



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

MARAÍSA BEZERRA DE JESUS FEITOSA

EFEITOS CONTRÁTEIS, ELÉTRICOS E ANTIOXIDANTES
DE *Canavalia rosea* NO MIOCÁRDIO DE RATO E SEU
PAPEL NA PREVENÇÃO DOS DANOS DECORRENTES DA
LESÃO PROVOCADA PELA REPERFUSÃO TISSULAR.

ARACAJU

2014

MARAÍSA BEZERRA DE JESUS FEITOSA

**EFEITOS CONTRÁTEIS, ELÉTRICOS E ANTIOXIDANTES
DE *Canavalia rosea* NO MIOCÁRDIO DE RATO E SEU PAPEL
NA PREVENÇÃO DOS DANOS DECORRENTES DA LESÃO
PROVOCADA PELA REPERFUSÃO TISSULAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Lauton-Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

ARACAJU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

F311e Feitosa, Maráisa Bezerra de Jesus
Efeitos contráteis, elétricos e antioxidantes de *Canavalia rosea* no miocárdio de rato e seu papel na prevenção dos danos decorrentes da lesão provocada pela reperfusão tissular / Maráisa Bezerra de Jesus Feitosa, orientadora, Sandra Lauton Santos, co-orientadora Carla Maria Lins de Vasconcelos. -- Aracaju, 2014.
000 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Núcleo de pós-Graduação em Medicina, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. *Canavalia rósea* (Fabaceae). 2. Antioxidantes 3. Reperfusão miocárdica. 4. Miocárdio - Doenças. 5. Experiência com animais 6. Plantas medicinais. I. Santos, Sandra Lauton, orient., II. Vasconcelos, Carla Maria Lins de, co-orient. III. Título.

CDU 582.736.3:616.127-005.4

À minha mãe pelo amor incondicional e ao meu esposo pela constante presença em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

“Você não sabe o quanto eu caminhei pra chegar até aqui, percorri milhas e milhas antes de dormir, eu não cochilei...”. A estrada tem sido longa, mas com a ajuda de todos continuo em frente. Esta conquista que hoje celebro se deve a participação de muitos “anjos da guarda” enviados por DEUS para me ajudar nas batalhas da vida.

Mas, antes de tudo AGRADEÇO a ELE, meu DEUS, que sendo meu Mestre sempre quis ser meu AMIGO e, como tal, fez da minha vida uma verdadeira benção.

Agradeço à minha MÃE, MAISA, que sempre me ajuda e apesar da aparente distância deste ano se fez presente em todas as minhas conquistas.

Agradeço à minha vó D.TEREZINHA e a minha tia CEÇA, que mesmo sem saberem direito o que pesquiso, ficam na torcida pela minha vitória. Enfim, agradeço a meus irmãos, meus amores, e a familiares. Obrigada.

Agradeço ao meu esposo DIEGO que é muito mais do que meu marido, é meu companheiro e cúmplice, que me deu coragem e esperança quando achei que não ia dar sempre me ajudando nos meus experimentos. AMO-TE.

Agradeço aos amigos dos LBC, em especial a Thássio, Lucas e Grace, pela contribuição e pelo carinho.

Agradeço ao Prof. André Barreiros por me ajudar nos procedimentos e por me indicar a planta que gerou este trabalho.

Agradeço à Prof.^a Carla Maria por me ajudar em todo este processo.

Agradeço principalmente à Prof.^a Sandra Lauton, que abriu as portas a uma desconhecida, e me deu a chance de realizar um antigo sonho. Muito Obrigada!

Agradeço a UFS e ao NPGME pela oportunidade.

Agradeço a todos, aos que passaram, aos que se foram e aos que ficaram em minha vida e que contribuíram para este momento.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

Martin Luther King

RESUMO

EFEITOS CONTRÁTEIS, ELÉTRICOS E ANTIOXIDANTES DE *Canavalia rosea* NO MIOCÁRDIO DE RATO E SEU PAPEL NA PREVENÇÃO DOS DANOS DECORRENTES DA LESÃO PROVOCADA PELA REPERFUSÃO TISSULAR. Maraísa Bezerra de Jesus Feitosa, Aracaju, 2014.

Os produtos derivados de plantas têm sido vastamente estudados para prevenção, cura e tratamento de doenças. Sustâncias neles presentes e que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse para a minimização da injúria cardíaca que pode ser provocada pela reperfusão deste tecido. A injúria de reperfusão cardíaca é um fenômeno fisiopatológico ocorrendo nas síndromes coronarianas, nas cirurgias cardiovasculares e nas angioplastias, podendo gerar lesões no tecido cardíaco. Neste contexto, é importante avaliar os efeitos biológicos de derivados de plantas, avaliando o seu potencial antioxidante útil na proteção do tecido cardíaco e na prevenção dos danos causados por diversas doenças cardíacas. Uma fração de acetato de etila (FAE) foi obtida do extrato bruto das folhas de *Canavalia rosea*. A FAE foi submetida à prospecção fitoquímica tendo sido nela identificados compostos antioxidantes. A avaliação quantitativa da atividade antioxidante desta fração foi realizada estudando sua capacidade de sequestrar o radical livre DPPH[•]. Foi observado que ela promoveu uma redução significativa deste radical ($p < 0,001$), apresentando uma inibição na produção deste radical de $46,7 \pm 3,5$ % com uma CE_{50} de $20,9 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$. O Índice de Atividade Antioxidante (IAA) apresentado pela fração foi de 1,42, considerado forte, dentro da escala proposta por Soler-Rivas *et al.*, (2000) e Argolo *et al.*, (2004). A lipoperoxidação *in vitro* foi induzida pelo sulfato ferroso. Nas diferentes concentrações testadas, a FAE reduziu significativamente a lipoperoxidação induzida por esta substância. Foram também avaliados os efeitos contráteis e elétricos da FAE (300 $\mu\text{g/mL}$) em coração isolado de ratos montado em sistema de perfusão aórtica do tipo Langendorff. A FAE alterou de forma significativa o perfil eletrocardiográfico, aumentando a duração do intervalo PR (PRi) (de 78,48 para 104,7, $n = 5$, $p < 0,05$), do intervalo QT (QTi) (de 30,41 para 41,03, $n = 5$, $p < 0,05$) e do complexo QRS (de 17,36 para 25,19, $n = 5$, $p < 0,05$) e reduzindo a frequência cardíaca (de 128,5 para 87,82, $n = 5$, $p < 0,05$). Na avaliação dos efeitos contráteis, a fração diminuiu a pressão intraventricular esquerda (PVE) (de 1,682 para 1,173, $n = 5$, $p < 0,05$), bem como a velocidade máxima de contração. O efeito cardioprotetor da FAE foi testado avaliando seu potencial para limitar a injúria tissular provocada pela reperfusão. Para isto, foram empregados métodos enzimáticos a fim de avaliar o estresse oxidativo e também sua ação sobre a atividade contrátil do tecido. Os resultados mostraram que a FAE reduziu significativamente a dP/dt máxima tanto na contração quanto no relaxamento. Ainda mais, ela aumentou o tempo de diástole e a PVE. Na reperfusão pós-isquemia, houve melhora significativa da frequência cardíaca e diminuição do Índice de Severidade da Arritmia (ISA). A avaliação dos efeitos antioxidantes foi feita através da medida da TBARS e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e redutase (GR). Foi observado que a peroxidação lipídica foi significativamente menor nos corações perfundidos previamente com a FAE e depois submetidos à isquemia e à reperfusão do que quando comparados com o grupo perfundido somente com o veículo (animais controle). As atividades da SOD, GPx e GR foram significativamente maiores nos corações perfundidos previamente com a FAE, porém a atividade da CAT foi menor neste grupo. Ao analisarmos a concentração do marcador CK observamos que a mesma apresentou-se menor no grupo perfundido previamente com FAE. Com este conjunto de resultados concluímos que a FAE melhora a função cardíaca pós-isquêmica. Isto pode ter decorrido da habilidade que os flavonoides têm de sequestrar radicais

livres e/ou da habilidade da FAE em induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes nos corações submetidos à injúria decorrente da reperfusão do tecido cardíaco.

Palavras chave: isquemia miocárdica, reperfusão miocárdica, *Canavalia rosea*, antioxidantes.

ABSTRACT

CONTRACTILE, ELECTRICAL, AND ANTIOXIDANT EFFECTS PRODUCED BY *Canavalia rosea* ON THE RAT MYOCARDIUM AND EVALUATION OF ITS ROLE PREVENTING INJURIES CAUSED BY REPERFUSION OF THE CARDIAC TISSUE.

Maraísa Bezerra de Jesus Feitosa, Aracaju, 2014

Plant-derived products have been widely studied for prevention and treatment of several diseases. Substances present in them showing antioxidant activities are of great interest because they are able to minimize cardiac injury associated to reperfusion of ischemic tissues. The cardiac reperfusion injury is a physiopathological phenomenon that can occur in coronary syndromes, during cardiovascular surgery and during angioplasty generating heart tissue lesions. In this context, it becomes important to evaluate the biological effects promoted by plant extracts looking for understand their potential for antioxidant protection in order to prevent cardiac tissue damage. Ethyl acetate fraction (FAE) was obtained from the crude extract of *Canavalia rosea* leaf. FAE was subjected to a phytochemical screening and some antioxidants molecules were identified. Quantitative evaluation of the antioxidant activity and the ability of FAE to scavenge DPPH[•] radicals was performed. It was found that FAE caused a significant reduction in the amount of this radical ($p < 0.001$), inhibiting its production in $46.7 \pm 3.5\%$ with a EC_{50} of $20.9 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. The index of antioxidant activity (IAA) associated to this fraction was 1.42, considered high (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Argolo *et al.*, 2004). The *in vitro* lipid peroxidation was induced by ferrous sulfate. Different concentrations of FAE reduced the lipid peroxidation induced by this substance. We also have evaluate the electrical and contractile effects of FAE (300 $\mu\text{g/mL}$) in isolated hearts of rats mounted in Langendorff aortic perfusion system. FAE changed significantly, the electrocardiographic profile, increasing the duration of the following intervals: PRi (from 78.48 to 104.7, $n = 5$, $p < 0.05$), QT_i (from 30.41 to 41.03, $n = 5$, $p < 0.05$) as well as the QRS complex (from 17.36 to 25.19, $n = 5$, $p < 0.05$). Furthermore, it reduced the heart rate (from 128.5 to 87.8, $n = 5$, $p < 0.05$). Studing its contractile effects, we have observed that this fraction promoted reduction of the left intraventricular pressure (PVE) (from 1.68 to 1.17, $n = 5$, $p < 0.05$) as the contraction speed. Cardioprotective effect of FAE was evaluated by testing its skill to reduce the myocardial injury promoted by reperfusion of the heart tissue. To do that, we have employed enzymatic methods in order to evaluate the oxidative stress and also its action on the tissue contractile activity. Our results showed that the FAE reduced dP/dt maximum measured during systole and diastole. Conversely, it increased the diastolic time and also the PVE. During reperfusion after ischemia FAE significantly improved the heart rate decreasing the Index of Severity of Arrhythmia (ISA). The evaluation of antioxidant effects was performed by TBARS measurements as well as studying the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and reductase (GR) activities. It was observed that lipid peroxidation was significantly lowered in hearts previously perfused with FAE, and subjected to protocols of ischemia-reperfusion, when compared with the animal group only infused with the vehicle (control animals). The activities of SOD, GPx and GR was significantly higher in hearts previously perfused with FAE, but CAT activity was lower. Looking at CK we observe that this index was lower in previously perfused by the FAE. With this set of results we can conclude that the FAE improves post-ischemic cardiac function. This may be due to the ability of flavonoids scavengers radicals and/or ability on the FAE induces increased activity of antioxidant enzymes in hearts subjected the injuries resulting from the cardiac reperfusion.

Key words: myocardial ischemic, myocardial reperfusion, *Canavalia rosea*, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Decursos temporais do potencial de ação do potencial atrial e ventricular e do traçado da atividade elétrica cardíaca do coração..	24
Figura 2 - Via metabólica para a produção de radicais livres do oxigênio (RLO) durante a reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase (adaptado de Granger <i>et al.</i> , citado por Campos e Yoshida, 2004).	29
Figura 3 - Esquema da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN)..	31
Figura 4 – a) Reação de Fenton e b) Reação de Haber Weiss	32
Figura 5 - Flor de <i>C. rosea</i> .	35
Figura 6 - Vagem e folhas de <i>C. rosea</i> .	35
Figura 7 - Preparação do extrato	40
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo	46
Figura 9 - Representação esquemática do sistema do tipo Langendorff usado para a perfusão retrógrada do coração isolado.	47
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental de isquemia-reperfusão.	49
Figura 11 - Curva DPPH*	55
Figura 12 - Efeito da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE) sobre a lipoperoxidação induzida por FeSO ₄ .	56
Figura 13 - Efeito do NAC sobre a lipoperoxidação induzida por FeSO ₄ .	57
Figura 14- Parâmetros eletrocardiográficos avaliados antes (Veículo), durante (FAE) e depois (Wash) da perfusão da fração acetato de etila (FAE - 300 µg/mL) obtida da <i>C. rosea</i> em coração isolado de rato.	58
Figura 15 - Traçados representativos mostrando a pressão ventricular esquerda (PVE) (A) e análise dos registros experimentais (B) obtidos em coração de rato isolado estimulado eletricamente.	59
Figura 16 - Efeitos da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE) sobre a atividade elétrica e frequência cardíaca em coração isolado de rato.	60
Figura 17 - Pressão ventricular esquerda (PVE) medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE) e submetido à isquemia e reperfusão	61
Figura 18 - Efeito sobre o incremento máximo na pressão ventricular (dP/dT máxima) desenvolvida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL) e submetido à isquemia e reperfusão.	62
Figura 19 - Efeito sobre o decremento máximo na pressão ventricular (dP/dT mínima) desenvolvida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL) e submetido à isquemia e reperfusão.	62
Figura 20 - Efeito sobre os batimentos cardíacos desenvolvido em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila <i>C. rosea</i> (FAE– 300 µg/mL) de, e submetido à isquemia e reperfusão.	63

Figura 21 - Índice de Severidade de Arritmia (ISA) em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão..	64
Figura 22 - Avaliação da peroxidação medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão..	65
Figura 23 - Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão.....	66
Figura 24 - Avaliação da atividade da glutatona peroxidase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão.....	67
Figura 25 - Avaliação da atividade da glutatona redutase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão.....	67
Figura 26- Avaliação da atividade catalase em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão.	68
Figura 27 - Avaliação da atividade da creatina quinase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de Ativação do Coração e o ECG.	25
Tabela 2 - Classificação taxonômica da <i>C. rosea</i>	35
Tabela 3 - Atividade antioxidante da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE) determinada pela redução do radical livre DPPH [•]	41
Tabela 4 – Prospecção fitoquímica da fração acetato de etila da <i>C. rosea</i> (FAE)	54
Tabela 5 - Atividade antioxidante da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> (FAE) determinada pela redução do radical livre DPPH [•]	56

SIGLAS E ABREVIACÕES

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

BAV – bloqueio atrioventricular

BHT – butil hidroxi tolueno

Ca⁺² tipo-L – canal para cálcio do tipo-L

Ca⁺² tipo-T – canal para cálcio do tipo-T

Camundongos BALB/c – camundongos albinos e dotados de genótipo A/A Tyrp1b/Tyrp1b Tyrc/Tyrc

CAT – catalase

CE₅₀ – concentração da fração capaz de promover 50% do seu efeito máximo

CEPA – comitê de ética em pesquisa animal

CK – creatina quinase

Con A – lecitina retirada de sementes de *Canavalia ensiformis*

Con Br – lecitina retirada de sementes de *Canavalia brasiliensis*

Con M – lecitina retirada de sementes de *Canavalia maritima*

CONCEA – conselho NACIONAL de controle de experimentação animal

DATASUS – banco de dados do Sistema Único de Saúde

DDL – despolarização diastólica lenta

DMSO – dimetilsulfóxido

dP/dt – derivada de variação de pressão no tempo

DPPH* – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DTPA – ácido dietileno triamino pentacético

ECG – eletrocardiograma

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Emai RX10 – cardioscópio

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

FAE – fração acetato de etila de *C. rosea*

GPx – glutathiona peroxidase

GSH – glutathiona reduzida

GR – glutathiona redutase

GSSH – glutathiona oxidada

I/R – isquemia/reperfusão

IAA – índice de atividade antioxidante

IAM – infarto agudo do miocárdio

I_f – corrente de sódio tipo “funny”, que é ativada durante a hiperpolarização da membrana celular

ISA – índice de severidade de arritmia

K-R – Solução tampão de Krebs-Ringer

MTT – sal de tetrazolium

Na⁺/Ca⁺² – trocador sódio-cálcio

Na⁺/K⁺ ATPase – bomba de sódio e potássio

NAC – N-acetil-L-cisteína

NAV – nódulo atrioventricular

NS – nódulo sinusal

NSA – nódulo sinoatrial

OMS – organização mundial de saúde

PAF – fator de agregação plaquetária

PBS – tampão fosfato-salino

PI – percentual de inibição

PTPm – poro de transição de permeabilidade mitocondrial

PVE – pressão intraventricular esquerda

RLO – radical livre do oxigênio

Sham – grupo que não sofreu nenhuma manobra isquêmica

SOD – superóxido dismutase

STENT – endoprótese expansível

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UIE – unidade isoladora de estímulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO _____	19
2	REVISÃO DA LITERATURA _____	23
2.1	CORAÇÃO _____	23
2.2	PROCESSO ISQUÊMICO _____	26
2.3	PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES NO PROCESSO ISQUÊMICO _____	28
2.4.	<i>Canavalia rosea</i> (Sw.) DC. _____	34
3	OBJETIVOS _____	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS _____	39
4.1	Material botânico _____	39
4.2	Preparação da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> _____	39
4.3	Avaliação in vitro da atividade antioxidante da FAE _____	40
4.4	Avaliação dos efeitos da FAE sob a injúria de reperfusão em coração isolado de rato _____	47
4.5	Tratamento estatístico dos dados _____	52
5	RESULTADOS _____	54
5.1	Preparação da fração acetato de etila de <i>C. rosea</i> _____	54
5.2	Prospecção Fitoquímica _____	54
5.3	Atividade antioxidante in vitro da FAE _____	55
5.4	Efeitos eletrocardiográficos da FAE em coração isolado _____	57
5.5	Efeitos contráteis da FAE em coração isolado _____	58
5.6	Efeitos cronotrópicos da FAE em coração isolado _____	59
5.7	Efeitos da FAE sob a injúria de reperfusão em coração isolado _____	60
	5.7.1 Pressão Ventricular Esquerda _____	60
	5.7.4 Índice de Severidade de Arritmia (ISA) _____	64

5.8	Efeito da FAE sobre a atividade de enzimas antioxidantes após o processo de isquemia.	65
6	DISCUSSÃO	70
7	RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

A isquemia é a falta ou interrupção de suprimento sanguíneo para um tecido orgânico devido à obstrução da vasculatura. Como o sangue, por meio das hemácias, leva o oxigênio às células, a isquemia dá origem à hipóxia e contribui para a fisiopatologia de condições como, por exemplo, infarto do miocárdio, insuficiência vascular periférica e choque hipovolêmico (SILVA JR *et al.*, 2002). O infarto agudo do miocárdio (IAM) é, portanto, definido como foco de necrose resultante desta baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca (ZORNOFF *et al.*, 2009).

