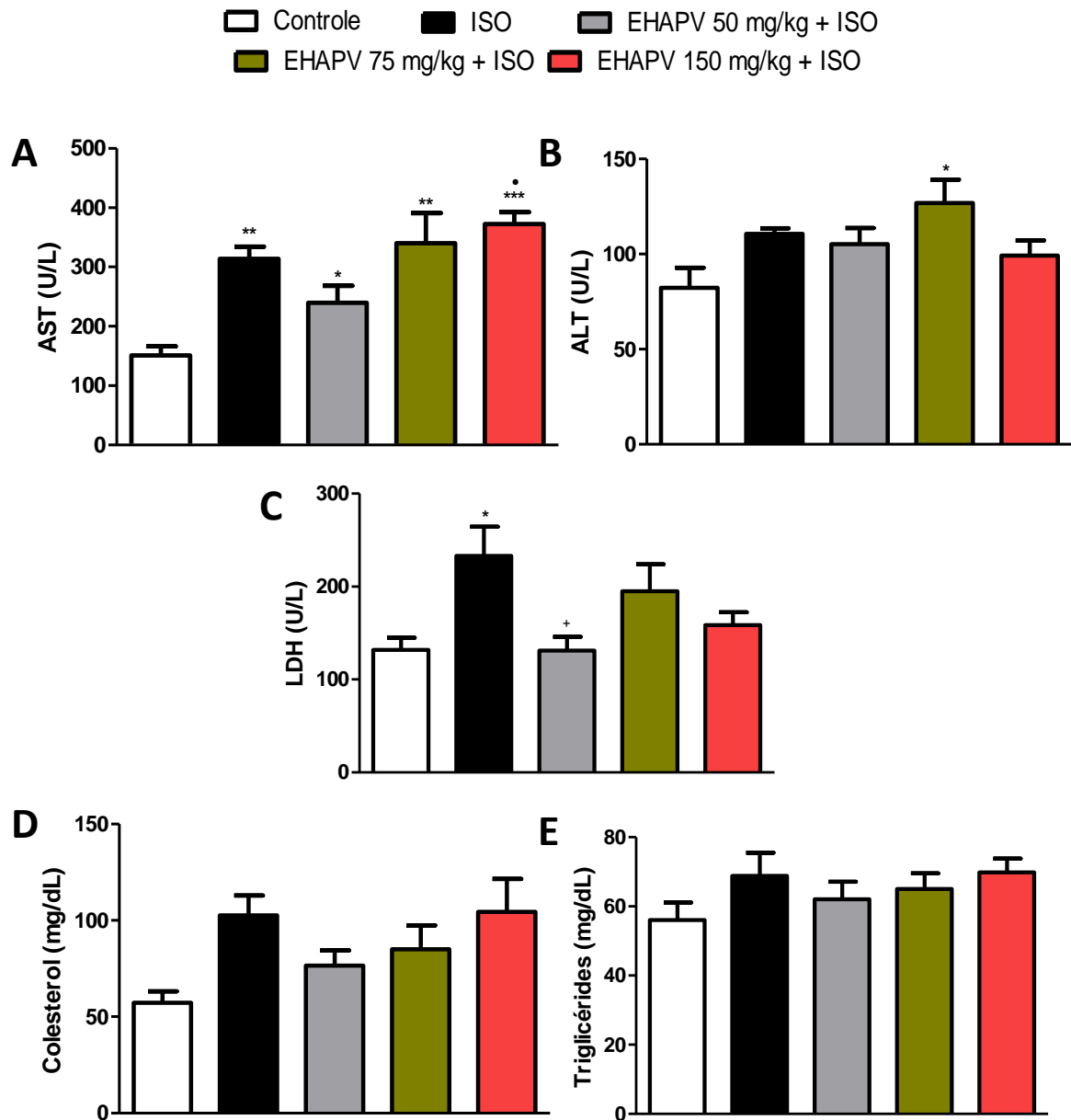
Além disso, há uma diferença significativa nos níveis de AST entre os grupos do EHAPV nas doses de 150 e 50 mg/kg (Gráfico 4A). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos do EHAPV, nas três doses, e o grupo ISO.

O gráfico 4B demonstra semelhança nos níveis de ALT entre todos os grupos, com exceção do grupo do EHAPV na dose de 75 mg/kg, que promoveu um aumento significativo nos níveis de ALT ( $82,2 \pm 10,6$ ;  $126,8 \pm 12,3$  U/L) quando comparado ao grupo controle.

O gráfico 4C demonstra um aumento significativo nos níveis plasmáticos de LDH ( $131,9 \pm 13,1$ ;  $233,2 \pm 31,4$  U/L) no grupo ISO em comparação com o controle, e uma diminuição significativa nestes níveis, apenas no grupo do EHAPV na dose de 50 mg/kg quando comparado ao ISO ( $233,2 \pm 31,4$ ;  $131,1 \pm 14,9$  U/L). Os grupos do EHAPV, nas três doses, não diferiram significativamente do grupo controle.

Ao se observar os gráficos 4D e 4E, pode-se notar que não houve diferenças significativas nos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides entre os grupos experimentais.

**Gráfico 4:** Análise enzimática (**A:** aspartato amino transferase (AST), **B:** alanina amino transferase (ALT), **C:** lactato desidrogenase (LDH), **D:** colesterol total, **E:** triglicérides) de ratos submetidos ao infarto.



Resultados expressos em média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Controle; +  $p < 0,05$  vs. ISO; •  $p < 0,05$  vs. EHAPV 50 mg/Kg + ISO.  $n=5$ .

Fonte: autor, 2015.

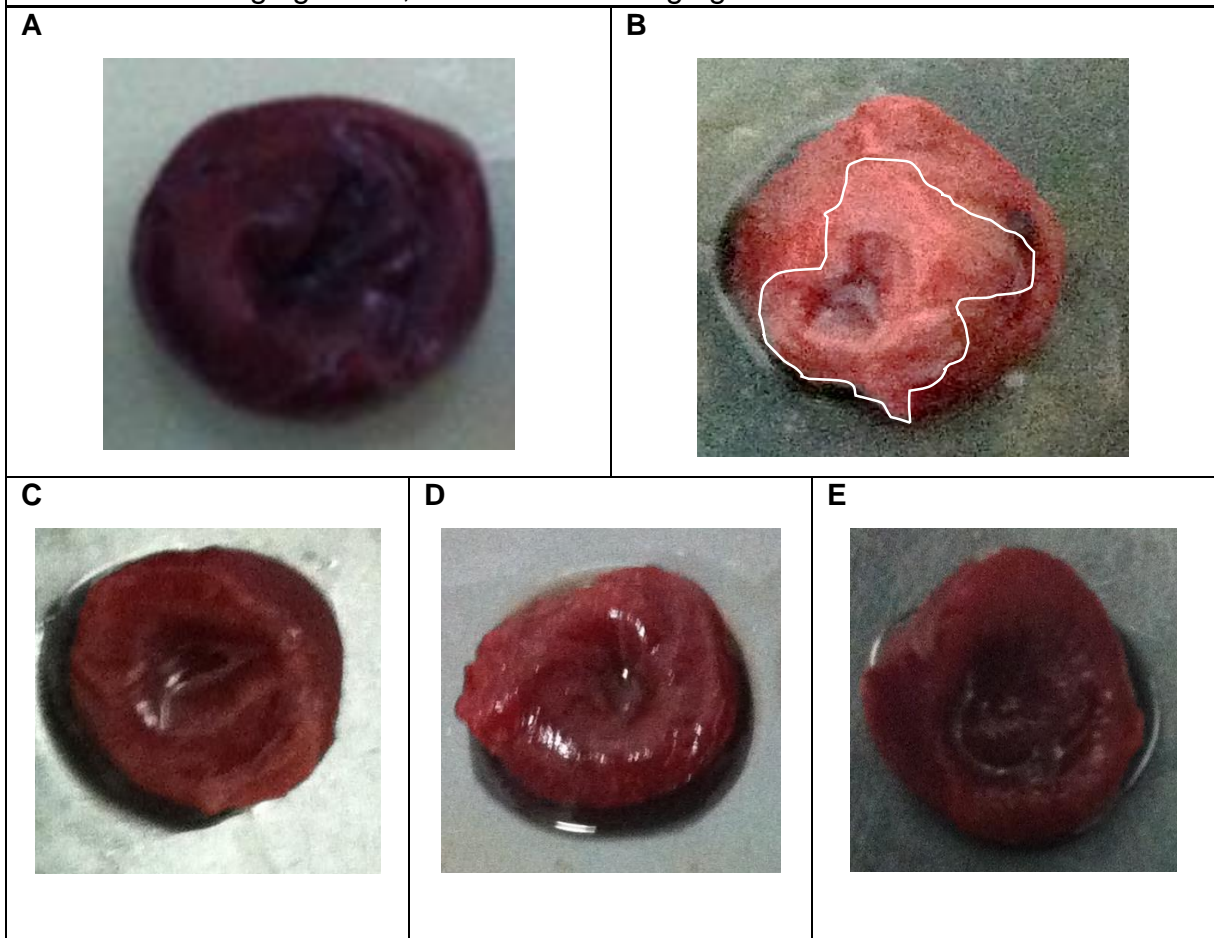


#### 6.4 Efeito do EHAPV sobre os parâmetros macroscópicos no músculo estriado cardíaco de ratos submetidos ao infarto

O quadro 1 demonstra que os seguimentos dos corações do grupo ISO (B) submetidos ao ensaio colorimétrico com o TTC 1% apresentam uma coloração alaranjada, com áreas esbranquiçadas, quando comparados ao grupo controle (A), indicando a presença de zonas de necrose por toda a secção cardíaca.

Já nos grupos tratados com as diferentes doses do EHAPV (C, D, E), percebe-se uma diminuição dessas áreas e aparecimento de uma coloração vermelha intensa, que chega a se assemelhar a do grupo controle (A), podendo então sugerir-se que nestes grupos houve prevenção da formação de zonas necróticas.

**Quadro 1:** Fotografias representativas das secções cardíacas transversais coradas por cloreto de trifenetrazólio a 1%. **A:** controle, **B:** ISO, **C:** EHAPV 50 mg/kg + ISO, **D:** EHAPV 75 mg/kg + ISO, **E:** EHAPV 150 mg/kg + ISO. n=3.



## 6.5 Peso médio corporal

A tabela 1 mostra que não houve alteração significativa entre os pesos médios corporais dos animais entre os 1º e 31º dias de tratamento, tanto nos grupos controle e ISO quanto nos grupos tratados com as diferentes doses do EHAPV.

**Tabela 1:** Peso corporal (g) dos ratos durante o tratamento.

Grupos	1º dia	31º dia
Controle	242,6 ± 7,5	256,6 ± 9,7
ISO	247,0 ± 3,5	259,0 ± 7,3
EHAPV 50 mg/kg + ISO	271,6 ± 12,8	268,8 ± 13,2
EHAPV 75 mg/kg + ISO	259,0 ± 5,0	255,8 ± 7,4
EHAPV 150 mg/kg + ISO	249,2 ± 9,7	245,4 ± 10,8

Resultados expressos em média ± E.P.M. e analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste Newman-Keuls. n=5.

Fonte: autor, 2015.

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada uma caracterização química do EHAPV, por meio de CLAE-UV, e investigada uma possível atividade cardioprotetora do EHAPV em ratos infartados com o modelo de indução por uma droga simpatomimética, o isoproterenol. Para avaliação da presença do efeito cardioprotetor foram realizados testes *post mortem*, constituídos de uma série de análises: a macroscópica colorimétrica, com o intuito de se verificar a presença de áreas necróticas nos corações; a morfométrica, objetivando observar a hipertrofia cardíaca; a bioquímica, para se verificar os marcadores de lesão celular.