O retorno precoce deste fluxo, denominado reperfusão, pode prevenir a lesão miocárdica por isquemia e reduzir o tamanho do infarto, sendo este um objetivo terapêutico (MINAMINO, 2012; HALLÉN, 2012). Porém, as doenças isquêmicas do coração, ainda acarretam um alto índice de mortalidade e insuficiência cardíaca (MINAMINO, 2012; SILVA JR, 2006; SILVA *et al.*, 2002; SZABO *et al.*, 1996; AALTO e RAIVIO, 1993; ZHANG *et al.*, 1994).

Estima-se, em todo o mundo, que a síndrome de isquemia-reperfusão possa ocorrer em proporções epidêmicas. Poucas patologias tiveram sua evolução alterada de maneira tão significativa como o IAM. Ocorreu, na população mundial, redução acentuada da mortalidade em consequência da evolução dos tratamentos nos últimos 30 anos (ZORNOFF *et al.*, 2009).

Porém, no Brasil, segundo o órgão brasileiro DATASUS (2012), estes dados estão na direção inversa. Somente no mês de julho de 2012, 896 pessoas morreram em hospitais vítimas do IAM. Seguindo a evolução desta análise, o número de internações por infarto nos hospitais públicos aumentou, passando de 40.143 em 2000 para 68.538 em 2009, um crescimento de 70%. O número de mortes em todo o país acompanhou esse aumento, mas foi bem menor, subiu de 59.297 em 2000 para 74.538 óbitos em 2008. Já em 2011, as declarações de óbitos chegaram a 82.771, a região nordeste é a segunda maior contribuidora em números de casos anuais, 22.271, ficando atrás somente da região sudeste, com 38.664.

No país, a oclusão coronária por um trombo é a principal causa de IAM. A recanalização precoce da artéria responsável pelo infarto limita a necrose miocárdica e reduz a mortalidade nesses pacientes (AVEZUM *et al.*, 2004). Embora a reperfusão possa viabilizar o miocárdio após isquemia, é também responsável por aumentar o dano tecidual, gerando arritmias, disfunção mecânica no transiente do coração ou "atordoamento do miocárdio" e lesão

microvascular, bem como respostas inflamatórias e danos mitocondriais, todos esses fatores são conhecidos como lesão de reperfusão. Na reperfusão, a morte celular pode ocorrer devido a apoptose, necrose e autofagia (PERRELLI *et al.*, 2011).

Segundo Sahná *et al.*, (2002), existem dois fatores desencadeantes envolvidos na lesão de reperfusão: os radicais livres derivados do oxigênio e a sobrecarga de cálcio (Ca^{2+}) citosólico, em ambos os casos, a participação das mitocôndrias é fundamental.

As mitocôndrias desempenham papéis cruciais dentre os quais, estão àqueles relacionados ao metabolismo energético da célula, ou ainda, no disparo de sinalização que culmina na morte celular. Em miócitos cardíacos saudáveis, sua função primária é o fornecimento de ATP, através da fosforilação oxidativa, para atender a alta demanda energética do coração (HALESTRAP *et al.*, 2004). Neste processo, ocorre normalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e seu controle é promovido por antioxidantes endógenos, de forma equilibrada. As mitocôndrias também estão envolvidas na homeostase celular de íons, incluindo a do Ca^{2+} (PERRELLI *et al.*, 2011).

A perda da viabilidade e função dos cardiomiócitos gerada pela reperfusão ocorre, principalmente, devido à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPm). Por estes poros pode ocorrer a liberação de ERO, como também, de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c. As concentrações citosólicas elevadas de Ca^{2+} também contribuem para os danos celulares, por meio da alteração na permeabilidade do PTPm, como também, ativando enzimas, tais como nucleases, fosfolipases e proteases, podendo culminar na perda da integridade da membrana e/ou morte celular (PERRELLI *et al.*, 2011; CAMARA *et al.*, 2011; HALESTRAP *et al.*, 2004).

Portanto, novas perspectivas de intervenções farmacológicas que possam proteger contra a lesão de reperfusão estão sendo buscadas. Dentro desta abordagem, vem ganhando destaque aquelas que possam inibir a abertura do PTPm e/ou promover o fechamento deste, seja direta ou indiretamente (HALESTRAP *et al.*, 2004). Além desta, outras que atuem na sinalização de ERO e Ca^{2+} , ou tenham ação antioxidante (PERRELLI *et al.*, 2011) também são promissoras.

Neste contexto, vários estudos tem demonstrado benefícios da utilização de antioxidantes derivados de produtos naturais como limitadores da lesão promovida pela injúria de reperfusão (SUN *et al.*, 2002; MILLER, 1998), em virtude do estresse oxidativo gerado neste evento.

As ERO são altamente lesivas e incluem os radicais livres (RL) que contenham um ou mais elétrons desemparelhados, como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e os não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MADAMANCHI *et al.*, 2013). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^{\cdot}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990).

O OH^{\cdot} e peroxinitrito ($ONOO^-$ - derivado da reação do óxido nítrico com o $O_2^{\cdot-}$), são moléculas reativas e modificam fosfolipídios e proteínas que levam à peroxidação lipídica e oxidação dos grupos tiois, respectivamente, além da nitração de alguns resíduos proteicos. Essas modificações podem alterar tanto a permeabilidade da membrana quanto a sua estrutura, além de produzir modificação funcional de várias proteínas celulares e bombas, como por exemplo, a atividade da Na^+/K^+ ATPase, e a dinâmica do transporte do Ca^{2+} , diminuindo seu efluxo e aumentando o influxo deste íon (DHALLA *et al.*, 2000).

Os antioxidantes são reconhecidos por protegerem as células, reduzindo a formação e favorecendo a eliminação dos radicais livres, convertendo-os em moléculas menos reativas, ou mesmo neutralizando-os, e, assim, interrompendo as reações em cadeia dos radicais (VALKO *et al.*, 2007). A atividade antioxidante encontrada em diversas frutas, verduras, legumes e outras plantas se devem ao efeito combinado de vários compostos bioativos, como por exemplo, polifenóis, vitamina C, vitamina E, carotenoides (SASIPRIYA *et al.*, 2012; BLOMHOFF *et al.*, 2005) e flavonoides (KURIAN *et al.*, 2010).

Sendo sequestradores de radicais livres, estes antioxidantes podem exibir efeitos cardioprotetores em modelos experimentais, como o de isquemia-reperfusão. Apesar da existência de antioxidantes sintéticos, há um interesse crescente em antioxidantes naturais, devido aos possíveis efeitos cancerígenos encontrados nos sintéticos (KURIAN *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado a eficácia de plantas como um agente fitoterápico em doenças isquêmicas do coração além de excelentes candidatos contra o estresse oxidativo em condições associadas (WANG *et al.*, 2011). Dentre elas está a *Canavalia rosea* (Sw.) DC., também conhecida como *Canavalia maritima* Thouars (KITAJIMA *et al.*, 2008).

Segundo COSTA *et al.*, (2010), as folhas de *C. rosea*, conhecida como feijão-de-praia, quando fumada, supostamente podem agir como substituto do tabaco, e maconha, segundo PATTAMADILOK *et al.*, (2008). Estudos com as partes aéreas desta planta revelaram a presença do alcalóide guanidínico canarosina, além de esteróides e do flavonoide rutina

(PATTAMADILOK *et al.*, 2008). Um potencial antioxidante significativo foi visto *in vitro*, através do DPPH^{*}, sendo descrito por Niveditha *et al.*, (2012), e Costa *et al.*, (2010).

Além disto, foi investigado por Assreuy *et al.*, (2009), que a lecitina encontrada em *C. rosea* (Con M) induzia edema de curta duração, osmótico, em pata em ratos, com aumento discreto na permeabilidade vascular. Mostrou também que a Con M foi capaz de estimular a produção e liberação de óxido nítrico (NO) e este provocou o relaxamento em aorta.

Estas características apresentadas pela *C. rosea*, tais como o potencial antioxidante e aumento da produção de NO, verificado pelo seu efeito vasorelaxante (ASSREUY *et al.*, 2009), fazem desta planta uma potencial candidata na prevenção ou tratamento de danos e patologias cardíacas causadas por estresse oxidativo. Embora várias manobras venham sendo utilizadas, na clínica, para contornar ou prevenir a lesão de reperfusão, nenhuma delas apresentam um efeito satisfatório. No intuito de descrever substâncias alternativas para prevenir a lesão de reperfusão, a importância deste estudo reside. Desta forma, buscaremos comprovar o efeito antioxidante da fração acetato de etila de *C. rosea*, bem como, avaliaremos a sua utilização como agente cardioprotetor na injúria de isquemia e reperfusão cardíaca.

A busca por substâncias que possam garantir uma melhor recuperação dos pacientes que sofreram isquemia seja por procedimentos cirúrgicos ou por IAM é de extrema importância. Uma vez que os métodos atuais de intervenção geram recuperação parcial, a qual pode ser melhorada com a utilização de substâncias com ação antioxidante, preservando, assim, o tecido cardíaco dos danos gerados pelo estresse oxidativo. Neste contexto, a *Canavalia rosea*, devido aos componentes, pode ser um potencial antioxidante a ser testado, pois estudos mostram efeitos biológicos importantes e requeridos para o tratamento de patologias derivadas do estresse oxidativo, como a lesão de reperfusão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CORAÇÃO

O funcionamento do coração garante a chegada de suprimento sanguíneo, transportando nutrientes, moléculas sinalizadoras e oxigênio a todas as células do organismo e, ainda, removendo catabólitos gerados pelo metabolismo celular.

Para isto, o coração funciona como duas bombas distintas, uma, que bombeia o sangue pelos pulmões, e outra, que bombeia o sangue pelos órgãos periféricos. Cada uma dessas câmaras é composta de um átrio e um ventrículo. O átrio funciona principalmente como reservatório de sangue e como via de entrada para o ventrículo, mas, também, bombeia fracamente para ajudar a levar o sangue até o ventrículo. O ventrículo, por sua vez, é a principal fonte da força que impulsiona o sangue pela circulação pulmonar ou pela periférica (LAGE e RAMIRES, 2001).

O músculo cardíaco é estriado e denominado miocárdio. As células que o constituem, denominadas cardiomiócitos, apresentam sarcômeros, os quais comportam uma rede organizada de proteínas, cuja dinâmica de interação proporciona a mudança estrutural promovendo, desta forma, a contração celular (COSTANZO, 2007).

Para garantir o ritmo cardíaco, a disponibilidade do suprimento sanguíneo, e assim, a manutenção da viabilidade das células que compõe o organismo, existe no coração, um pequeno número de células cardíacas, células autorritmicas, têm a capacidade de gerar o seu próprio potencial de ação, e esse sinal é transmitido em cadeia por todo o coração, fazendo contrair o tecido muscular cardíaco (GUYTON, 2006).

As células autorritmicas estão situadas em nodos e feixes, em zonas bem definidas do coração, e são chamados de nó sinoatrial (NSA), nó atrioventricular (NAV), feixes de His e fibras de Purkinje.

A atividade elétrica cardíaca é governada por uma variedade de correntes iônicas que dirige tanto a contração, durante a sístole, quanto o repouso, durante a diástole (AZEVEDO, 1999). Quando uma excitação adequada chega a uma célula, surge então

uma resposta característica conhecida como potencial de ação (GARCIA, 2002). Sabe-se que durante o potencial de ação cardíaco, cada um dos fenômenos elétricos de alteração ou manutenção do potencial de membrana é ocasionado por correntes iônicas direcionadas de sódio, cálcio, cloreto e potássio (Figura 1).

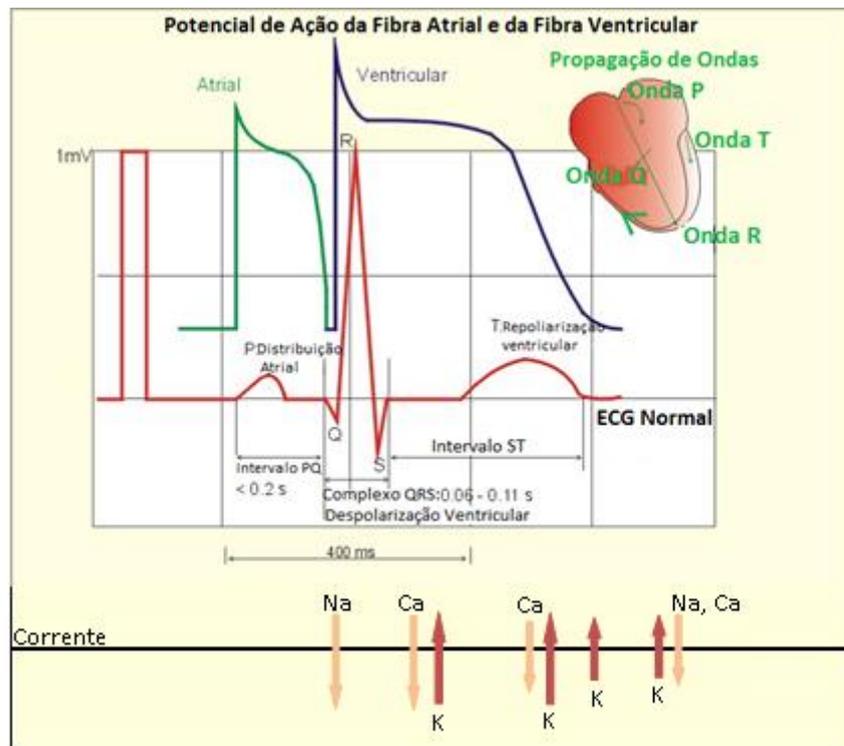


Figura 1 - Decursos temporais do potencial de ação do potencial atrial e ventricular e do traçado da atividade elétrica cardíaca do coração. Fonte: Imagem adaptada retirada de <http://www.zuniv.net/physiology/book/content.htm>. Na: sódio, Ca: cálcio, K: potássio, mV: milivolts, s: segundos, ms: milissegundos, ECG: eletrocardiograma.

Os impulsos gerados pelo NSA caminham pelo coração pelos feixes internodais, atinge o NAV e através do feixe de His permite uma rápida ativação elétrica de todo o miocárdio. Após atingir o NAV o impulso sofre um retardo fisiológico na condução para só então alcançar o feixe. Este impulso gerado pelo NSA, no eletrocardiograma (ECG) corresponde à onda P e a ativação ventricular corresponde ao complexo QRS (LAGE e RAMIRES, 2001). Portanto, o ECG é o registro da sequência de ativação elétrica do coração (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência de Ativação do Coração e o ECG. Adaptada de LAGE e RAMIRES, 2001.

Sequência de Ativação do Coração		Correspondência eletrocardiográfica
Ativação atrial	1. Ativação atrial direita	Onda P (primeira porção)
	2. Ativação atrial esquerda	Onda P (segunda porção)
NAV-His		Intervalo PR
Ativação ventricular	1. Ativação septal	Onda Q
	2. Ativação das paredes livres	Onda R
	3. Ativação das porções basais	Onda S
Recuperação Ventricular		Onda T

O platô que se observa durante o potencial de ação é ocasionado tanto pela entrada de íons cálcio para o interior da célula cardíaca, quanto pela cinética particular apresentada pelos diversos canais para potássio voltagem-dependentes presentes nestas células, que são, em diversos casos, de ativação lenta, muitas vezes não se abrindo até o fim do platô. Isso retarda o retorno do potencial de membrana a seu valor de repouso. Mas, então, essa abertura dos canais de potássio, ao mesmo tempo em que os canais para cálcio começam a se fechar, provoca o retorno rápido do potencial de ação, de seu valor do platô até o valor negativo de repouso, explicando a deflexão descendente rápida ao término do potencial de ação (GUYTON, 2006; BERS, 2002).

Traumas mecânicos, processos infecciosos ou injúrias causadas especialmente por lesão das membranas musculares cardíacas; e, ainda, a isquemia de áreas locais do músculo, causada pela oclusão coronária, faz muitas vezes, com que parte do coração permaneça parcial ou totalmente despolarizada todo o tempo, o que é denominado como corrente de lesão (GARCIA, 2002).

A oclusão coronária é a causa mais comum de correntes de lesão no coração (GUYTON, 2006), e a consequência desta, é, muitas vezes, a instalação de um ritmo cardíaco atípico ou uma sequência anormal da contração das câmaras cardíacas. Este fenômeno leva a um prejuízo da eficiência do bombeamento cardíaco a ponto de causar a morte do paciente.