O IAM representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, constituindo um grave problema de saúde pública. Visando a descoberta de novas terapêuticas cardioprotetoras, torna-se de fundamental importância o conhecimento a respeito desta doença (MADHESH; VAYIAPURI, 2013). O objeto deste estudo, a própolis vermelha, é caracterizada por ter uma composição química bastante rica e diversificada, tendo como constituintes vários flavonoides e ácidos fenólicos. Sua constituição química, aliada ao fato de já serem conhecidas algumas de suas atividades biológicas, dentre elas, a antioxidante (CABRAL et al., 2009) e anti-inflamatória (BUENO-SILVA et al., 2013), fez com que se despertasse o interesse para se investigar uma possível atividade cardioprotetora frente ao IAM.

Com a finalidade de se entender as diferenças na composição química dos variados tipos de própolis, se faz necessária uma relação direta com as suas diversas origens vegetais. É importante ressaltar que para produzir a própolis, as abelhas se utilizam de materiais oriundos de processos botânicos das mais variadas partes das plantas, como por exemplo, exsudatos lipofílicos encontrados nas folhas, gomas, resinas, e nos brotos (CHRISTOV et al., 2005). Portanto, a diversidade química da própolis é determinada por sua origem vegetal. A sua composição química está diretamente relacionada com a flora local, assim como é influenciada pelas características geográficas e climáticas da região. Diante disso, tem-se uma diversidade impressionante na sua constituição, especialmente de própolis provenientes de regiões tropicais, como é o caso da própolis vermelha brasileira (PARK et al., 2004).

Uma técnica comumente utilizada para promover a identificação e o isolamento da maior parte de classes de produtos naturais é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Trata-se de uma técnica robusta, versátil, e normalmente rápida, através da qual os compostos podem ser purificados a partir de misturas bastante complexas. A constante inovação e novas aplicações na área, acabam por tornar os sistemas de CLAE mais acessíveis a diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

Alguns estudos na literatura descrevem a respeito da composição química da própolis vermelha. SILVA et al., (2008), constataram que no extrato etanólico de própolis vermelha oriunda do nordeste brasileiro há presença de 13 substâncias diferentes, dentre elas, um ácido fenólico, o ácido ferúlico, e dois flavonoides, quercetina e crisina. Além disso, esse estudo foi o primeiro a definir que a fonte vegetal para produção da própolis vermelha brasileira é a espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L) (Leguminosae). Um outro estudo, realizado por FROZZA et al., (2013), mostra a presença de outros ácidos fenólicos, e flavonoides no extrato etanólico de própolis vermelha do nordeste brasileiro, como a formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A.

A caracterização química realizada neste trabalho evidencia a presença de vários picos cromatográficos para o EHAPV, o que corresponde às várias substâncias que constituem sua complexa composição química (Figura 3; pág. 39). O método aplicado para identificação dessas substâncias foi capaz de obter resolução entre os picos. A partir dessa resolução obtida e também por meio de uma revisão da literatura, a escolha dos padrões foi otimizada, de forma que, ocorreu a identificação de 14 substâncias naturais presentes no EHAPV. Dentre essas, foram observadas as classes naturais: ácidos fenólicos, flavonóis, flavanois, flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonoides. As substâncias correspondentes aos picos cromatográficos do EHAPV foram identificadas por comparação dos seus tempos de retenção com o tempo de retenção de cada padrão. Para este método, as substâncias de maior polaridade eluíram primeiro que as menos polares, devido sua maior afinidade à fase móvel. O cromatograma do EHAPV evidencia que o mesmo é rico em isoflavonoides e flavanonas, além de apresentar também presença de ácidos fenólicos. Dessa forma a composição fitoquímica do EHAPV é diferente dos demais tipos de própolis (outros 12 grupos) descritos na literatura.

Alguns dos constituintes encontrados no EHAPV são caracterizados por apresentarem atividade cardioprotetora. O flavanol epicatequina e os ácidos fenólicos p-cumárico e ferúlico, por exemplo, desempenham a cardioproteção por diminuição do estresse oxidativo, através do aumento de antioxidantes endógenos (PRINCE, 2013; STANLEY MAINZE PRINCE; ROY, 2013; YOGEEETA et al., 2006). O efeito cardioprotetor alcançado pelo flavonol quercetina e pela flavona luteolina envolve diminuição dos produtos de peroxidação lipídica e de biomarcadores enzimáticos do IAM (PRINCE; SATHYA, 2012; MADHESH; VAIYAPURI, 2013). Outro ácido fenólico, o cafeico, promove a cardioproteção por meio da diminuição dos influxos de íons cálcio e sódio na célula cardíaca, desempenhando ação antiarrítmica (CHANG et al., 2013). Um estudo realizado com o constituinte majoritário do EHAPV, o isoflavonoide formononetina, atribuiu a esta substância um efeito cardioprotetor por prevenir alterações eletrocardiográficas e diminuir os níveis dos biomarcadores enzimáticos do IAM e apoptose celular (ZHANG et al., 2011).

É bem relatado na literatura que o Isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, é caracterizado por produzir, em altas doses, tensão no miocárdio, devido à produção de radicais livres através de sua auto-oxidação. Hipóxia, hipotensão coronária, sobrecarga de cálcio, esgotamento de energia e produção excessiva de radicais livres, são alguns dos mecanismos propostos para explicar os danos aos miócitos cardíacos causados pelo isoproterenol (ADAMEOVA; ABDELLATIF; DHALLA, 2009). Dentre os danos mais comuns estão alterações morfológicas, bioquímicas e celulares. Diante disso, o modelo de indução do IAM por isoproterenol se mostra altamente sensível e reprodutível, sendo capaz de mimetizar, de maneira categórica, as características fisiopatológicas desta doença. Vários são os produtos naturais que têm uma possível atividade cardioprotetora avaliada frente a esse modelo (GENG, 2004).