Nas síndromes coronarianas agudas podem aparecer três tipos de alterações no ECG: onda Q anormal, onda T invertida e elevação do segmento ST (MANSUR *et al.*, 2006).

As alterações elétricas que são identificadas no ECG, devido a ocorrência de isquemia, podem ser identificadas alterações da onda T e do segmento ST (MANSUR *et al.*, 2006). Estas alterações ocorrem, pois a isquemia interfere na resistência da membrana celular e permite uma saída de pequena quantidade de potássio intracelular. Na região isquêmica, a repolarização se faz de forma mais lenta, repercutindo na morfologia e orientação da onda T. (AZEVEDO, 1999).

No infarto a alteração eletrocardiográfica importante é na onda Q, pois ela reflete a ocorrência de lesão miocárdica irreversível devido ao tempo prolongado de isquemia, necrose isquêmica do miocárdio (MANSUR *et al.*, 2006; LAGE e RAMIRES, 2001).

2.2 PROCESSO ISQUÊMICO

Na fisiopatologia da cardiopatia isquêmica, dois processos estão implicados: a oferta e a demanda de oxigênio pelo miocárdio. A isquemia ocorre quando há desequilíbrio na oferta e na demanda de oxigênio. Em algumas condições, o comprometimento da oferta de oxigênio é secundário à diminuição do fluxo sanguíneo, sendo essa a fisiopatologia da maioria dos casos de infarto agudo do miocárdio (CARVALHO *et al.*, 2001).

Sendo assim, a isquemia é a falta ou interrupção de suprimento sanguíneo para um tecido orgânico devido à obstrução da vasculatura (SILVA JR *et al.*, 2002). Este fluxo sanguíneo insuficiente no músculo cardíaco pode diminuir o seu metabolismo, seja pela falta de oxigênio ou pelo acúmulo excessivo de dióxido de carbono e ainda falta de nutrientes suficientes.

O infarto é a consequência máxima desta falta de oxigenação de um órgão ou parte dele. O infarto agudo do miocárdio (IAM) decorre deste foco de necrose resultante da baixa perfusão tecidual, tendo sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca (ZORNOFF *et al.*, 2009).

O IAM exige um atendimento imediato, e, na maioria dos casos existe um retardo no reconhecimento e na valorização de seus sinais e sintomas. Devido a este problema e a

gravidade da situação, cerca de 1/3 das pessoas que tem IAM morrem antes de chegar ao hospital (DATASUS, 2011).

Segundo o DATASUS (2011), há dois métodos de tratamento para o IAM, o método invasivo e o não invasivo. As intervenções invasivas podem ocorrer para limitar o dano da IAM ou promover o refluxo. Entre eles destaca-se a angioplastia coronária transluminal percutânea que visa à desobstrução mecânica da artéria coronária afetada, com a utilização do STENT que impede novas obstruções aliviando os sintomas da doença coronariana (BRASIL, 2009).

Outra possibilidade de restabelecimento da circulação coronariana é a revascularização miocárdica, conhecida como 'ponte de safena'. O enxerto, ou ponte, é feito quando uma parte de uma veia da perna é retirada, sendo inserida na aorta e a outra ponta logo a seguir do ponto onde está a obstrução.

Os métodos não invasivos de tratamento do IAM incluem o uso de vasodilatadores, anticoagulante, ansiolíticos, analgésicos, antiplaquetários e β -bloqueadores, acompanhados de repouso absoluto no leito.

Dentre estes, destaca-se a utilização de β -bloqueadores injetáveis e orais, não apenas para tratar arritmias, mas para limitar o dano miocárdico induzido pela área em sofrimento isquêmico. O uso de tais drogas reduz a frequência cardíaca, a pressão arterial e o inotropismo, atuando sinergicamente na diminuição do consumo de oxigênio no miocárdio e melhorando a redistribuição de sangue do epicárdio para o miocárdio, reduzindo a área de infarto e aumentando a sobrevida, pois melhoram a perfusão miocárdica (aumentam o fluxo subendocárdico e o fluxo das colaterais) (DATASUS, 2011; LAGE e RAMIRES, 2001; SARMENTO-LEITE *et al.*, 2001).

Os bloqueadores β -adrenérgicos ou β -bloqueadores são uma classe de fármacos que têm em comum a capacidade de bloquear os receptores β da noradrenalina. Possuem diversas indicações, particularmente como antiarrítmicos, anti-hipertensores e na proteção cardíaca após o infarto do miocárdio. Esta proteção, surge do bloqueio β_1 que reduz a frequência cardíaca, atrasa a velocidade de condução no NAV, diminui a força de contração (inotropismo negativo), reduz a pressão arterial e volume sistólico (DATASUS, 2011; LAGE e RAMIRES, 2001; SARMENTO-LEITE *et al.*, 2001).

Essas ações são responsáveis por reduzir as taxas de ruptura miocárdica, limitar o tamanho do IAM, melhorar a função cardíaca e diminuir a mortalidade tanto precoce como tardia. As ações antiarrítmicas são importantes na fase aguda do infarto do miocárdio. (LAGE e RAMIRES, 2001). Sua ação protetora consiste em diminuir a demanda metabólica do coração reduzindo assim a formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio formado durante a isquemia/reperfusão.

As ERO são formadas como um subproduto natural do metabolismo do oxigênio e têm papéis importantes na sinalização celular e homeostase (VALKO *et al.*, 2007). No entanto, em situações de estresse, como na isquemia, os níveis de ERO podem aumentar drasticamente. Isso pode resultar em danos significativos às estruturas celulares. Cumulativamente, isso é conhecido como estresse oxidativo.

2.3 PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES NO PROCESSO ISQUÊMICO

Consideráveis informações têm sido acumuladas mostrando o efeito paradoxal da reoxigenação e as ações promovidas pelas ERO. O papel central destas espécies na lesão de reperfusão tem sido demonstrado por vários investigadores (VALLI *et al.*, 2002; EVORA *et al.*, 1996; GRANGER *et al.*, 1986).

A formação dos ERO acontece principalmente na fosforilação oxidativa na mitocôndria. Segundo Evora *et al.*, (1996), as ERO podem ser lesivas através de uma série de mecanismos, dentre eles: a) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; b) oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas, dentre elas a glutathione peroxidase (GPx); c) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; d) direta diminuição da biodisponibilidade do NO comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; e) formação de ONOO⁻, um ânion instável e tóxico, devido a reação de O₂⁻ com o NO e f) ativação de citocinas como a interleucina-1.

Dentro da luz de vasos reperfundidos, os ânions radicais superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de vários fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, o PAF, a serotonina e o tromboxano A₂ (EVORA *et al.*, 1996).

Granger *et al.*, (1986), em um estudo com modelo de isquemia e reperfusão no intestino delgado, propuseram um mecanismo para explicar a origem dos radicais livres: durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado até a hipoxantina, que se acumula nos tecidos. Segundo Campos *et al.*, (2004), como resultado do estado de baixa energia, há falência da homeostase celular caracterizada pela perda do gradiente iônico através da membrana celular, permitindo o influxo de Ca^{2+} para as células, que ativa proteases a converter a xantina desidrogenase a xantina oxidase, através do metabolismo da hipoxantina.

Ainda segundo o autor acima, essa conversão se faz de maneira irreversível, através de proteases ativadas pelo cálcio, ou de maneira reversível, através da oxidação de grupos sulfidríla. A xantina oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina e, quando este é fornecido pela reperfusão, formam-se as ERO com grande capacidade de lesão tecidual.

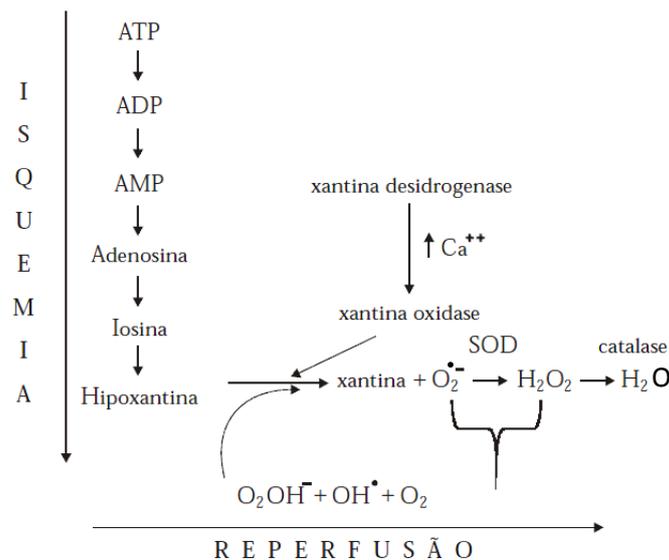


Figura 2 - Via metabólica para a produção de radicais livres do oxigênio (RLO) durante a reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase (adaptado de Granger *et al.*, citado por Campos e Yoshida, 2004). ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, AMP: monofosfato de adenosina, Ca: cálcio, SOD: superóxido dismutase, $\text{O}_2^{\bullet-}$: ânion radical superóxido, O_2 : oxigênio, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, H_2O : água, OH^\bullet : radical hidroxil.

Uma proposta que explica a produção exacerbada de ERO foi dada por McCord *et al.*, (1974), onde ocorre uma produção de superóxido tanto pela interrupção do transporte de elétrons pelo complexo de transporte na mitocôndria quanto pela via da ciclo-oxigenase do metabolismo do ácido araquidônico (citado por CAMPOS *et al.* 2004).

Por esse último mecanismo haveria a ativação de proteases e fosfolipase A₂ induzida pelo acúmulo de cálcio intracelular no período de reperfusão, que levaria à síntese de mediadores pró-inflamatórios: o fator de agregação plaquetária (PAF) e os compostos eicosanoides, moléculas derivadas de ácidos graxos (leucotrieno B₄, tromboxano A₂ e prostaglandinas) (CAMPOS *et al.*, 2004). Estes mediadores, principalmente o leucotrieno B₄ e tromboxano A₂, induzem os neutrófilos a liberarem radicais livres.

Normalmente, os radicais livres são continuamente produzidos em pequenas quantidades como subprodutos metabólicos ou escapes da fosforilação oxidativa. Estes radicais são naturalmente neutralizados por sistemas endógenos de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático, que servem para prevenir ou reparar a lesão oxidativa (Figura 3). Dentre os antioxidantes preventivos estão a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a GPx e a vitamina E. Dentre os reparadores estão a glutathiona redutase (GR), a GPx e o ácido ascórbico (CAMPOS *et al.*, 2004, MONTEIRO *et al.*, 2003).

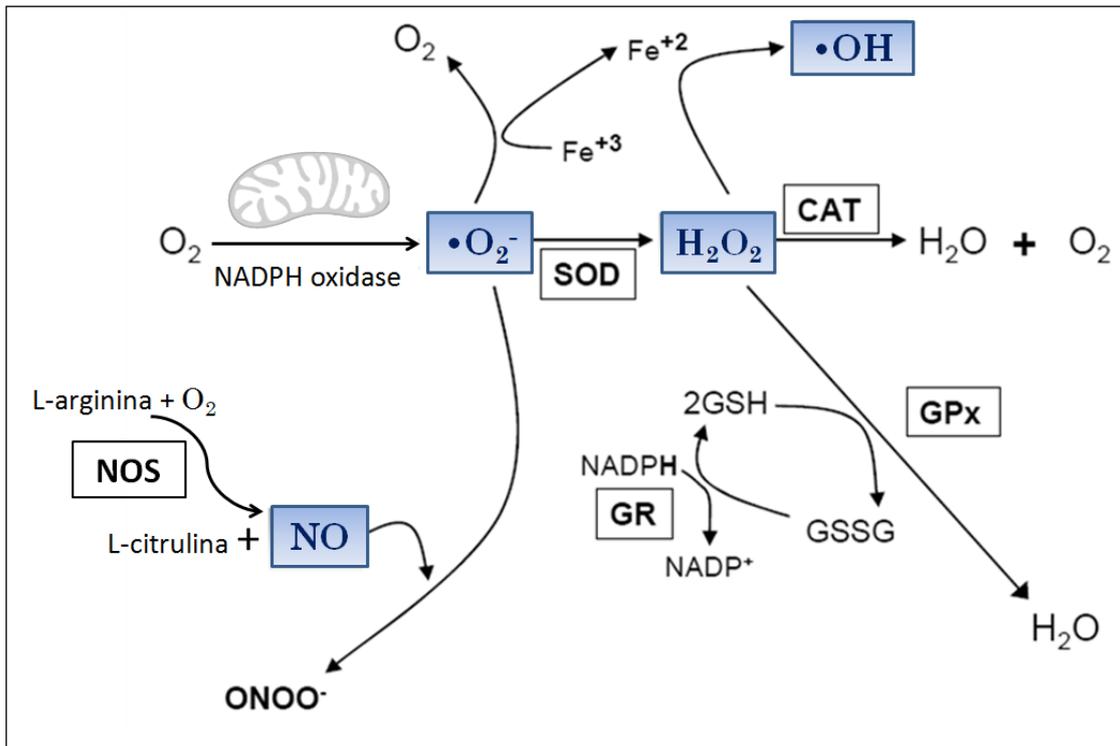
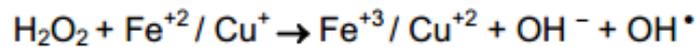


Figura 3 - Esquema da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Podemos observar a conversão do oxigênio (O_2) em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelas enzimas NADPH oxidase (processo que ocorre principalmente na mitocôndria). O $O_2^{\cdot-}$ é dismutado pela superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser convertido em uma molécula de água (H_2O) + O_2 pela catalase (CAT) e/ou glutatona peroxidase (GPx). O H_2O_2 pode formar radical hidroxila ($\cdot OH$) após reação reagir com o ferro (Fe^{+2}) na reação de Fenton. A glutatona peroxidase (GPx) reduz todos os hidroperóxidos utilizando glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantém o equilíbrio entre GSH e glutatona oxidada (GSSG). O óxido nítrico (NO) é formado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina que produz NO e L-citrulina. O $O_2^{\cdot-}$ também pode reagir com o NO para formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Adaptado de GRIENDLING e FITZGERALD, 2003).

As ERO também podem ser geradas sem o auxílio de enzimas como, por exemplo, nas reações de Fenton e Haber Weiss (Figura 4a e 4b). Na reação de Fenton, através da adição de um elétron ao H_2O_2 são formados dois radicais HO, a reação pode ser catalisada pelo sistema Fe^{+2}/Fe^{+3} ou Cu^{+2}/Cu^{+3} . Na reação de Haber Weiss ocorre a interação do H_2O_2 com o $O_2^{\cdot-}$ e também são formados dois radicais $\cdot OH$ (HALLIWELL, 1991).

a



b

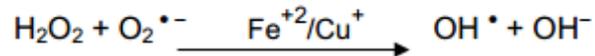


Figura 4 – a) Reação de Fenton – a liberação de Fe^{2+} pode participar da reação de Fenton gerando uma espécie altamente reativa, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). b) Reação de Haber Weiss ocorre a interação do H_2O_2 com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e também são formados dois radicais $\cdot\text{OH}$. Fe: ferro, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, OH: hidróxido.

Segundo Ribeiro et al., (2005), buscando-se atenuar as repercussões hemodinâmicas e fisiopatológicas da restauração vascular pós-isquemia em vários tecidos e órgãos, as estratégias adotadas foram principalmente, segundo Campos *et al.*, (2004), a base de suplementações ricas em antioxidantes endógenos e exógenos, doadores de NO, componentes enzimáticos (selênio) e de bloqueadores (queladores) para metais de transição (Fe^{2+}) e da atividade leucocitária. Tem sido usada ainda, a neutralização da ação da hipoxantina, anti-inflamatórios, vasodilatadores, antiagregantes plaquetários, anticorpos monoclonais contra glicoproteína de adesão do neutrófilo (CAMPOS *et al.*, 2004).

Várias plantas oferecem um potencial terapêutico para doenças cardiovasculares, destacando-se as de efeito contra a insuficiência venosa, hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Os mecanismos de ação das mesmas podem ser variados, agindo como antioxidantes, antiagregantes plaquetários, fibrinolíticos, anti-hiperlipêmicos, antiaterosclerótica, antiarrítmicos e vasodilatadores (MUSABAYNE, 2012; VALLI *et al.*, 2002; STANKOVIÈOVÁ *et al.*, 2001).

Dados de estudos epidemiológicos apoiam que o potencial de antioxidantes e flavonoides na dieta, presentes em várias ervas, pois melhoram a saúde cardiovascular (KUSMIC, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 65 a 80% da população mundial, devido à pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, dependem essencialmente

de plantas. Desde os tempos antigos, produtos naturais, notadamente os de origem vegetal, tem sido consistentemente uma importante fonte de agentes terapêuticos (BRASIL, 2006).

Apesar disto, estima-se que, de 25% a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JÚNIOR e MELLO, 2008). No entanto, poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para a avaliação da sua qualidade, segurança e eficácia.

Segundo Calixto (2005), o Brasil possui de 20 a 22% de plantas e microorganismos existentes no mundo e o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. Contudo, estima-se que não mais que 25.000 espécies de plantas têm sido o objeto de qualquer tipo de estudo científico.

O gênero *Canavalia* DC. pertence à subfamília Faboidae e apresenta cerca de 75 espécies, com a maior concentração na região neotropical, já que 37 dessas espécies ocorrem nessa região biogeográfica e cerca de 15 na região paleotropical (VERÇOZA *et al.*, 2010).

Diferentes graus de atividades biológicas do gênero *Canavalia* foram relatados e parece ocorrer devido aos sítios de ligação de metal, um domínio de reconhecimento de carboidratos presente em suas cadeias e a presença de antioxidantes (GADELHA *et al.*, 2005; CAVADA *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 1999; BARRAL-NETTO *et al.*, 1999). Apesar de o gênero apresentar 75 espécies, apenas quatro têm sido objeto de interesse devido a presença de flavonoides e lecitinas, são elas: a *C. gladiata*, *C. brasiliensis*, *C. maritima* (ou *C. rosea* DC.) e *C. ensiformis*.