Pode ser observado na literatura que o IAM promove uma série de alterações morfológicas no coração, conhecidas por hipertrofia cardíaca. Essa hipertrofia é resultado do stress gerado por vários eventos moleculares que ocorrem nos cardiomiócitos, levando, desta forma, ao aumento da tensão da parede ventricular e consequente estado hipertrófico (MOLKENTIN; DORN, 2001). O principal tipo de hipertrofia que acomete o coração, é a concêntrica, que se caracteriza pelo aumento da espessura da parede ventricular com aumento da massa cardíaca, acompanhada de redução da cavidade ventricular (JUNIOR; FRANCHINNI, 2008). É importante

ressaltar que na cardiomiopatia induzida pelo isoproterenol, essa hipertrofia se faz presente. Este episódio ocorre em função da superestimulação de receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos e aumento dos níveis do fator de crescimento TGF-  $\beta$  (TAIMOR et al., 2001).

Alguns estudos demonstram o efeito de produtos naturais frente à hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol. YOUSEFI et al., (2013), por exemplo, observaram um aumento significativo do parâmetro Pcard/Pcorp no grupo infartado com o isoproterenol quando comparado ao controle, e uma diminuição nos grupos tratados com o extrato metanólico das partes aéreas da espécie *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), em comparação com o grupo ISO. Esta espécie apresenta uma composição química rica em glicosídeos e flavonoides como quercetina e luteolina (PUKALSKAS et al., 2012).

Diante dessas premissas, decidiu-se investigar se o pré-tratamento com as diferentes doses do EHAPV seria capaz de impedir as alterações morfológicas cardíacas ocasionadas pela administração do isoproterenol. Para isto, foram avaliados o peso dos corações úmidos, as espessuras ventriculares, as diferenças de espessuras, os aumentos relativos, e realizada a correlação do peso cardíaco com o peso corpóreo.

O que pode ser constatado neste trabalho é que houve um aumento significativo do Pcard e da massa cardíaca, representada por Pcard/Pcorp (Gráficos 1A e 1B, página 41) e das EVD e EVE (Gráficos 2A e 2B; página 43), no grupo ISO, quando comparado ao grupo controle. Estes dados demonstram o estado hipertrófico gerado pela administração do isoproterenol nos animais. Já o pré-tratamento com o EHAPV, nas três doses, se mostrou capaz de impedir o aumento desses parâmetros morfométricos, além de diminuir o ARPcard (Gráfico 1C, página 41), as  $\Delta$ EVD e  $\Delta$ EVE (Gráficos 2C e 2D; página 43) e os AREVD e AREVE (Gráficos 2E e 2F; página 43), quando comparados ao grupo ISO. As doses de 75 e 150 mg/kg se mostraram mais eficazes em evitar a hipertrofia cardíaca do que a de 50 mg/kg.

O estado hipertrófico do coração é um tipo comum de remodelamento cardíaco. Inicialmente é caracterizado por ser uma resposta adaptativa para promover a redução do estresse da parede ventricular e assim manter o débito cardíaco. Entretanto a hipertrofia prolongada, sustentada, pode originar a disfunção ventricular

e levar a um quadro de insuficiência cardíaca (KEHAT; MOLKENTIN, 2010). Portanto, uma série de eventos cardiovasculares adversos têm sido associados a um importante fator de risco, a hipertrofia ventricular esquerda (HILL; OLSON, 2008). O EHAPV, nas três doses, conseguiu prevenir este estado hipertrófico prolongado característico do IAM, demonstrando assim um efeito cardioprotetor frente aos parâmetros morfométricos.

Os marcadores bioquímicos que retratam injúria miocárdica, vêm sendo utilizados por um período de mais de meio século, para diagnosticar o IAM. Dentre esses marcadores podem ser citados as enzimas AST, ALT, LDH, CK-NAC e CK-MB (DOLCI; PANTEGHINI, 2006). Dentro desse contexto, um aumento nos níveis plasmáticos dessas enzimas, que são intracelulares, pode indicar de forma direta ou indireta lesão cardíaca, enquanto que uma diminuição pode estar relacionada a um efeito cardioprotetor (THOMES et al., 2010).

A CK se caracteriza por ser uma enzima responsável por catalisar a transferência de fosfato de alta energia para o trifosfato de adenosina (ATP), a partir do fosfato de creatina. Além disso é rapidamente liberada durante um episódio de dano muscular (LADENSON, 2007). Após a degeneração celular, ocasionada pela necrose, ocorre um extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequente aumento de seus níveis séricos, assim, com a diminuição sérica de CK-MB e CK-NAC, pode-se sugerir a proteção dos cardiomiócitos (RAJADURAI; PRINCE, 2006).

Já é bem conhecido o fato do isoproterenol causar uma série de alterações bioquímicas, dentre elas, o aumento dos níveis de CK-NAC e CK-MB, em um período de 24 horas após sua administração, permanecendo no platô por até 72 horas (MOTTA, 2011).

Alguns trabalhos encontrados na literatura demonstram a capacidade de alguns produtos naturais de diminuir os níveis de CK em animais submetidos ao infarto com isoproterenol. O extrato etanólico das folhas da espécie *Callistemon lanceolatus* (Myrtaceae), rico em flavonoides, triterpenoides, taninos e compostos fenólicos, detém de atividade cardioprotetora, por diminuir os níveis plasmáticos de CK-MB, entre outros fatores (FIROZ et al., 2011). Os extratos, aquoso e etanólico, da raiz da espécie *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae), composta quimicamente por ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, promoveram a diminuição de CK (ZHOU et al., 2012). Com uma

composição química diversificada em vários compostos, dentre eles flavonoides e ácidos fenólicos, o extrato aquoso da raiz da espécie *Saussurea lappa* Clarke (compositae) também promove uma diminuição dos níveis séricos de CK (SALEEM et al., 2013).