Apesar das semelhanças estruturais observadas em lecitinas dentro deste gênero, Assreuy *et al.*, (2009) verificaram diferentes respostas inflamatórias e vasorelaxantes em três espécies estudadas (*C. gladiata*, *C. brasiliensis*, e *C. maritima*), sendo a menor resposta encontrada na *C. marítima*, tanto em atividade inflamatória quanto na potência vasorelaxante. A comparação das estruturas primárias das lecitinas aponta que a *C. maritima* difere da *C. brasiliensis* em cinco aminoácidos e da *C. gladiata* em apenas três.

Barral-Netto *et al.*, (1995), evidenciaram que a administração *in vivo* de *Canavalia brasiliensis* reduziu as lesões em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania amazonensi*, seja a administração ocorrendo no auge da infecção, ou mantida durante todo o processo inflamatório.

Nas sementes de diferentes espécies de *Canavalia*, entre elas, *C. paraguayensis*, *C. gladiata* e *C. ensiformis* encontrou-se um aminoácido não proteico (SCHLÜTER e BORDAS, 1972) denominado L-canavanina ou ácido L-2-amino-4-(guanidinooxi) butanóico. Este é considerado um análogo potencialmente tóxico da L-arginina, provocando efeitos antimetabólicos em vírus, bactérias, fungos, animais, plantas inferiores e superiores (ROSENTHAL, 1991).

Nas sementes de *Canavalia ensiformis*, foi isolada uma proteína tóxica chamada canatoxina, diferente da concanavalina A (Con A), uma conhecida lecitina presente nas sementes desta planta (CARLINI *et al.*, 1981). A Con A, quando adicionada a células infectadas com vírus de estomatite vesicular, previne o amadurecimento do vírus. A concanavalina A reduz também a infecção viral da rubéola e herpes simples (MARCHETTI *et al.*, 1995).

Canatoxina é uma proteína neurotóxica e letal, à qual se atribuem efeitos farmacológicos. Induz, em 24 horas, dispneia, ataxia, hipotermia, coma, convulsão crônica e morte em ratos, quando injetada por via intraperitoneal com 100-200 mg de proteína/kg de peso corporal (CARLINI *et al.*, 1981). A dose letal para matar 50% da população testada foi estabelecida em 0,4 a 0,6 mg/kg e 2 a 3 mg/kg quando injetada via intraperitoneal em ratos e camundongos, respectivamente (CARLINI *et al.*, 1984). A canatoxina aumenta a circulação corpórea de insulina e induz hipoglicemia em ratos (RIBEIRO-DASILVA e PRADO, 1993).

2.4 *Canavalia rosea* (Sw.) DC. [Sinônimos: *C. maritima* (Thouars); *C. lineata* (Thunb.) DC.; *C. obtusifolia* (Lam.) DC.; *Dolichos maritimus* (Aublet); *Dolichos obtusifolius* (Lam.); *Dolichos roseus* (Sw)].

A *C. rosea* (Sw.) DC. é a única do gênero que é pantropical, constituindo um elemento comum em praias e dunas devido a sua dispersão pelas correntes marinhas (MATOS *et al.*, 2004), sendo encontrada em abundância no litoral do nordeste brasileiro. Também conhecida como feijão-da-praia, feijão-de-porco, “baybean”, “coastal jackbean”.

Tabela 2- Classificação taxonômica da *C. rosea*

Classificação taxonômica
Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisão: Spermatophyta
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Fabales
Família: Fabaceae
Gênero: Canavalia
Espécie: <i>C. rosea</i>

A *C. rosea* é uma espécie decumbente encontrada nas comunidades psamófila e pós-praia da restinga. Possuem folhas compostas, trifoliadas e inflorescências racemosas terminais. Em cada inflorescência abre de uma a quatro flores por dia (VERÇOZA *et al.*, 2010).

Figura 5 - Flor de *C. rosea*Figura 6 - Vagem e folhas de *C. rosea*

Pattamadilok *et al.*, (2008), isolaram, a partir das partes aéreas de *C. rosea*, o alcaloide guanidínico acíclico, canarosina, além de β -sitosterol, estigmasterol, daucosterol, *epi*-inositol, éter 6-O-metil e rutina.

No estudo realizado por este autor foi demonstrado que a canarosina promoveu ação inibitória sobre os receptores dopaminérgicos D1. Estando os receptores bloqueados, a dopamina, que atua diretamente nos receptores β_1 do coração, não promove o aumento da força de contração do músculo cardíaco, nem pode estimular os receptores α_1 , que é responsável pelo aumento da vasoconstrição no músculo liso.

Banoth *et al.*, (2011), em seu trabalho, observou que o extrato alcoólico e aquoso de *Canavalia gladiata* de forma significativa ($p < 0,001$) melhorou os níveis de dopamina do cérebro e outras aminas como a noradrenalina, adrenalina e serotonina. Também foi capaz de melhorar o níveis de GSH e diminuir o malonaldeído (MDA) em relação ao grupo controle por PTPm, numa dose dependente forma. No entanto, o extrato alcoólico mostrou atividade máxima. Assim, parece ser a mais promissora de plantas, devido à presença de L-dopa, polifenóis e potencial atividade antioxidante. Estes resultados fornecem a evidência de que o extrato de *C. gladiata*, como um medicamento antiparkinsoniano potencialmente útil.

Gadelha *et al.*, (2005), apresentaram um estudo de cristalografia de uma lecitina retirada de sementes de *Canavalia maritima* (Con M) e evidenciaram sua atividade relaxante sobre o músculo liso vascular. Ao comparar a Con M e a outras lecitinas presentes em *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis*, verificaram 98% de similaridade entre elas (Con M, Con A e Con Br) .

Verificou-se ainda que a Con M exerce uma ação relaxante dependente de concentração em anéis de aorta isolados que, provavelmente, ocorre através de uma interação com um sítio de ligação específico para lecitinas sobre o endotélio, o que resulta numa liberação de NO (Gadelha *et al.*, 2005).

Costa *et al.*, (2010), verificaram atividade antioxidante na fração acetato de etila e clorofórmico das folhas de *C. rosea* e demonstraram que haviam substâncias antioxidantes ativas nestes extratos.

Uma correlação inversa entre a biodisponibilidade de NO e a redução do risco de doença cardiovascular tem sido relatada na literatura científica (ZAGO *et al.*, 2006). A modulação farmacológica e fisiológica da via do NO com várias ferramentas de intervenção ajuda a atenuar vários processos de doenças cardiovasculares, dentre eles a isquemia e reperfusão (RUIZ-HURTADO *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2002).

Apesar da potencial ação farmacológica da *Canavalia rosea* no tratamento de patologias importantes como a doença de Parkinson, hipertensão arterial e doenças cardíacas, pouco se conhece sobre os efeitos desta planta sobre o tecido cardíaco saudável ou em estado patológico. Além disso, a busca por substâncias que possam melhorar recuperação de eventos isquêmicos tem sido motivada para emprego terapêutico devido carência farmacológica disponível na atualidade. Os métodos atuais de intervenção geram recuperação parcial que pode ser otimizada com a utilização de substâncias com caráter antioxidante, preservando, assim, o tecido cardíaco de danos gerados pelo estresse oxidativo.

Assim, diante do exposto, onde se verifica uma possível atividade antioxidante e seus efeitos biológicos (GADELHA *et al.*, 2005) e benéficos (BANOTH *et al.*, 2011), propusemos uma avaliação do potencial antioxidante desta planta, bem como dos efeitos contráteis e elétricos cardíacos além dos seus efeitos antioxidantes da fração acetato de etila das folhas de *C. rosea* (FAE) na prevenção da injúria de isquemia e reperfusão.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta proposta de pesquisa foi estudar os efeitos contráteis, elétricos e antioxidantes da fração acetato de etila das folhas de *Canavalia rosea* (FAE) sobre o coração e seu papel na prevenção dos danos decorrentes da lesão de reperfusão. Para tanto, propomos os seguintes objetivos específicos:

- avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da FAE;
- avaliar o efeito da FAE sobre parâmetros contráteis e elétricos do coração isolado de ratos;
- avaliar, em modelo de isquemia-reperfusão, os possíveis efeitos antiarrítmicos da FAE;
- avaliar, em modelo de isquemia-reperfusão, os possíveis efeitos antioxidantes da FAE.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Partes aéreas da *C. rosea* foram coletadas na costa da praia aracajuana (Sergipe, NE, 10° de latitude Sul e 37° de longitude oeste, Brasil), no mês de março. Um exemplar completo foi coletado e este material botânico foi identificado e autenticado pelo Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, sendo registrado pelo número 24061.

4.2 Preparação da fração acetato de etila de *C. rosea*

As folhas de *C. rosea* foram separadas, lavadas e secadas em estufa a 40°C com ventilação. O material foi pulverizado através de um moinho com rotor vertical (MARCONI) e submetido à extração através de imersão em metanol, maceração, (MeOH) por 14 dias, por três vezes consecutivas. Após este período, o material foi filtrado e concentrado em um evaporador rotatório (Heidolph, Laborota 4000) sob pressão reduzida à temperatura de 45°C. Este filtrado, por sua vez, foi diluído entre MeOH/H₂O (9:1) e após a rotaevaporação pra a eliminação do metanol, submetido à partição líquido-líquido em Hexano:MeOH/H₂O (9:1), CHCl₃:MeOH/H₂O (6:4) e AcOEt:H₂O (Figura 7).

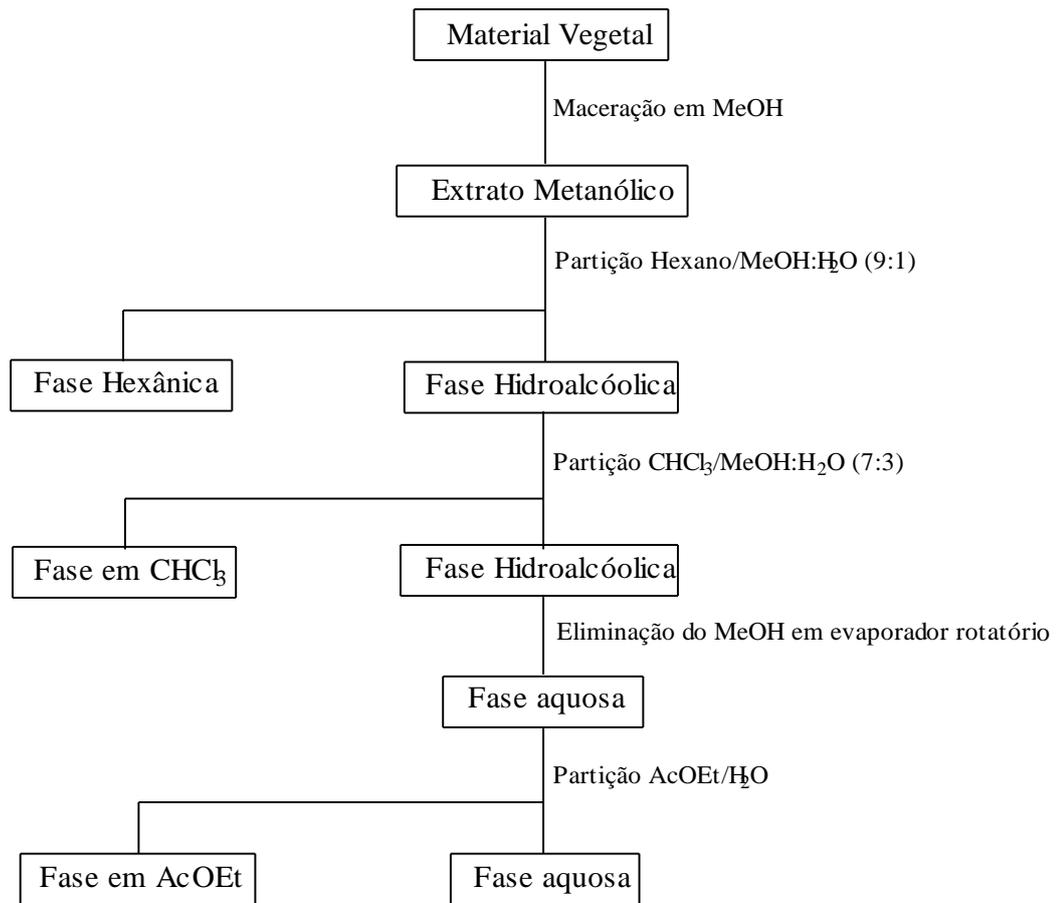


Figura 7 - Preparação do extrato

O rendimento da fração foi calculado pela fórmula:

$$\text{Rendimento de fração} = (\% \text{ fração} \times \text{massa seca total das folhas}) / 100$$

Uma solução estoque da FAE foi preparada através da diluição em DMSO 0,5% na concentração de 60 mg/mL. A concentração final utilizada nos experimentos foi de 300 µg/mL, preparada em Krebs-Ringer (K-R).

4.3 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante da FAE

4.3.1 Prospecção Fitoquímica

A FAE foi submetida à prospecção fitoquímica seguindo metodologia descrita por Matos, (1998). O objetivo foi detectar a ocorrência de diversas classes de metabólitos secundários, sobretudo, os que apresentam atividade antioxidante. Para os testes, 7 porções de

3 a 4 mL da FAE foram dissolvidas em etanol e colocadas em 7 tubos de ensaio distintos. Todos os testes foram realizados em triplicata, conforme descrito a seguir:

Teste para flavonoides (Geral)

Em um tubo de ensaio, foi adicionado 5 mL de solução metanólica do extrato (1 mg/mL) e em seguida, 1 cm de fita de magnésio ou 5 mg de magnésio granulado. Ao final da efervescência, foi observado o aparecimento de uma coloração rósea a vermelha.

Teste para taninos e fenóis

Em um tubo de ensaio foi adicionado 3 mL da solução do extrato e 3 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ 1% e agitado. Paralelamente realizou-se um branco usando apenas água e FeCl₃ 1%. Onde foi observado uma mudança de coloração ou formação de precipitado.

Teste para depsídeos e depsidonas (derivados tânicos hidrolisáveis)

Foi dissolvido 5 mg do extrato em 5 mL de éter etílico. Após evaporação do solvente em banho termostatizado foi adicionado 3 mL de metanol e 3 gotas de FeCl₃ 1%. Observou-se o aparecimento de uma coloração verde-azulada ou cinza.

Testes para antocianinas, antocianidinas, flavonas, xantonas, chalconas, auronas e flavanonas

Em 3 tubos de ensaio distintos contendo 4 mL da fração adicionou-se: (1) ácido até pH 3,0; ou (2) base até pH 8,5; ou (3) base até pH 11,0. Observou-se a formação, em cada um dos tubos, de coloração que foi identificada seguindo a Tabela abaixo.

Tabela 3 - Atividade antioxidante da fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE) determinada pela redução do radical livre DPPH[•].

Testes	pH 3,0	pH 8,5	pH 11,0
Antocianinas/Antocianidinas	vermelho	Lilás	azul-púrpura
Flavonas/Flavonois/Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas/Auronas	vermelho	-	vermelho-púrpura
Flavanonas	-	-	vermelho-alaranjado

Teste 2 para xantonas/antraquinonas

Foi dissolvido 3 mg fração em 3 mL de benzeno. Adicionado 2 mL de NH_4OH 10% e agitado suavemente. Foi observado o aparecimento de coloração rósea a violeta.

Teste 3 para xantonas/antraquinonas

Foi fervido 10 mg do extrato em 10 mL de solução aquosa de H_2SO_4 a 10%. A filtração foi feita à quente e transferida para um funil de separação. Onde foi adicionado 10 mL de água destilada e extraído com benzeno (2 x 10 mL). Reunidos os extratos orgânicos foi concentrada até 3 mL. Adicionou-se 3 mL de NH_4OH a 10% e agitou-se. Observou-se o aparecimento de coloração rósea a violeta.

Teste para leucoantocianidinas e catequinas

Em tubo de ensaio foi adicionado 4 mL da fração e acidificado até pH 3,0. Após, o aquecimento com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos foi observado se ocorria a formação de coloração vermelha (indicativo de leucoantocianidinas) ou amarelada (indicativo de catequinas).

Teste 2 para catequinas (derivados de taninos condensados)

Em 3 mL de solução metanólica da fração (1 mg/mL), foi adicionado 1 mL de solução de vanilina 1% e 1 mL de HCl concentrado. Foi observado se ocorria o aparecimento de coloração vermelha intensa.

Teste para saponinas

Em um tubo de ensaio com tampa, foi adicionado 5 mL de solução do extrato e 1 mL de etanol 80%. Diluído em até 15 mL com água destilada. Agitou-se vigorosamente. Foi observado se ocorria a persistência da espuma formada por no mínimo 30 minutos indicativo de saponina.

Teste para esteroides e triterpenoides

Foi dissolvido 5 mg do extrato em 3 mL de clorofórmio. Foi adicionado 2 mL de anidrido acético. Agitou-se suavemente e adicionou-se pelas paredes do tubo 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Foi observado se ocorria o aparecimento de uma sucessão de cores formando anéis (azul e verde persistente = esteroides livres; laranja e vermelho persistente = triterpenoides).

Teste para sesquiterpenlactonas e outras lactonas

Em um tubo de ensaio, foi misturado 2 mL de solução alcoólica do extrato, 2 gotas de cloridrato de hidroxilamina 10% e 2 gotas de solução de KOH a 10%.

Aquece-se suavemente em banho termostatzado durante 2 minutos. Resfriou-se e acidificou-se com HCl 1N. Adicionou-se 1 gota de FeCl₃ 1% e foi observado se ocorria o aparecimento de coloração violeta.

Teste para cumarinas e seus derivados

Foi dissolvido 2 mg do resíduo em 5 mL de éter etílico. Concentrou-se em banho termostatzado até 0,5 mL. Em um papel de filtro aplicou-se gotas da solução etérea para formar 2 manchas de 1 cm de diâmetro cada. A uma delas foi adicionado 1 gota de NaOH ou KOH a 1N e a cobriu pela metade. Esta foi exposta à luz UV. Foi observado se ocorria a formação de fluorescência azul na parte exposta da mancha.

Teste para alcaloides

Foi dissolvido 10 mg do extrato em 4 mL de HCl de 5%. Em 4 tubos de ensaio foi adicionado 4 gotas dos reagentes abaixo:

Reativo de Bouchardat: reação positiva - precipitado laranja avermelhado;

Reativo de Drangendorff: reação positiva - precipitado vermelho tijolo;

Reativo de Bertrand: reação positiva - precipitado branco;

Reativo de Mayer: reação positiva - precipitado branco.

Teste para heterosídeos cardiotônicos

Em dois tubos de ensaio, foi adicionado 2 mL de solução metanólica do extrato. Foi adicionado em um tubo 5 gotas de reativo de Kedde e em outro, 3 gotas de solução aquosa recém preparada de nitroprussiato de sódio a 5% e 3 gotas de NaOH a 2 N. Se a reação for positiva com reativo de Kedde produz coloração azul ou violeta. Se for positiva com nitroprussiato de sódio produz coloração roxa intensa.

Como critério de avaliação foi utilizado os seguintes sinais: (+) para teste positivo de coloração baixa, (+ +) para teste positivo de coloração moderada, (+++) para teste positivo de coloração alta e (-) para teste negativo.

4.3.2 Atividade sequestradora do radical livre DPPH[•]

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante da FAE foi realizada segundo a metodologia descrita por Soler-Rivas *et al.*, (2000) e Argolo *et al.*, (2004). De acordo com esta metodologia, o extrato cuja atividade antioxidante deseja-se avaliar, reage com o radical estável 2,2-difenil-1-picril-Hidrazil (DPPH[•]) em solução metanólica. O consumo do radical é monitorado pelo decréscimo da absorbância do radical DPPH[•] em espectrofotômetro UV-VIS

(PG INSTRUMENTS – UK; UV-VIS Spectrophotometer : Model : T80+) no comprimento de onda de 515 nm.

Inicialmente, a FAE foi solubilizada em metanol para preparação de uma solução estoque cuja concentração foi de 0,5 mg/mL, desta, foram retiradas alíquotas e adicionadas a uma solução de 40 µg/mL de DPPH^{*} (394,32 g/mol) para obter concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL, em volume final de reação de 1 mL. A mistura de metanol foi utilizada como branco e o ácido gálico, como controle positivo.

A concentração efetiva de um produto natural para reduzir um radical livre em 50% (CE₅₀) é uma característica importante para avaliar a capacidade antioxidante do mesmo. A absorbância testada no tempo de 60 minutos foi convertida em porcentual de inibição (PI). Além deste, a atividade antioxidante foi expressa também pelo índice de atividade antioxidante (IAA), calculado com base na equação:

$$\text{IAA} = [\text{DPPH}^* \text{ µg/mL}] \text{ Final} / \text{CE}_{50} \text{ (µg/mL)}.$$

A atividade antioxidante foi considerada: fraca (IAA < 0,5), moderada (0,5 > IAA < 1,0), forte (1,0 > IAA < 2,0) ou muito forte (IAA > 2,0).

4.3.3 Medida da lipoperoxidação

Neste estudo, a lipoperoxidação foi induzida pelo sulfato ferroso (FeSO₄) em um substrato rico em lipídios (gema de ovo) para investigar a ação antioxidante da FAE (Polydoro *et al.*, 2007 – com modificações e Budni *et al.*, 2007). O FeSO₄ reage com o oxigênio produzindo o radical ânion superóxido (O₂^{•-}), que pode sofrer dismutação a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), através da reação de Fenton (GUTTERIDGE E HALLIWELL, 1990; SILVA *et al.*, 2006).

Inicialmente, 1000 µL de lipídios a 1% (v:v) foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4), misturados com 500 µL de ácido tricloroacético (10%) e centrifugados a 1.200 rpm por 10 minutos. Foram adicionadas, em tubos testes com 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL da FAE juntamente com 0,145 mM de FeSO₄, para induzir peroxidação lipídica. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi adicionado o TBA (0,67%) e submetido a aquecimento (100°C) por 60 minutos. Após arrefecimento, o conteúdo dos tubos foi medido, espectofotometricamente (PG INSTRUMENTS UV-VIS Spectrophotometer Model T80+), em 532 nm. Os resultados foram expressos como o equivalente de malondialdeído formado em nmol (MDA)/mL de substrato. Os grupos controles foram realizados simultaneamente aos grupos testes.

4.3.4 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 200 e 300 g, provenientes do Biotério Central da UFS. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12/12 horas, em temperatura controlada ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). Durante a execução dos experimentos foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob número de protocolo 18/2012 (ANEXO 1).

Os animais foram heparinizados e após 15 minutos foram eutanasiados com a utilização da guilhotina, para serem submetidos aos seguintes protocolos.

4.3.5 Montagem do coração isolado em sistema de perfusão do tipo Langendorff

A caixa torácica do animal foi rapidamente aberta, o coração removido e transferido para uma solução de K-R em mM: NaCl 118,5; KH_2PO_4 4,7, NaHCO_3 25,0, KCl 4,7, MgSO_4 1,2, Glicose 11,1 e CaCl_2 1,8, mantida à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Em seguida, a aorta foi canulada e o coração perfundido com K-R aerado por mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e aquecido a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Bomba HAAKE C/F3). A solução de K-R foi previamente filtrada em papel de filtro e, posteriormente, em filtro millipore com “mesh” de $0,45 \mu\text{m}$, a fim de evitar microembolia (HARRISON e RAYMOND, 1951).

4.3.6 Determinação dos parâmetros eletrocardiográficos da FAE em coração isolado de rato

A solução de K-R foi perfundida pela aorta a um fluxo constante. Dois eletrodos de aço inoxidável foram usados para estimular o átrio direito com pulsos retangulares de corrente que foram gerados isolados do terra (20 - 50 V, SIU5 Stimulus Isolation Unit, GRASS). A frequência de estimulação foi regulada para cada coração (S48 Stimulator, GRASS), de modo a ser 20% mais elevada do que a frequência espontânea do marcapasso atrial. O coração permaneceu mergulhado em solução de K-R contida em um becker de 50 mL. Ali, os potenciais elétricos foram captados com a ajuda de três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl 1,0 M) mantidos imersos no K-R. Os sinais eletrocardiográficos foram continuamente monitorados na tela de um cardioscópio (Emai RX10), enviados a um conversor analógico/digital (DATAQ DI-710) e armazenados em computador para processamento *off line* (Windaq ProAcquisition e LabChart 7 Pro software (ADInstruments, Bella Vista, Austrália)).

4.3.7 Avaliação do efeito da FAE sobre a frequência espontânea do coração isolado de rato

Para avaliar o efeito da FAE sobre a frequência cardíaca espontânea em corações isolados de ratos e, perfundidos retrogradamente pela aorta, os corações foram mantidos sem estimulação elétrica. Utilizando o software WindaqEx foi possível determinar os intervalos RR e convertê-los em frequência cardíaca. Essa análise foi realizada nas quatro situações explanadas abaixo.

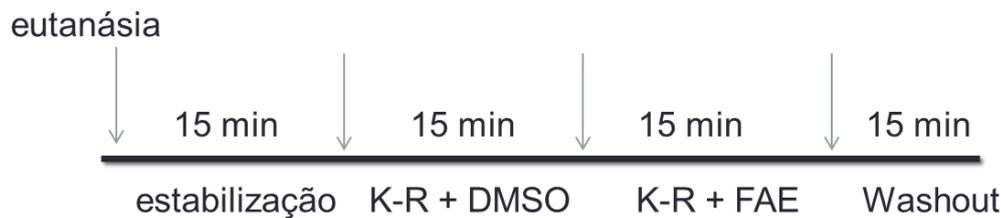


Figura 8 - Representação esquemática do protocolo

4.3.8 Avaliação do efeito da FAE sobre a pressão intraventricular esquerda

A pressão no interior do ventrículo esquerdo foi determinada em coração isolado de rato estimulado eletricamente, por meio de um balonete insuflado com água até uma pressão de 15 cmHg. O balonete foi introduzido no ventrículo esquerdo do coração através da abertura oriunda da remoção do átrio esquerdo. Esta tubulação foi acoplada a um transdutor de pressão (HP 1290A), cujos sinais foram amplificados (HP 7754A), digitalizados (DATAQ DI 710, WINDAQ PRO Acquisition) e gravados em computador. Todo o sistema hidráulico usado para determinar a pressão intraventricular foi preenchido com água destilada e foi calibrado com a ajuda de um manômetro de mercúrio.

4.3.9 Avaliação do efeito da FAE sobre o tempo de contração

O intervalo de tempo para o ventrículo atingir a contração máxima foi medido do início da despolarização ventricular até o ápice da contração ventricular.

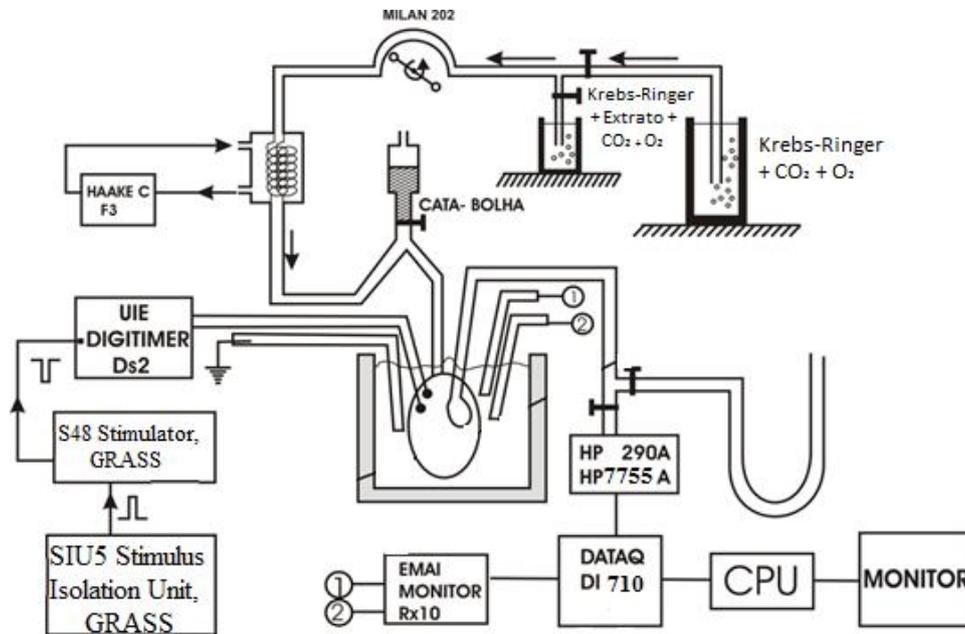


Figura 9 - Representação esquemática do sistema do tipo Langendorff usado para a perfusão retrógrada do coração isolado. O sistema apresenta fluxo constante de perfusão e foi usado para obter os sinais eletrocardiográficos e a frequência cardíaca espontânea do marcapasso dominante. UIE - unidade isoladora de estímulo, CPU - Computador, HP 290 A - transdutor de pressão, HP 7754A amplificador, DATAQ DI 710 - conversor analógico digital, HAAKE C F3 - Bomba aquecedora, MILAN 202 – Bomba Peristáltica, SIU5 Stimulus Isolation Unit, GRASS – gerador de pulso, S48 Stimulator, GRASS – regulador de frequência, Emai RX10 - um cardioscópio.

4.4 Avaliação dos efeitos da FAE sob a injúria de reperfusão em coração isolado de rato

4.4.1 Protocolo de isquemia/reperfusão

Para os experimentos de avaliação da injúria de reperfusão, os corações foram cuidadosamente removidos como descrito previamente, montados em sistema de Langendorff. Foi aguardado um período de estabilização de 20 minutos com a perfusão de K-R. Após este tempo, o coração foi perfundido por mais 10 minutos com solução de K-R acrescida de

DMSO (0,5% - Veículo). A isquemia global foi produzida durante 30 minutos, pela interrupção do fluxo da solução nutritora no coração. Após este período, o fluxo foi restabelecido e mantido por um período contínuo de 60 minutos (reperfusão). Nesse experimento, o efeito da FAE sobre a isquemia/reperfusão foi monitorado através da medida da pressão intraventricular esquerda.

4.4.2 Grupos experimentais

Para evitar o viés da utilização do DMSO (0,5% - Veículo) ao diluir a FAE, este veículo foi acrescido, na mesma concentração, ao K-R. Para o controle positivo foi utilizado N-Acetil-L-Cisteína (NAC).

Os grupos experimentais e os protocolos de isquemia e reperfusão (I/R) a que os corações foram submetidos estão descritos a seguir (Figura 10):

Grupo 01 – *Sham*: Após um período de estabilização de 20 minutos, os corações foram perfundidos por mais 90 minutos com solução de K-R + Veículo, sem nenhuma manobra de isquemia.

Grupo 02 – Veículo + I/R: Após um período de estabilização de 20 minutos, os corações foram perfundidos por 10 minutos com solução de K-R + Veículo, seguido por um período de 30 minutos de isquemia e posteriormente mais 60 minutos de reperfusão com K-R + DMSO.

Grupo 03 – FAE + I/R: Após um período de estabilização de 20 minutos, os corações foram perfundidos por 10 minutos com solução de K-R + FAE (300 µg/mL), seguido por um período de 30 minutos de isquemia e posteriormente mais 60 minutos de reperfusão com K-R + Veículo.

Grupo 04 – NAC + I/R: Após um período de estabilização de 20 minutos, os corações foram perfundidos por um período de 10 minutos com solução de K-R + DMSO + NAC (34 µM), seguido por um período de 30 minutos de isquemia e posteriormente mais 60 minutos de reperfusão com K-R + Veículo.

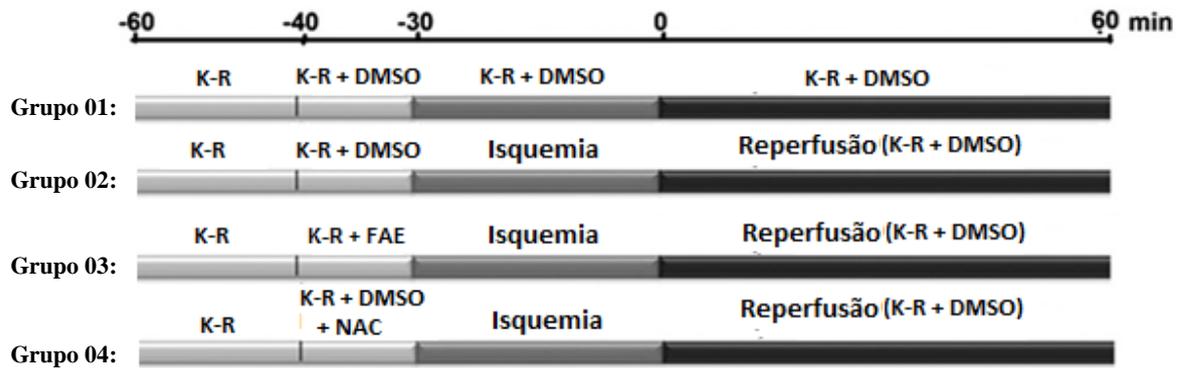


Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental de isquemia-reperfusão. A isquemia global foi produzida pela interrupção de fluxo de solução para o coração por 30 minutos e a reperfusão ocorreu após este tempo, por mais 60 minutos. A estabilização da preparação ocorreu com a perfusão de Krebs-Ringer (K-R). No grupo 01 não houve a manobra isquêmica e houve perfusão de K-R + 0,5% de DMSO - veículo – durante todo o experimento. Antes da manobra isquêmica os corações foram perfundidos durante 10 minutos com K-R + veículo a 37°C por 20 minutos (grupo 2) ou 300 µg/mL de fração acetato de etila (FAE) de *C. rosea* (grupo 03) ou 34 µM de N-Acetil-L-Cisteína (NAC - grupo 4). A reperfusão pós-isquemia foi feita em todos os grupos experimentais com K-R adicionado de veículo por 60 minutos. DMSO.

4.4.3 Avaliação do efeito da FAE sobre a severidade das arritmias cardíacas após a isquemia-reperfusão

As arritmias cardíacas foram definidas como a presença de taquicardia e/ou fibrilação ventricular depois que o fluxo foi restabelecido. Para obter uma medida quantitativa, as arritmias foram classificadas arbitrariamente por sua duração, se maior ou igual a 30 minutos seria considerada uma arritmia irreversível (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, a ocorrência de arritmias cardíacas de até 3 minutos foi classificada com o fator 2; 3 – 6 minutos foi classificada com fator 4; 6 – 10 minutos foi classificada com fator 6; 10 – 15 minutos foi classificada com o fator 8; 15 – 20 minutos foi classificada com o fator 10; 20 – 25 minutos foi classificada com o fator 11; e de 25 – 30 minutos classificada com o fator 12. Os valores obtidos através dessa classificação foram denotados com índice de severidade de arritmia (ISA).

4.4.4 Avaliação do efeito antioxidante da FAE sobre o coração isolado de rato após o isquemia-reperfusão.

Para avaliar o potencial antioxidante da fração estudada, os corações submetidos a períodos de isquemia e perfundidos, conforme protocolo citado anteriormente, foram analisados em aspecto subcelular. Para tanto, foram medidas as atividades de enzimas antioxidantes presentes no coração, bem como a peroxidação lipídica ocorrida nos mesmos, durante a manobra de isquemia e reperfusão.