No presente trabalho pode-se observar que o grupo ISO apresentou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de CK-NAC e CK-MB (gráficos 3A e 3B; página 44) quando comparados ao grupo controle, o que corrobora com os dados obtidos na literatura. Este resultado confirma que houve o desenvolvimento do infarto induzido pela droga simpatomimética, o isoproterenol, validando, desta forma, o modelo experimental. Nos grupos tratados com as diferentes doses do EHAPV, o que pode ser observado é que houve uma diminuição significativa e dependente de dose dos níveis séricos de CK-NAC e CK-MB (Gráficos 3A e 3B; página 44), quando comparados ao grupo ISO, sugerindo desta forma que o EHAPV nas três doses, de alguma maneira interferiu no processo de degeneração celular, protegendo os cardiomiócitos.

AST é uma enzima que catalisa a transferência reversível de um grupo amino entre o aspartato e o glutamato, já ALT é responsável pela transferência de um grupo amino entre a alanina e o glutamato, e assim sendo, as duas se mostram importantes no metabolismo dos aminoácidos. São amplamente encontradas no coração, fígado, músculo esquelético, rins e cérebro (ALDOUS, 2013; NGOZIKA et al., 2012). Já foram consideradas excelentes marcadores de lesões cardíacas, como as que ocorrem na angina, pericardite e no IAM. Atualmente continuam sendo importantes para em conjunto com outros biomarcadores enzimáticos participarem do diagnóstico do infarto, entretanto sozinhas detêm de certa inespecificidade, uma vez que podem estar associadas a traumas no músculo esquelético e a doenças no fígado, por exemplo (LOFTHUS et al., 2012).

Neste estudo, houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de AST (Gráfico 4A; página 46) no grupo ISO, quando comparado ao controle. Também houve uma diferença significativa dos três grupos tratados com as diferentes doses do extrato, ao serem comparados com o controle. Entretanto não foi observada nenhuma diferença dos três grupos do EHAPV, ao serem comparados com o grupo ISO. É importante ressaltar que não houveram diferenças significativas entre os grupos, no que diz respeito aos níveis plasmáticos de ALT (Gráfico 4B; página 46), com exceção



do grupo tratado com o EHAPV na dose de 75 mg/kg, onde houve um aumento significativo quando comparado ao grupo controle. Entretanto, essa diferença não foi observada entre esse grupo e o grupo ISO.

Esse aumento nos níveis de AST nos grupos tratados com o EHAPV nas três doses, e de ALT na dose de 75 mg/kg, pode ser resultado da administração do isoproterenol, uma vez que não houve um aumento ainda maior do que o ocorreu no grupo ISO. Este episódio é corroborado pelo fato do isoproterenol apresentar grande toxicidade hepática e em altas doses ser rapidamente oxidado e convertido a metabólitos, dentre eles, adenocromos e quinonas. Estas são altamente tóxicas, pois promovem ataques eletrofílicos à glutatona, e por meio destes se inicializa uma cascata apoptótica, resultando na liberação na corrente sanguínea (REMIÃO, 2001).

A LDH se mostra responsável por catalisar a oxidação reversível do lactato em piruvato, entretanto, é encontrada em todas as células e assim como as AST e ALT detém de relativa inespecificidade (THYGESSEN; ALPERT; WHITE, 2007). Sabe-se que durante o IAM, o processo isquêmico promove um aumento nos níveis de ácido láctico e uma diminuição no pH intracelular. Com o aumento da concentração intracelular de prótons dar-se início a uma cascata de eventos que resultam na apoptose dos miócitos cardíacos, acarretando em um extravasamento de LDH para o meio extracelular (KOTLYAR et al., 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de LDH (Gráfico 4C; página 46) no grupo ISO, quando comparado ao grupo controle. Além disso, pode-se observar que esse aumento deixou de ocorrer nas três doses do EHAPV, uma vez que em nenhuma das três doses houve diferença significativa desses níveis em relação ao grupo controle. Vale ressaltar também que a dose de 50 mg/kg, foi a mais potente em inibir o aumento gerado pelo isoproterenol, uma vez que se mostrou significativamente diferente do grupo ISO.

De acordo com REMIÃO (2002), a administração de isoproterenol, em altas doses, faz com que haja um aumento nos níveis plasmáticos de triglicérides e de ácidos graxos não esterificados, além de elevação ou manutenção do colesterol total. Os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides (Gráficos 4D e 4E; página 46) encontrados nos soros de todos os grupos não diferiram significativamente entre si,

embora se perceba nitidamente um aumento nos níveis de ambos no grupo ISO, quando comparado ao grupo controle, e uma diminuição com o pré-tratamento com o EHAPV, nas três doses, ao se comparar com o grupo ISO.

Os resultados obtidos através da análise bioquímica, demonstram que o pré-tratamento com o EHAPV nas três doses, foi capaz de manter a integridade a nível cardíaco, uma vez que diminuiu os níveis de CK-NAC e CK-MB, além de não alterar os de AST, ALT, COL e TRI, mesmo após a administração do isoproterenol.

Sabe-se que uma das características do IAM é a formação de áreas de necrose no coração (PANDA; KAR; RAMAMURTHY, 2014). Diante disso, o teste macroscópico colorimétrico que faz utilização de cloreto de trifenetrazólio (TTC) a 1%, para se verificar regiões necróticas no tecido cardíaco, vem sendo bastante utilizado em vários estudos que visam associar uma possível atividade cardioprotetora à determinada substância, seja ela natural ou não (PRABHU et al., 2005).

Este teste se baseia no potencial REDOX do TTC, frente aos fluidos biológicos, fornecendo desta forma a diferenciação entre células viáveis e não viáveis. O que acontece é que em um miocárdio intacto, com presença normal da enzima LDH, o TTC é convertido em um precipitado de 1,3,5-trifenilformazan (TPF), gerando uma coloração avermelhada intensa. Já em miocárdio infartado, com pouca atividade de LDH, conseqüente da perda da integridade da membrana, essa conversão ocorre de forma precária, acarretando no surgimento de áreas esbranquiçadas, amareladas, indicando assim, a existência de áreas necróticas (SHARMA et al., 2001).

Pode ser constatado na literatura, através do teste colorimétrico TTC 1%, que alguns produtos naturais conseguem inibir a formação de áreas necróticas no coração de ratos infartados com o isoproterenol. Mohan et al., (2010), demonstraram que o extrato n-butanólico das sementes da espécie *Punica granatum* L. (Punicaceae), rico em flavonoides e compostos fenólicos, inibiu a formação de regiões necróticas nas secções cardíacas em comparação com o grupo ISO.

Neste trabalho é possível notar que nos seguimentos dos corações do grupo ISO, submetidos ao teste colorimétrico com TTC 1% (Quadro 1; página 47), houve a formação de áreas mais claras, parcialmente amareladas, esbranquiçadas, indicativo de áreas necróticas, diferentemente do observado no grupo controle, onde é bastante visível uma coloração vermelha intensa. Quanto aos grupos tratados com as

diferentes doses do EHAPV, não houve a formação dessas regiões amareladas em nenhuma das doses. Além disso as fotografias desses grupos revelam uma semelhança com a do grupo controle, onde se destaca a coloração vermelha.

No que diz respeito a média de peso corpóreo dos animais que constituíram os grupos (Tabela 1; página 48), obtida por meio de pesagem dos mesmos no início e no término do tratamento crônico, observa-se que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos. Este fato demonstra que o EHAPV não promoveu alterações metabólicas nos animais tratados, tanto no que refere a ganho como à perda de peso.

Algumas pesquisas envolvendo avaliação de atividade cardioprotetora, que vêm sendo realizadas nos últimos anos por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, corroboram técnico-cientificamente com os resultados obtidos neste trabalho. Em algumas delas observa-se a cardioproteção envolvendo diminuição dos biomarcadores enzimáticos (FIROZ et al., 2011; AHMED; UROOJ, 2012), em outras, inibição de áreas necróticas cardíacas (FATHIAZAD et al., 2012; PANDA; KAR; RAMAMURTHY, 2014), e alteração de alguns padrões morfométricos, como da relação peso do coração/peso corpóreo (SINGH et al., 2011).

Em resumo, com este trabalho, pode-se sugerir que o EHAPV apresenta uma potencial atividade cardioprotetora, uma vez que, diminui os níveis de biomarcadores enzimáticos do IAM (CK-NAC e CK-MB), reduz os índices cardíacos relacionados à hipertrofia (espessuras dos ventrículos, peso dos corações úmidos, diferenças de espessuras, aumentos relativos, índice de massa cardíaca) e inibe a formação de áreas necróticas no tecido cardíaco.

Por fim, uma vez que o EHAPV mostra em sua composição química vários flavonoides e ácidos fenólicos, e que alguns destes desempenham uma série de atividades biológicas, dentre elas a cardioprotetora, pode-se sugerir a participação direta dessas substâncias no efeito cardioprotetor do EHAPV.

## **8 CONCLUSÕES**

Neste trabalho foi demonstrado que o EHAPV, ao diminuir os níveis de biomarcadores enzimáticos do infarto, reduzir os índices cardíacos relacionados à hipertrofia e inibir a formação de áreas necróticas no tecido cardíaco, apresentou um potencial efeito cardioprotetor e pode vir a ser utilizado como adjuvante na terapêutica preventiva do infarto agudo do miocárdio.

## REFERÊNCIAS

ADAMEOVA, A.; ABDELLATIF, Y.; DHALLA, N.S. Role of excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, p. 493-514, 2009.

AHMED, F.; UROOJ, A. Cardioprotective activity of standardized extract of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced toxicity. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 4, p. 468-473, 2012.

ALDOUS, S.J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **International journal of cardiology**, v. 164, p. 282-294, 2013.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical and biological activity of a new type of brazilian própolis: red própolis. **Journal of ethnopharmacology**, v.113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALVES, T.R. **Parâmetros químicos, atividades antimicrobiana e antioxidante de uma amostra de própolis de Alagoas**. São Paulo, SP: 2006. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2006.

AMIN, J.K. et al. Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 33, p. 131-139, 2001.

ANTMAN, E. et al. ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. **Journal american college of cardiology**, v. 51, p. 210-247, 2008.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.

BASSAND, J.P. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. **European Heart Journal**, v. 28, p. 1598-1660, 2007.

BOATENG, D.O.S.; SANBORN, M.D.T. Acute myocardial infarction. **Disease a month**, v.59, p.83-96, 2013.

BRAUNWALD E.; ZIPES D.; LIBBY P. **Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine**. 6<sup>a</sup> ed., Philadelphia: W B Saunders; 2001.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 4546-4550, 2013.

CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, XY, p.1-5, 2009.

CASTRO, M.L. et al. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5332-5335, 2009.

CAZAROLLI, L.H. et al. Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1032-1038, 2008.

CHANG, G.J. et al. Electrophysiological and mechanical effects of caffeic acid phenethyl ester, a novel cardioprotective agent with antiarrhythmic activity, in guinea-pig heart. **European journal of pharmacology**, v. 702, p. 194-207, 2013.

CHEN, Q.M. et al. Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy induced by toxicants. **Cardiovascular Toxicology**, v. 1, p. 267-283, 2001.

CHRISTOV, R. et al. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Products Research**, v. 19, p. 673-678, 2005.

COMMUNAL, C. et al. Opposing effects of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. **Circulation**, v. 100, p. 2210-2212, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DA SILVA, V.C. et al. Anthelmintic activity of flavonoids isolated from roots of *Andira anthelmia* (leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 573-576, 2008.

DAVIES, M.J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, p.361-366, 2000.

DE SMET, P.A.G.M. The role of plant derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v.54, p. 801-840, 1997.

DHALLA, N.S. et al. Catecholamine-induced cardiomyopathy. In: Acosta, D (ed.) **Cardiovascular Toxicity**. Raven Press, New York, p. 269-318, 2001.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9635-9643, 2008.