O primeiro passo, para essa avaliação, foi remover o coração do sistema de Langendorff e processar o órgão adequadamente para as medidas bioquímicas propostas. O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4: para o TBARS; para o GSSH: 0,2 M, pH 7,5; e o GPx: 100 mM, pH 7,0), e em PBS (0,1 M, pH 7,4): para a extração das proteínas, CAT e SOD. As amostras obtidas foram armazenadas a -80°C e utilizadas para a realização dos ensaios enzimáticos. Para normalização das medidas realizadas, a concentração de proteínas nas amostras preparadas foi mensurada de acordo com o método padrão de acordo com Lowry *et al.*, (1951), e foi utilizada para utilização nos passos subsequentes.

4.4.5 Mensuração da atividade das enzimas antioxidantes

a. Atividade da catalase

Resumidamente, a amostra foi homogeneizada em tampão fosfato, e o sobrenadante foi separado após centrifugação de 12.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R), a 4°C por 30 minutos. Numa cubeta de quartzo de 1 mL, acrescentou-se tampão fosfato (50 mM) e a amostra (proporção, v:v). Após remoção de leitura da mistura citada, foi acrescentado o H₂O₂ à 0,3 M como substrato para a inicialização da reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 240 nm, a 25°C (PG INSTRUMENTS – UV-VIS Spectrophotometer Model T80+). O teste cinético teve duração de 1 minuto, com aferições realizadas em intervalos de 15 segundos. A atividade da enzima foi expressa pela variação das absorvâncias/minuto/miligrama de proteínas.

b. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi mensurada através da formação de íons superóxido pela auto oxidação do pirogalol e a inibição da redução do sal de tetrazolium (MTT) segundo Madesh e Balasubramanian adaptado por Marklund (1974). Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em PBS, centrifugado a 10.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 12

minutos. O branco foi realizado com uma mistura de PBS e MTT (1,25 mM). No padrão foi acrescentado o pirogalol solubilizado em PBS contendo 1mM de DTPA para uma concentração final de 100 μ M. E no teste, além destes, foi adicionado 30 μ L de amostra. Após 5 minutos acrescentou-se 150 μ L de DMSO. A placa foi agitada e a leitura realizada em espectrofotômetro (PG INSTRUMENTS; UV-VIS Spectrophotometer Model T80+) à 570 nm.

c. Atividade da glutatona redutase (GR)

A amostra foi homogeneizada em tampão fosfato (0,2 M), pH 7,5 contendo EDTA (6,3 mM), acrescido de Leupeptina (5 mg/mL) e PMSF (100 mM). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R), a 4°C. Para o ensaio enzimático, à amostra foi adicionado uma solução de albumina (0,5 mg/mL de tampão), glutatona oxidada (GSSH - 10 mM). A reação iniciou-se com a adição de NADPH (1,2 mg/mL) em bicarbonato (0,5%). O monitoramento foi feito em espectrofotômetro (PG INSTRUMENTS; UV-VIS Spectrophotometer Model T80+) à 340 nm, 37°C, por 8 minutos, em intervalos de um minuto. O resultado foi expresso em nanomoles por miligrama de proteína.

d. Atividade da glutatona peroxidase

Este ensaio é uma medida indireta da atividade da GPx (PAGLIA e VALENTINE, 1967). O tecido foi homogeneizado em 10 volumes de tampão fosfato de sódio 50 mM, acrescido de KCl 140 mM, pH 7,4. A mistura foi centrifugada a 2.000 rpm, por 10 minutos a 4°C (Heal Force, Neofuge 15R), e o sobrenadante foi coletado. Na placa foi colocado tampão fosfato (100 mM/EDTA (5 mM), NADPH (8,4 μ M), GR (10 U/mg de proteína/mL), azida sódica (1,125 M), GSH 0,15 mM, tampão fosfato (EDTA 5 mM), H₂O₂ (2,2 mM) e 50 μ L da amostra. O monitoramento foi feito em espectrofotômetro (PG INSTRUMENTS; UV-VIS Spectrophotometer Model T80+) à 340 nm, 25°C por 8 minutos, em intervalos de um minuto. O resultado foi expresso em nanomoles por miligrama de proteína.

4.4.6 Mensuração de produtos da peroxidação lipídica

As mensurações dos produtos de peroxidação lipídica foram feitas de acordo com Bose *et al.*, (1989). Resumidamente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 10 vezes o volume de solução de tampão fosfato, contendo BHT (12,6 mM). Em seguida, 200 μ L do homogenato foram incubados a 90°C por 45 minutos com solução contendo TBA (0,37%),

em meio ácido (15% de ácido tricloroacético e 0,25 M de ácido clorídrico). As amostras, em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R). Retirou-se 300 µL do sobrenadante, acrescentou-se 300 µL de n-butanol e 30 µL de solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada por 2 minutos a 14000 rpm. Alíquotas do sobrenadante foram pipetadas em placas de 96 poços para a leitura de absorbância em leitor de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) à 535 nm, corrigindo pelos valores de absorbância à 572nm). A quantidade de malonaldeído (MDA) produzido foi expressa em nanomoles por miligrama de tecido, utilizando para o cálculo, um coeficiente de extinção molar de $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4.7 A medição dos níveis de creatina quinase

Os níveis de creatina quinase (CK) foram medidos por um ensaio enzimático (do kit CK-NAC Liquiform - Labtest), em amostras de perfusato a partir da circulação coronária do tempo total de reperfusão. Em um tubo contendo 1,0 mL do reagente de trabalho, adicionou-se 200 µL de amostra ou calibrador, homogeneizou-se e transferiu-se imediatamente para a cubeta termostatzada a 37°C. A absorbância inicial (A1) foi registrada e após 2 minutos registrou-se a segunda absorbância (A2). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (PG INSTRUMENTS; UV-VIS Spectrophotometer Model T80+) à 340 nm. A quantidade de CK produzida foi expressa em U/L de tecido e foi utilizado para o cálculo, o fator de 8121.

4.5 Tratamento estatístico dos dados

Para tratamento estatístico, as análises dos resultados obtidos foram processadas em *software* Prism 5.1 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos), LabChart 7 Pro *software* (ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e Windaq ProAcquisition (DATAQ Instruments, Akron, Ohio, Estados Unidos).

Os dados de coração isolado como a pressão ventricular esquerda, frequência cardíaca, PRi, QT_i, QRS, dP/dT, lipoperoxidação e atividade sequestradora do radical livre DPPH^{*}, TBARS, SOD, CAT e CK foram analisadas adotando-se a análise de variância ANOVA *one-way* para medidas paramétricas, seguidas do pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos.

A GPx e GR foram analisadas através do teste ANOVA *two-way* para medidas paramétricas, seguidas do pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos.

Para efeito estatístico, foram considerados significativos os valores que apresentavam $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Preparação da FAE

Após a secagem das folhas as mesmas foram trituradas e pesadas, dando um total de 2,2 kg. Após a evaporação foram obtidas 442,93 g da fração metanólica, 174,81 g da fração hexânica e 90,08 g da fração clorofórmica e 2,78 g da FAE, esta apresentando rendimento de 0,12%.

5.2 Prospecção Fitoquímica

Os resultados da prospecção fitoquímica da FAE estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 – Prospecção fitoquímica da fração acetato de etila da *C. rosea* (FAE)

Classes de metabólitos	FAE
Flavonas, flavonóis e flavanonas e xantonas	++
Leucoantocianidina	++
Catequinas	++
Taninos condensados	++
Taninos pirogálicos	-
Triterpenóides pentacíclicos	-
Saponinas	++
Esteroides livres	-
Resinas	-

(++) para teste positivo de coloração moderada e (-) para teste negativo.

5.3 Atividade antioxidante *in vitro* da FAE

A atividade antioxidante da FAE foi avaliada pelo PI do DPPH[•] e, por regressão linear, foi possível calcular o CE₅₀, ou seja, a concentração da amostra suficiente para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH[•]. Onde $C = - 2.3852A + 99.741$, onde C é a concentração de DPPH[•], A é a absorbância sendo o coeficiente de correlação foi de $R^2 = 0.9526$ (Figura 11).

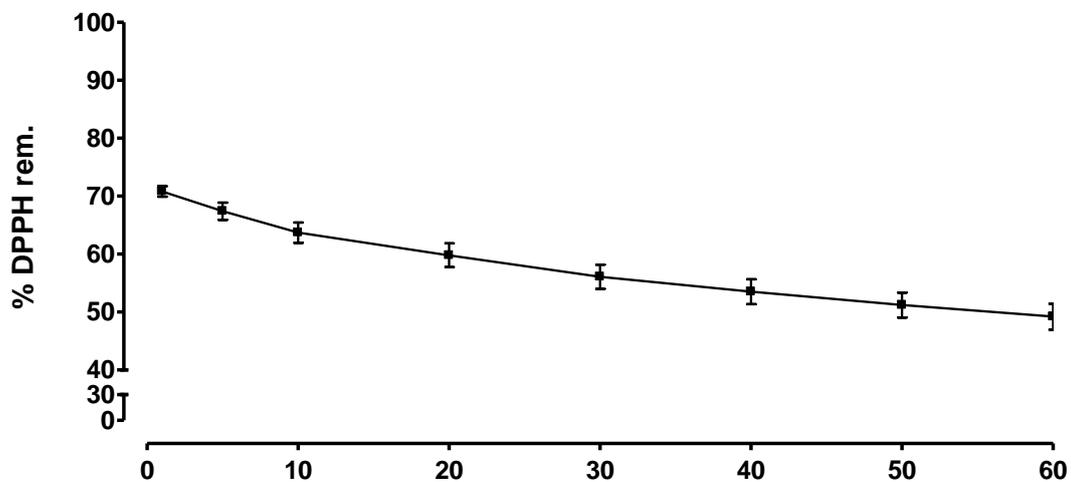


Figura 11 - Curva DPPH[•]

A atividade antioxidante da FAE pelo DPPH[•] está mostrada na Tabela 5. Na concentração de 30 µg/mL, a FAE promoveu uma redução significativa do DPPH[•] ($p < 0,001$), apresentando um PI de $46,7 \pm 3,5\%$ e uma CE₅₀ de $20,9 \pm 0,3$ µg/mL. O ácido gálico foi usado como controle positivo da atividade antioxidante. De acordo com o índice de atividade antioxidante (IAA), a FAE mostrou potencial antioxidante forte.

Tabela 5 - Atividade antioxidante da fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE) determinada pela redução do radical livre DPPH[•].

Amostras	PI (%)	IAA	CE ₅₀ (µg/mL ± e.p.m.)
FAE	46,7 ± 3,5*	1,4 ± 0,02*	20,9 ± 0,3*
Ácido gálico	92,0 ± 30,0	28,6 ± 0,05	1,05 ± 0,3

CE₅₀ e PI (porcentagem de inibição) dos extratos foram calculados no estado estacionário. IAA, índice de atividade antioxidante. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-teste de Bonferroni (*p < 0,001, n=3).

As diferentes concentrações testadas da FAE reduziram significativamente a lipoperoxidação induzida pelo FeSO₄, mesmo em baixas concentrações (Figura 12).

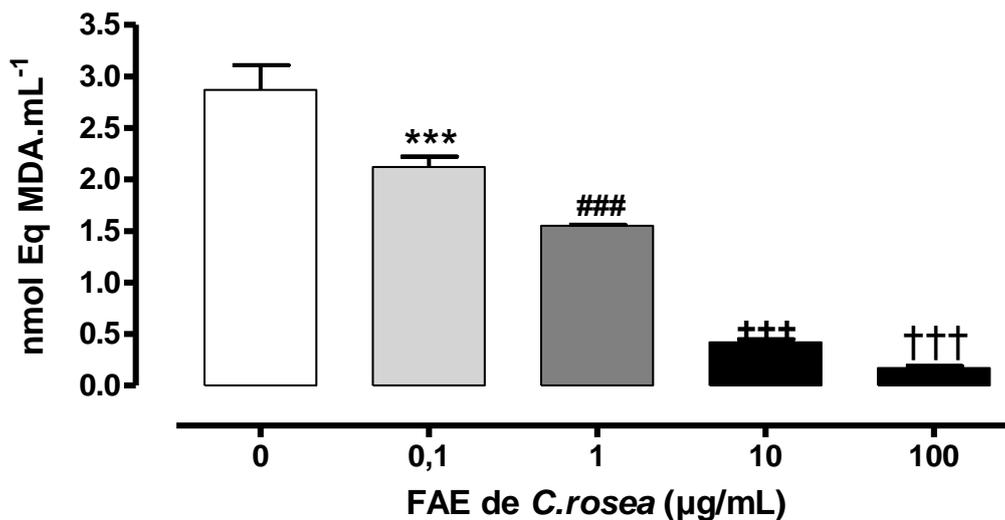


Figura 12 - Efeito da fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE) sobre a lipoperoxidação induzida por FeSO₄. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. (***, ###, +++, ††† p < 0,001: quando comparado ao controle - n = 3).

O mesmo teste também foi realizado com o controle positivo, o NAC. Como podemos observar na Figura 13, o NAC também reduziu significativamente a lipoperoxidação induzida pelo FeSO₄.

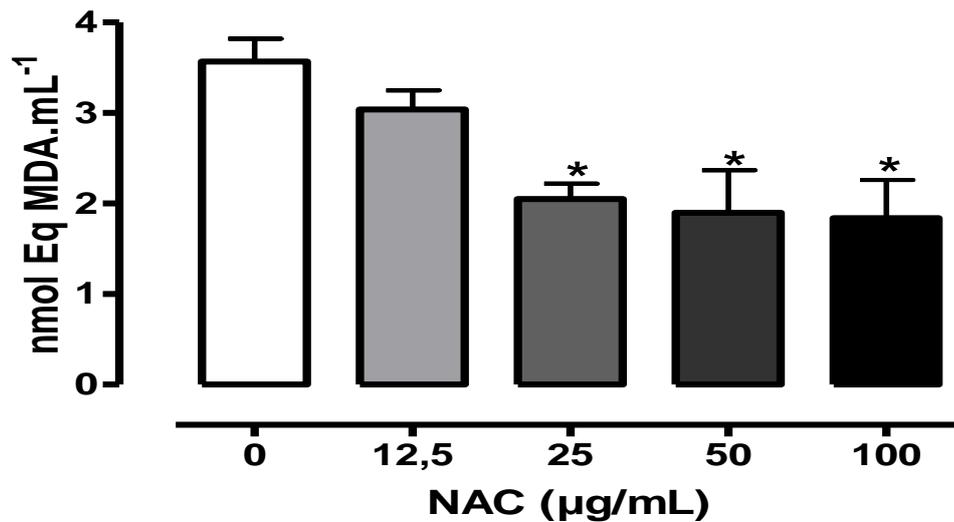


Figura 13 - Efeito do NAC sobre a lipoperoxidação induzida por FeSO₄. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. (*p < 0,05: quando comparado ao controle - n = 3).

Após a verificação do potencial antioxidante *in vitro*, o segundo passo foi verificar se a FAE tinha efeito sobre os parâmetros fisiológicos cardíacos. Sendo assim, medidas da atividade elétrica e contrátil foram realizadas em coração isolado de rato a fim de verificar se os efeitos vistos *in vitro* ocorriam também no sistema biológico.

5.4 Efeitos eletrocardiográficos da FAE em coração isolado

A Figura 14 mostra os parâmetros eletrocardiográficos (painéis A – C) avaliados em situação controle e após perfusão da FAE (300 µg/mL) em coração isolado de rato e os traçados típicos do ECG (painel D). Pode-se observar que a FAE provocou um aumento significativo na duração do intervalo PRi (painel A). Além disso, os resultados indicaram que a FAE também foi capaz de aumentar o intervalo QT (QTi) (painel B). As alterações no tempo de duração tanto do PRi quanto do QTi não foram reversíveis após lavarmos a preparação.

Os resultados mostraram que a FAE aumentou a duração do complexo QRS (painel C). Este resultado indica que a velocidade de propagação do impulso elétrico na massa ventricular sofreu retardo.

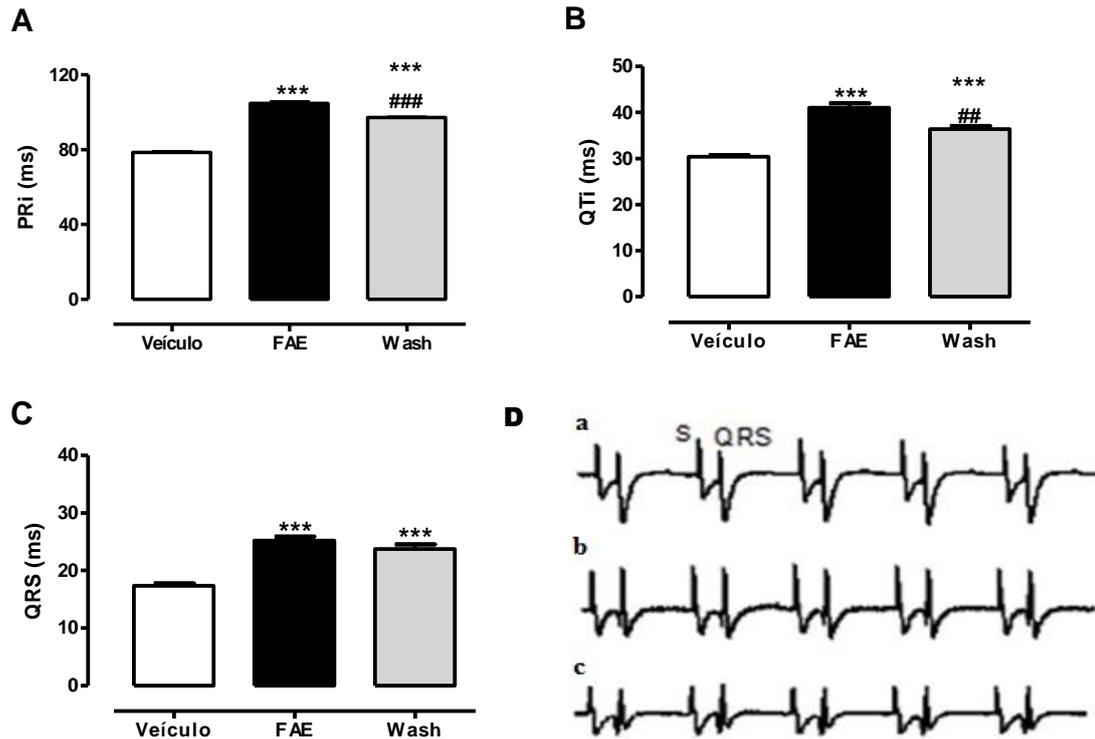


Figura 14- Parâmetros eletrocardiográficos avaliados antes (Veículo), durante (FAE) e depois (Wash) da perfusão da fração acetato de etila (FAE - 300 µg/mL) obtida da *C. rosea* em coração isolado de rato. (A) Intervalo PR (PRi), (B) intervalo QT (QTt), (C) complexo QRS (QRS) e (D) Traçados representativos mostrando o eletrocardiograma em coração de rato isolado estimulado eletricamente em (a) situação controle, (b) na presença da fração acetato de etila (FAE - 300 µg/mL) e (c) após o *wash*. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Veículo, ## $p < 0,05$ comparado com FAE, ### $p < 0,001$ comparado com FAE (n = 5). ANOVA *one-way* seguida do pós-teste Bonferroni.