DOLCI, A.; PANTEGHINI, M. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. **Clinica Chimica acta**, v.369, p. 179-187, 2006.

FAROMBI, E. O. African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 662-671, 2003.

FATHIAZAD, F. et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **DARU journal of pharmaceutical sciences**, p. 20-87, 2012.

FIROZ, M. et al. Cardioprotective activity of ethanolic extract of *Callistemon lanceolatus* leaves on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Bangladesh journal of pharmacology**, v. 6, p. 38-45. 2011.

FLORAS, J.S. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. **Journal American of College of Cardiology**, v. 54, n. 5, p. 375-385, 2009.

FROZZA, C.O.D. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FUSTER, V. et al. Hurst's the heart. **Macgraw-hill professional publishing**, 12<sup>a</sup> ed., 2009.

GELEIJNSE, J.M.; HOLLMAN, P.C.H. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms?. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 88, p.12-13, 2008.

GENG, B. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, p. 756-763, 2004

GOLDSTEIN, D.S. Stress, Catecholamines and Cardiovascular Disease. **Oxford University Press**, Oxford, 1995.

HEARSE, D.J. Experimental models for the study of cardiovascular functions and disease. **Pharmacology Research**. V.41. p. 597-603, 2003.

HILL, J.A.; OLSON, E.N. Cardiac plasticity. **New England journal of medicine**, v. 358, n. 13, p. 1370-1380, 2008.

HOFFMAN, B.B. **Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists**. Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York, p. 215-268, 2001.

JUNIOR, W.; FRANCHINI, K. Influência de fatores ambientais e genéticos na hipertrofia e remodelamentos cardíacos na hipertensão arterial. **Revista brasileira de hipertensão**, v. 8, p. 414-424, 2001.

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J.D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, v. 122, n. 25, p. 2727-2735, 2010.

KOTLYAR, A.B. et al. Cardioprotective activity of a novel and potent competitive inhibitor of lactate dehydrogenase. **FEBS letters**, v. 584, p. 159-165, 2010.

LADENSON, J.H. A personal history of markers of myocyte injury [myocardial infarction]. **Clinica Chimica acta**, v. 381, p. 3-8, 2007.

LI, H. et al. Cardioprotective effect of Paeonol and Danshensu combination on isoproterenol-Induced myocardial injury in rats. **Plos one**, v. 7, p. 1-10, 2012.

LI, P. et al. Systems pharmacology strategies for drug discovery and combination with applications to cardiovascular diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, p. 93-107, 2014.



LOFTHUS, D.M. et al. Pattern of liver enzyme elevations in acute ST-elevation myocardial infarction. **Coronary Artery Disease**, v. 23, n. 1, p. 22-30, 2012.

LUSTOSA, S.R. et al. Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MADHESH, M.; VAIYAPURI, M. Luteolin a dietary flavonoid attenuates isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, p. 159-164, 2013.

MANCIA, G.; GRASSI, G. The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation research**, v. 114, p. 1004-1021, 2014.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. **Nutricion Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271- 278, 2002.

MARY, A.F. et al. **Plantas Medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais, 2006.

MATHEW, J. et al. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. **Circulation**, v. 104, p. 1615-1621, 2001.

MC CHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENR, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MOHAN, M. et al. Cardioprotective potential of *Punica granatum* extract in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 1, p. 32-37, 2010.

MOLKENTIN, J.D.; DORN, G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annual Review of Physiology**, v. 63, p. 391-426, 2001.

MORISCO, C. et al.  $\beta$ -Adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the  $\beta_1$ -subtype in the rat heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 33, p. 561-573, 2001.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica**. 2ª ed., 2011.

MOURA, P.R.; VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia medica**, v. 21, p. 31-36, 2011.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 452-456, 2007.

NAHRENDORF, M.; PITTET, M.J.; SWIRSKI, F.K. Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. **Circulation**, v. 121, p. 2437-2445, 2010.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGOZIKA, B.O. et al. Effects of some anti-histamine on erythrocyte aspartate amino transferase and alanine amino transferase activities in Wistar albino rats. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 7, p. 3001-3004, 2012.

NIGAN, P.K. Biochemical markers of myocardial injury. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 10-17, 2007.

NUNES, C.A.; GUERREIRO, M.C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 92, p. 433-438, 2012.

OCARANZA, M.P. et al. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, p. 246-254, 2002.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and calcone from a new type of brazilian própolis. **Separation and purification technology**, v.77, p. 208-213, 2011.

OLIVETTI, G. et al. Recent advances in cardiac hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 68-75, 2000.

PANDA, S.; KAR, A.; RAMAMUTHY, V. Cardioprotective effect of vincristine on isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. **European journal of pharmacology**, v. 723, p. 451-458, 2014.

PARK, K.Y.; ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PARK, Y.K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PATEL, V. et al. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats, a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. **European Journal of Pharmacology**, v. 644, p. 160-168, 2010.

PATEL, D.K. et al. Cardioprotective effect of *Coriandrum sativum* L. on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3120-3125, 2012.

PEARCE, R.M. Experimental myocarditis: a study of the histological changes following intravenous injections of adrenaline. **Journal of Experimental Medicine**, v. 8, p. 400-409, 1906.

PEASTON, R.T.; WEINKOVE, C. Measurement of catecholamines and their metabolites. **Annals of clinical biochemistry**, v. 41, p. 17-38, 2004.

PESARO, A.E.P.; SERRANO, C.V.; NICOLAU, J.C. Infarto agudo do miocárdio-síndrome coronariana aguda com supradesnível do seguimento ST. **Revista da associação médica brasileira**, v. 50, n. 2, p. 214-220, 2004.

PICCINELLI, A.L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PRABHU, S. et al. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 126-133, 2005.

PRINCE, P.S.M. (-) Epicatechin attenuates mitochondrial damage by enhancing mitochondrial multi-marker enzymes, Adenosine triphosphate and lowering calcium in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 409-416, 2013.

PRINCE, P.S.M.; ROY, A.J. p-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. **International journal of cardiology**, v. 168, p. 3259-3266, 2013.

PRINCE, P.S.M.; SATHYA, B. Protective effects of quercetin on mitochondrial oxidative stress in isoproterenol induced myocardial infarcted in rats: *in vivo* and *in vitro* study. **Phytotherapy research**, v. 49, n. 1, p. 233-241, 2012.

PUKALSKAS, A. et al. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. **Food chemistry**, v. 130, p. 695-701, 2012.

QIN, C.; YAP, S.; WOODMAN, O.L. Antioxidants in the prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 2, p. 673-695, 2009.

RAJADURAI, M.; PRINCE, P.S.M. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. **Toxicology**, v. 228, p. 259–268. 2006.

RAHMATHULLA, S.B.; DEVI, K.L. Origination and development of isoproterenol-induced myocardial infarction in male wistar rats. **International research journal of pharmacy**, v. 4, n. 5, p. 26-35, 2013.

REMIÃO, F. et al. Cardiotoxicity studies properties of the oxidation products of catecholamines. Free Radical using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 37, p.1-4, 2001.

REMIÃO, F.M.G. **Cardiotoxicidade do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação: estudos mecanísticos em suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto**. Tese de doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal. 2002.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e domesticação de plantas medicinais**. 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, 5 Ed. Porto Alegre-Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

RIGHI, A.A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-14, 2013.

RONA, G. et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. **Archives of Pathology**, v. 67, p. 443-455, 1959

SABEENA, F.K.H. et al. Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Pharmacology Research**, v. 50, p.231-236, 2004.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALEEM, T.S.M. et al. Aqueous extract of *Saussurea lappa* root ameliorate oxidative myocardial injury induced by isoproterenol in rats. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 4, p. 94-99, 2013.

SARAVANAN, G. et al. Cardioprotective activity of *Amaranthus viridis* Linn: effect on serum marker enzymes, cardiac troponin and antioxidant system in experimental myocardial infarcted rats. **International journal of cardiology**, v. 165, n. 3, p. 494-498, 2013.

SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I. **Natural products isolation**. Methods in biotechnology, v. 20, p. 213-214, 2006.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 83, Suplemento IV, São Paulo, 2004.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). IV Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento ST. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, São Paulo, 2009.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). Diretrizes sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST. **Arquivo brasileiro de cardiologia**, v. 102, São Paulo, 2014.

SHARMA, M. et al. Cardioprotective potential of *ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 225, p. 75-83, 2001.

SILVA, B.B. et al. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of brazilian propolis. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRS. p. 833, 2002a.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRS. p. 15, 2002b.

SIMIONATTO, E. et al. Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. **Journal of the Chilean chemical society**, v. 57, n. 3, p. 1240-1243, 2012.

SINGH, K.B. et al. Isoproterenol-induced cardiomyopathy in rats: influence of *Acorus calamus* Linn. **Cardiovascular toxicology**, v. 11, p. 263-271, 2011.

SZAKACS, J.E.; CANNON, A. L-Norepinephrine myocarditis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 30, p. 425-430, 1958.

TAIMOR, G.; SCHLUTER, K.D.; PIPER, H.M. Hypertrophy-associated gene induction after beta-adrenergic stimulation in adult cardiomyocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 33, p. 503-511, 2001.

THOMES, P. et al. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Phytomedicine*, v. 18, n. 1, p. 52-57, 2010.

THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; WHITE, H.D. Universal definition of myocardial infarction. **Circulation**, v. 116, n. 22, p. 2634-2653, 2007.

THYGESEN, K. et al. Third universal definition of myocardial infarction. **Journal of the American college of cardiology**, v. 60, p. 4-5, 2012.

TIWARI, R. et al. Cardioprotective potential of Myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. **Phytotherapy research**, v. 23, p. 1361-1366, 2009.

TRIPOSKIADES, F. et al. The sympathetic nervous system in heart failure. Physiology, pathophysiology, and clinical implications. **Journal of American College of Cardiology**, v. 54, p. 1747-1762, 2009.

VAKILI, B.A.; OKIN, P.M.; DEVEREUX, R.B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. **American Heart Journal**, v. 141, p. 334-341, 2001.

WERNER, P.R.; BOLSON, L.; BATTISTI, M.K.B. Morfometria cardíaca para o diagnóstico de cardiopatias em cães. **Arquivos da ciência veterinária e zoologia da universidade paranaense**, v. 4, n. 2, p. 181-188, 2001.

WHITE, D.H.; CHEW, P.D. Acute myocardial infarction. **Lancet**, v. 372, p. 570-584, 2008.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p.838-849, 2004.

WRIGHT, S. et al. ACCF/AHA focused update of the guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline). A report of the American college of cardiology foundation/ american heart association task force on practice of guidelines. **Circulation**, v. 123, p. 2022-2060, 2011.

YANG, S.Z. et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food chemistry**, v. 127, p. 210-215, 2011.

YOGEEETA, S.K. et al. Synergistic interactions of Ferulic acid with Ascorbic acid: Its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 283, p. 139-146, 2006.

YOUSEFI, K. et al. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Marrubium vulgare* L. on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. **Indian journal of experimental biology**, v. 51, p. 653-660, 2013.

ZHANG, S. et al. Cardioprotective Effect of Sulphonated Formononetin on Acute Myocardial Infarction in Rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 108, p. 390-395, 2011.

ZHOU, R. et al. Cardioprotective effect of water and ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* in an experimental model of myocardial infarction. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, p. 440-446, 2012.

ZIEGLER, K. Über die wirkung intravenöser adrenalin injection auf das gefasssystem und ihre beziehungen zur arterisclerose. **Beitraege Zur Pathologischen Anatomie Und Zur Allgemeinen Pathologie**, v. 38, p. 229-254, 1905.