5.5 Efeitos contráteis da FAE em coração isolado

Como a FAE foi capaz de alterar de forma significativa o perfil eletrocardiográfico em coração de rato, resolvemos avaliar a sua resposta contrátil em coração isolado através da medida da PVE. A Figura 15 mostra traçados representativos do registro simultâneo da PVE (painel A) e a análise dos registros estão representados quantitativamente (painel B) em situação controle (perfusão com o Veículo), após a perfusão com a FAE e após *wash*. Em coração estimulado eletricamente, podemos observar que a FAE promoveu uma redução significativa na PVE e após o *wash*, a força voltou parcialmente.

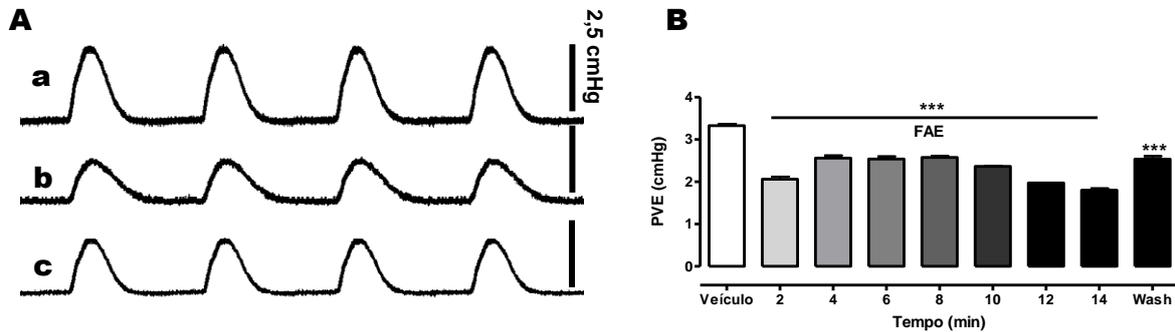


Figura 15 - Traçados representativos mostrando a pressão ventricular esquerda (PVE) (A) e análise dos registros experimentais (B) obtidos em coração de rato isolado estimulado eletricamente em situação controle (a), na presença da fração acetato de etila (FAE – 300 µg/mL) (b) e após o *wash* (c). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste Bonferroni (***) $p < 0,001$: quando comparado ao grupo Veículo; $n = 5$).

5.6 Efeitos cronotrópicos da FAE em coração isolado

Além de ter alterado os parâmetros eletrocardiográficos e a força contrátil do miocárdio, em coração batendo espontaneamente, a FAE promoveu uma diminuição significativa da frequência cardíaca (Figura 16). No painel A, podemos observar o aumento significativo do intervalo RR produzido pela FAE, o que reflete uma redução significativa na frequência cardíaca.

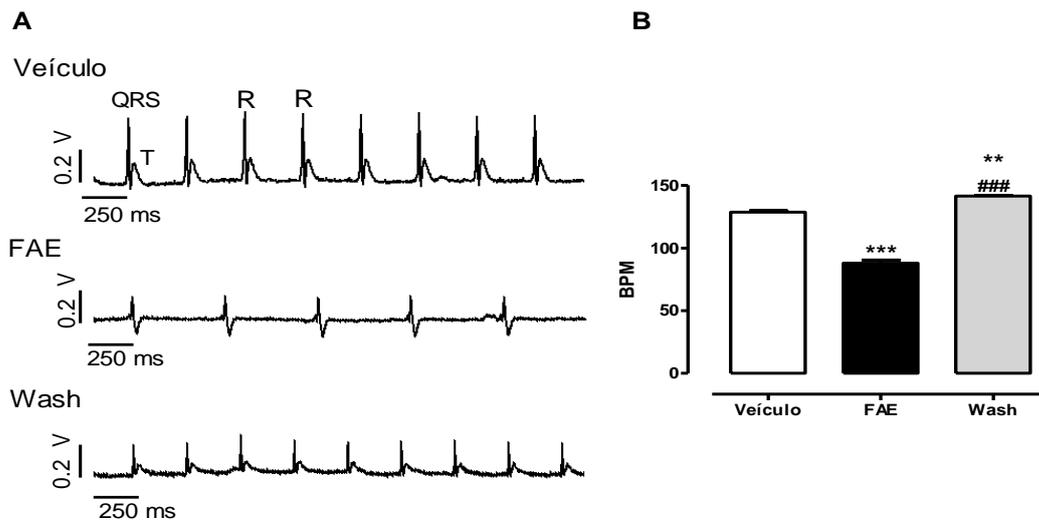


Figura 16 - Efeitos da fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE) sobre a atividade elétrica e frequência cardíaca em coração isolado de rato. (A) registros eletrocardiográficos em situação controle, perfusão com FAE e *wash*. (B) Análise quantitativa da frequência cardíaca em coração isolado de rato perfundidos 20 minutos com FAE. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,001$ comparado com o Veículo, *** $p < 0,001$ comparado com grupo Veículo, ** $p < 0,01$ comparado com FAE; ### $p < 0,001$ comparado com grupo FAE (n = 5). BPM = batimentos por minuto.

O próximo passo deste estudo foi avaliar a utilização da FAE em corações isquêmicos de ratos previamente perfundidos com a mesma, visto que apresentou potente efeito antioxidante *in vitro*, tais características levaram a crer que a fração poderia ser utilizada como cardioprotetora neste evento patológico.

5.7 Efeitos da FAE sob a injúria de reperfusão em coração isolado

No modelo experimental de isquemia-reperfusão, foram avaliados os efeitos da FAE sobre a pressão ventricular máxima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo de rato, frequência cardíaca e dP/dt máxima e mínima.

5.7.1 Pressão Ventricular Esquerda

Os resultados mostraram que a perfusão prévia somente com o veículo promoveu uma diminuição significativa da PVE após a reperfusão, mostrando assim, prejuízo deste parâmetro em comparação ao grupo que não sofreu manobra isquêmica (grupo *Sham*). A

perfusão prévia tanto com a FAE (300 µg/mL) quanto com o NAC foi capaz de prevenir a redução da PVE induzida pela isquemia.

Os resultados dos experimentos mostraram que a perfusão prévia com a FAE foi capaz de produzir uma melhora significativa da pressão ventricular após a reperfusão pós-isquêmica quando comparados ao grupo Veículo + I/R e ao NAC (Figura 17).

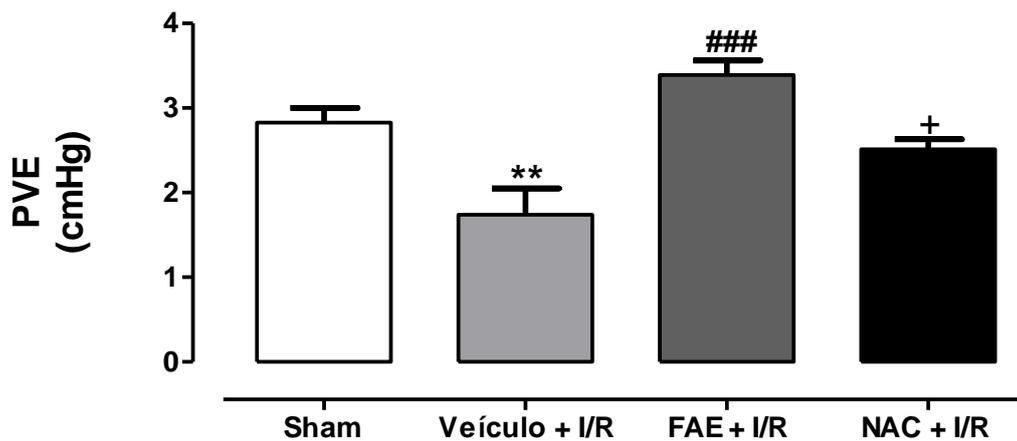


Figura 17 - Pressão ventricular esquerda (PVE) medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE) e submetido à isquemia e reperfusão. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$: quando comparado ao grupo *Sham*, ### $p < 0,001$: quando comparado ao grupo Veículo + I/R, + $p < 0,05$ quando comparado ao grupo FAE + I/R (n = 6).

5.7.2 dP/dt

Os resultados da perfusão prévia com a FAE também mostraram diminuição significativa da dP/dt máxima, quando comparados ao Veículo, porém foi menor do que comparado tanto ao Veículo quanto ao NAC (Figura 18).

A redução da taxa máxima de mudança de força através do tempo (dP/dt) encontrado reforça o efeito inotrópico negativo promovido pela FAE uma vez que, tanto a dP/dt máxima quanto a pressão ventricular sistólica, são consideradas marcadores de função sistólica e utilizadas como índice de contratilidade miocárdica.

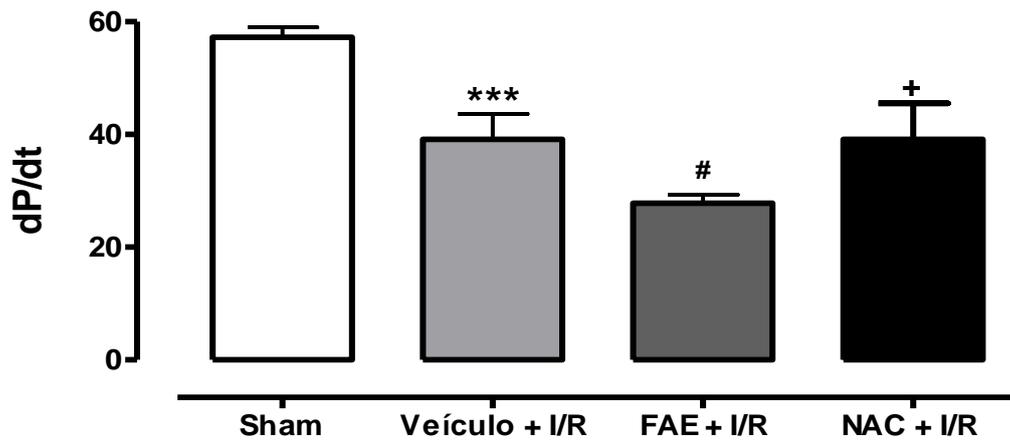


Figura 18 - Efeito sobre o incremento máximo na pressão ventricular (dP/dT máxima) desenvolvida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL) e submetido à isquemia e reperfusão. Os valores foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$: quando comparado ao grupo *Sham*, # $p < 0,05$: quando comparado ao grupo I/R + Veículo, + $p < 0,05$: quando comparado ao grupo I/R + FAE (n=6).

A FAE não promoveu um efeito lusitrópico negativo como verificado pela dP/dt mínima. Nos grupos FAE + I/R e NAC + I/R a dP/dt mínima não se apresentou significativamente diferente do grupo Veículo + I/R (Figura 19).

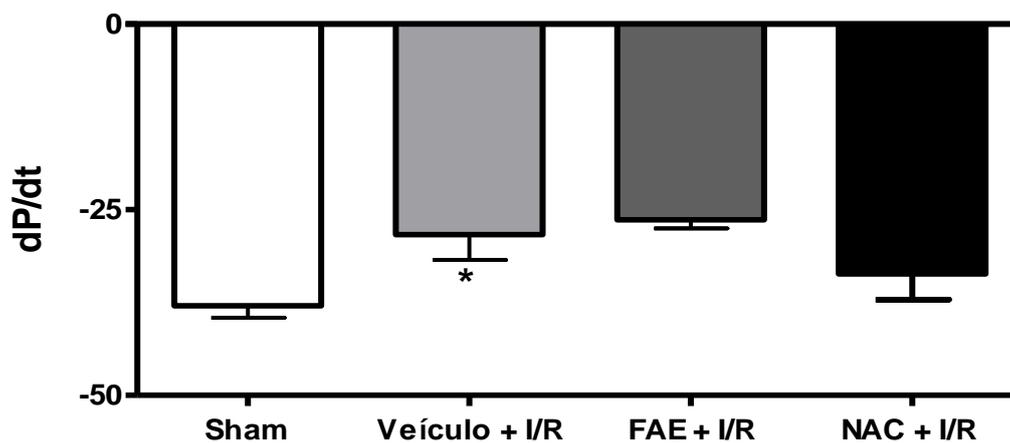


Figura 19 - Efeito sobre o decremento máximo na pressão ventricular (dP/dT mínima) desenvolvida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL) e submetido à isquemia e reperfusão. Os valores foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo *Sham*, (n=6).

5.7.3 Frequência Cardíaca

Como mostrado na Figura 16 (painel B), a FAE diminuiu os batimentos cardíacos, porém após um período isquêmico de 30 minutos, há uma recuperação destes batimentos, Figura 20, de tal forma que não foi encontrada diferença significativa entre este e o grupo que não sofreu nenhuma manobra isquêmica.

Neste contexto pode-se observar que o grupo Veículo + I/R, após a isquemia, teve um ligeiro decréscimo nos batimentos. Vale ressaltar que, ao se comparar este grupo ao *Sham*, na perfusão controle (antes do evento isquêmico) não apresentou diferença significativa evidenciando que veículo utilizado não alterou este parâmetro.

Já no controle positivo, NAC + I/R, o N-acetil-L-cisteína provocou melhora nos batimentos, porém menos pronunciado que a FAE.

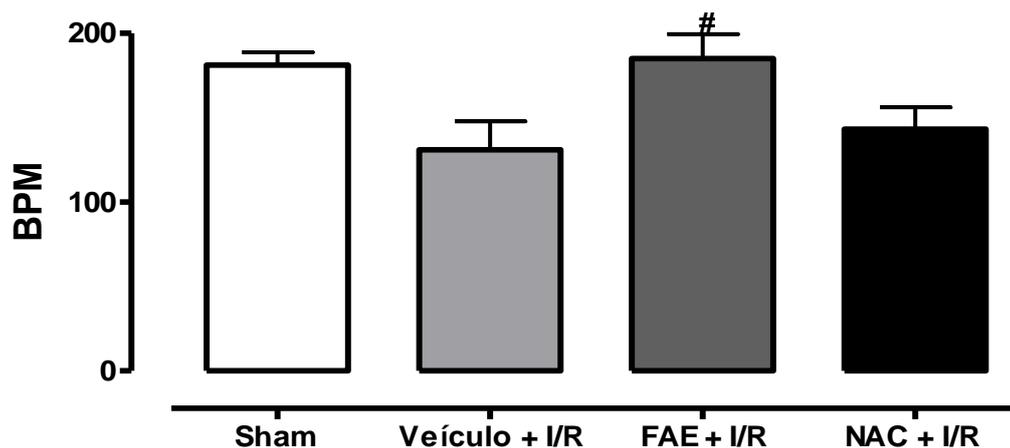


Figura 20 - Efeito sobre os batimentos cardíacos desenvolvido em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila *C. rosea* (FAE– 300 µg/mL) de, e submetido à isquemia e reperfusão. Valores demonstram a recuperação dos batimentos cardíacos após a isquemia de 30 minutos, num intervalo de 60 minutos de reperfusão com a solução Veículo. Os valores foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni. [#]p<0,05: quando comparado ao grupo Veículo + I/R (n=6).

Para avaliar o efeito da FAE sobre os eventos arrítmicos provocados pelos danos provocados pela reperfusão, analisamos o índice de severidade das arritmias após a isquemia.

5.7.4 Índice de Severidade de Arritmia (ISA)

As arritmias cardíacas foram definidas como a presença de taquicardia e/ou fibrilação ventricular depois que o fluxo foi reestabelecido. A classificação das arritmias foram feitas segundo Oliveira *et al.*, (2007), onde estes fenômenos foram classificados baseado na sua duração.

Para obter uma medida quantitativa, as arritmias foram classificadas arbitrariamente por sua duração, e quando esta era maior ou igual a 30 minutos, seria considerada uma arritmia irreversível. Em relação à severidade das arritmias, os corações perfundidos previamente com FAE apresentaram menor ISA (Figura 21).

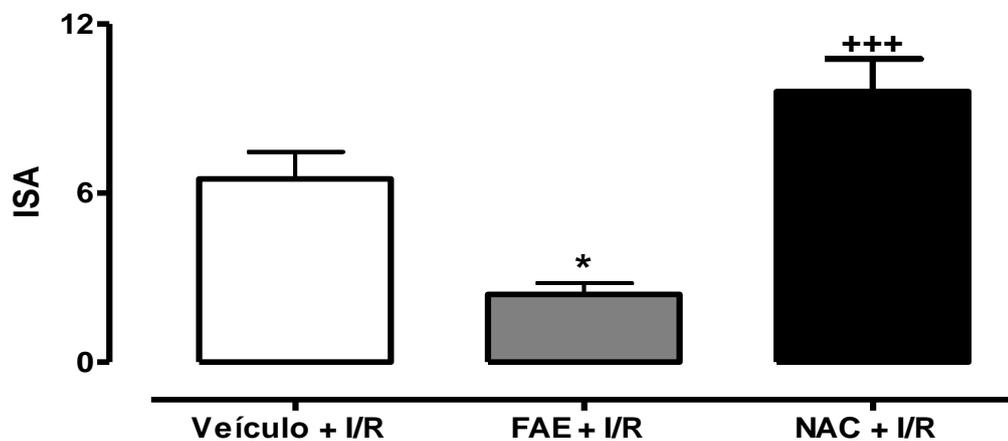


Figura 21 - Índice de Severidade de Arritmia (ISA) em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. Os valores obtidos através dessa classificação foram expressos como média ± e.p.m e ANOVA *one-way* seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$: quando comparado ao grupo Veículo + I/R, +++ $p < 0,001$: quando comparado ao grupo FAE + I/R (n=5).

A fim de tentarmos entender os mecanismos celulares envolvidos nos efeitos da FAE, investigamos a atividade de enzimas antioxidantes importantes presentes no coração.

5.8 Efeito da FAE sobre a atividade de enzimas antioxidantes após o processo de isquemia.

Como era esperado, a peroxidação lipídica no tecido muscular, aumentou significativamente no grupo Veículo ($0,20 \pm 0,02$ nmol de MDA/mg de tecido), quando comparada ao grupo *Sham* ($0,07 \pm 0,003$ nmol de MDA/ mg de tecido), conforme observado na Figura 22. Observamos também diminuição significativa quando comparado ao grupo FAE ($0,04 \pm 0,001$ nmol de MDA/mg de tecido).

Não foram observadas alterações nas medidas de TBARS entre os grupos *Sham*, FAE e NAC. Como se pôde verificar, os corações perfundidos previamente com a FAE apresentaram medidas de MDA menores do que as aferidas no grupo NAC ($0,07 \pm 0,01$ nmol de MDA/mg de tecido).

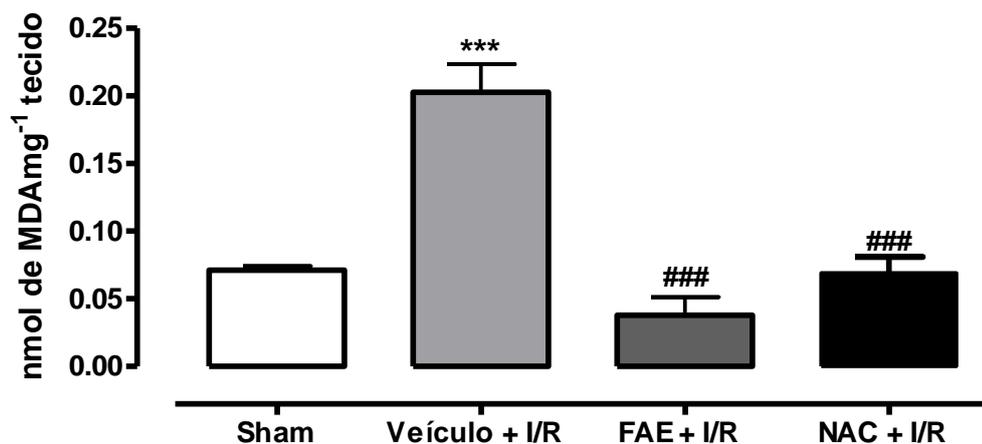


Figura 22 - Avaliação da peroxidação medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. Os níveis de MDA foram expressos como média \pm e.p.m e ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$: quando comparado ao grupo *Sham*, ### $p < 0,001$: quando comparado ao grupo Veículo + I/R (n=5).

A atividade da SOD foi avaliada segundo Madesh e Balasubramanian e adaptado por Marklund (1974). Nos tecidos cardíaco perfundidos previamente com FAE e submetidos a reperfusão após manobra de isquemia, a atividade desta enzima encontrou-se aumentada ($10,40 \pm 1,66$ U/mg de proteína) quando comparada aos tecidos perfundidos com o veículo ($9,001 \pm 1,053$ U/mg de proteína), como mostrado na Figura 23.

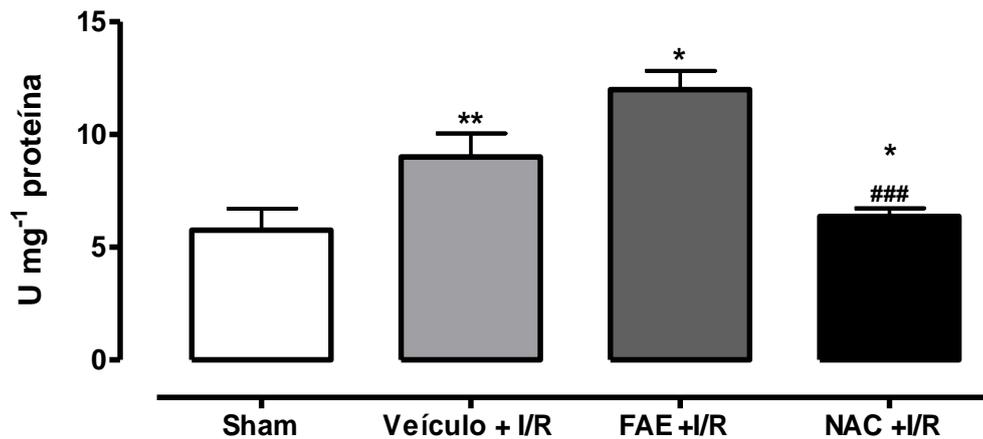


Figura 23 - Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. A atividade foi expressa como média ± e.p.m e ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$: quando comparado ao grupo *Sham*, # $p < 0,05$: quando comparado ao grupo Veículo + I/R, +++ $p < 0,001$: quando comparado ao grupo FAE + I/R (n=5).

Na cascata de formação de ERO, o $O_2^{\cdot -}$ é o primeiro radical formado e a SOD catalisa a reação para a dismutação do H_2O_2 . Este último pode servir como substrato para duas enzimas antioxidantes, a GPx e a CAT.

Diante deste fato, avaliamos também a atividade destas duas enzimas e, como pode ser observado na Figura 24, a FAE foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,01$) a atividade da GPx no tecido cardíaco submetido à isquemia quando comparado ao Veículo + I/R.

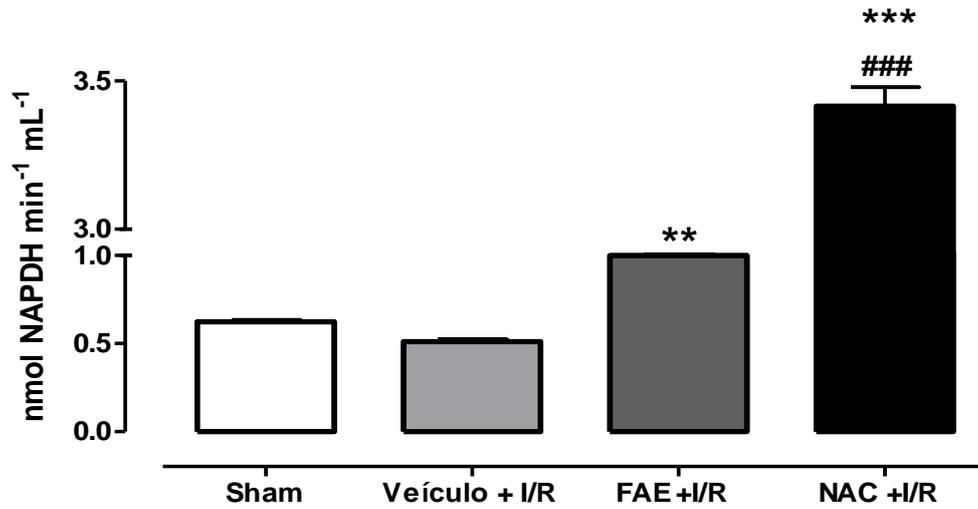


Figura 24 - Avaliação da atividade da glutathiona peroxidase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. A atividade foi expressa como média ± e.p.m e ANOVA *two-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo FAE + I/R (n=5).

Já quando analisamos a GR, Figura 25, podemos observar que a FAE reduziu a atividade desta ($p < 0,001$).

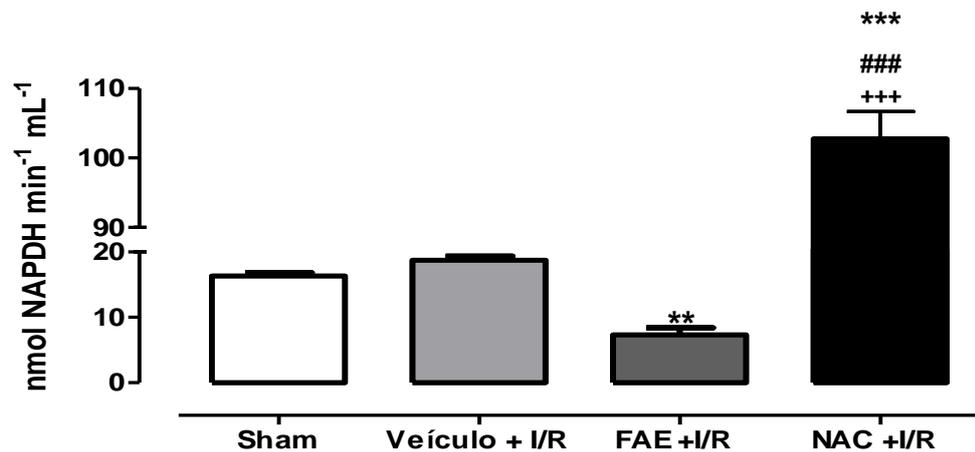


Figura 25 - Avaliação da atividade da glutathiona redutase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. A atividade foi expressa como média ± e.p.m e ANOVA *two-way* seguido do teste Bonferroni. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Veículo + I/R, +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo FAE + I/R (n=5).

A enzima CAT está presente na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como o cérebro, coração e músculo esquelético contém, no entanto, pequenas quantidades da enzima (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). Como mostrado na Figura 26, a atividade da CAT não se mostrou diferente no grupo FAE + I/R.

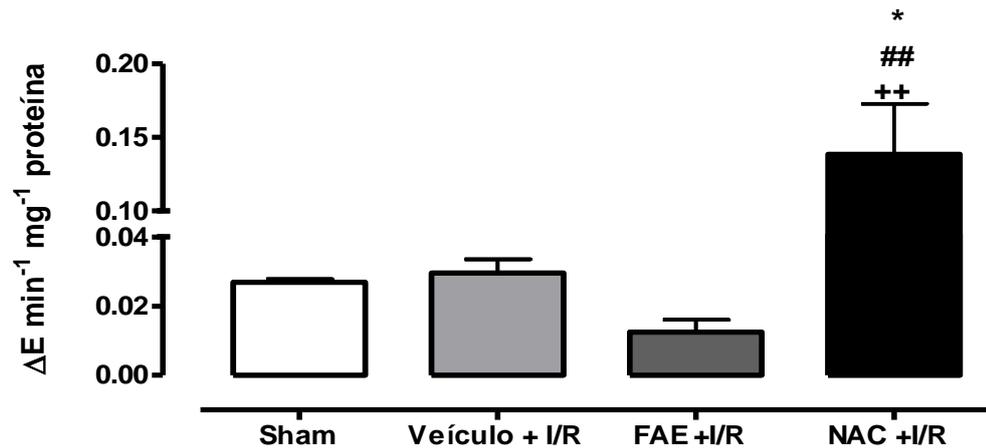


Figura 26- Avaliação da atividade catalase em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperusão. A atividade foi expressa como média ± e.p.m e ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni . *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*; ## p<0,01 quando comparado ao grupo Veículo + I/R; ++p<0,01 quando comparado ao grupo FAE + I/R (n=5).

A medida da CK no perfusato foi utilizada como marcador de lesão miocárdica em amostras coletadas durante todo o tempo experimental (perfusão e reperusão pós-isquêmica). No grupo Veículo + I/R pudemos verificar aumento significativo deste marcador ($72,1 \pm 9,0$ U/L) quando comparado ao grupo *Sham* ($22,2 \pm 3,2$ U/L). Quando comparamos aos corações perfundidos previamente com FAE ($17,9 \pm 6,2$ U/L) podemos observar que esta fração foi capaz de reduzir significativamente os níveis de CK, Figura 27.

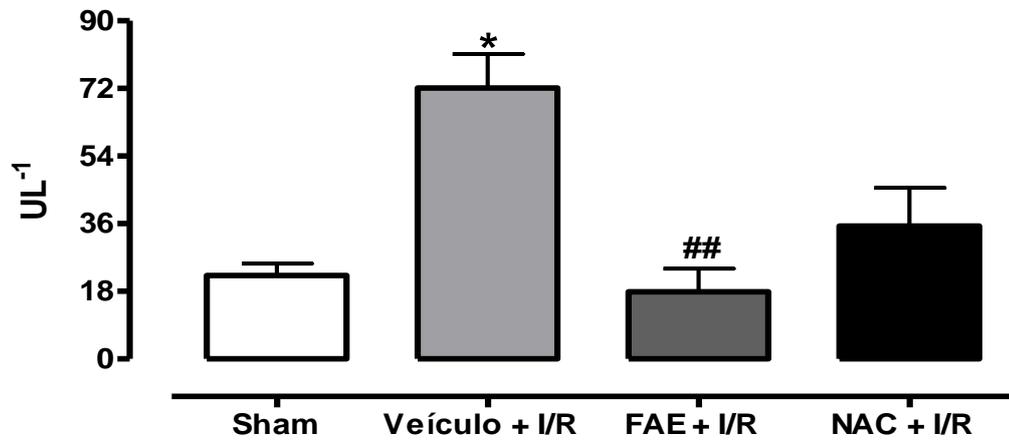


Figura 27 - Avaliação da atividade da creatina quinase medida em coração isolado de rato perfundido previamente com fração acetato de etila de *C. rosea* (FAE – 300 µg/mL), e submetido à isquemia e reperfusão. A atividade foi expressa como média ± e.p.m e ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo *Sham*, ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Veículo + I/R (n=5).

6 DISCUSSÃO

O IAM é responsável pela morte de milhões de pessoas em todo o mundo a cada ano, com uma taxa de mortalidade de cerca de 10%, sendo a principal causa de insuficiência cardíaca crônica. Não obstante, estratégias para reduzir o tamanho do infarto e reduzir todas as manifestações da lesão pós-isquêmica têm sido desenvolvidas (AVEZUM *et al.*, 2004). Esta lesão pós-isquêmica, ou lesão de reperfusão, ocorre no coração de maneira reversível e/ou irreversível logo após a estabilização do fluxo (PINHEIRO *et al.*, 1999).

Entre as lesões de reperfusão podemos incluir as arritmias (disfunção mecânica transitória do coração), lesão microvascular (AVEZUM *et al.*, 2004), bem como as respostas inflamatórias. Na reperfusão, a morte celular pode ocorrer devido a apoptose e necrose (HAENDCHEN *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 2003).

Uma grande produção de espécies reativas de oxigênio ocorre durante a isquemia e reperfusão tecidual, porém, ocorre uma recuperação promovida por agentes antioxidantes endógenos (VALKO *et al.*, 2007). Os removedores de radicais livres ou antioxidantes naturais têm efeitos cardioprotetores em modelos experimentais de isquemia-reperfusão (WANG *et al.*, 2011).

Neste estudo foi avaliado o potencial antioxidante da FAE e posteriormente, estudado, passo a passo, o seu efeito sobre parâmetros da função cardíaca. Foi também avaliada sua ação no sistema redox celular em modelo de isquemia, para ver a prevenção de possíveis danos da injúria de reperfusão provocado pelo estresse oxidativo, em coração isolado de rato. Desta forma, foi verificado se tais propriedades preveniriam o dano tecidual promovido pela injúria de reperfusão cardíaca, proporcionando, um melhor estado de vitalidade após um desafio estressor.

Segundo Dornas *et al.*, (2007), plantas medicinais e condimentares que contenham flavonoides são usadas há milhares de anos na medicina oriental. Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (BRAVO, 1998 citado por DORNAS *et al.*, 2007).

Antes dos testes antioxidantes *in vitro* foi realizada uma prospecção fitoquímica da FAE a fim de conhecer os constituintes da mesma que indicasse seu potencial antioxidante.

Na prospecção fitoquímica foram identificados flavonas, flavonoides, flavanonas, xantonas, leucoantocianidina, catequinas, taninos condensados e saponinas.

Num levantamento bibliográfico, pudemos observar que estas substâncias são em sua grande maioria antioxidantes. As antocianidinas são pigmentos vegetais, nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (KÄHKÖNEN e HEINONEN, 2003 citado por DORNAS *et al.*, 2007).

Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas fazem parte de uma classe de flavonóides nos quais é possível encontrar estruturas oligomerizadas. Estudos *in vivo*, com o extrato de sementes de uvas (*Vitis sp*) contendo proantocianidinas, comprovam eficácia desse como eliminador de radicais livres e inibidor de danos oxidativos nos tecidos com ação superior ao da vitamina C, E e β -caroteno (BAGCHI *et al.*, 1998 citado por DORNAS *et al.*, 2007). Além disso, resultados experimentais demonstram que proantocianidina inibe não competitivamente a xantina oxidase (uma das enzimas responsáveis pela formação de radicais livres), e as enzimas elastase, colagenase, hialurorinase e β -glicoronidase (DORNAS *et al.*, 2007; BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995).

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular, pela presença de hidroxilas, destacando-se as que se localizam na posição C3 e C4. As hidroxilas podem doar elétrons e suportar, como resultado, a deslocalização em torno do sistema aromático, potencializando o seu efeito antioxidante (LIEN *et al.*, 1999).. Evidências epidemiológicas crescentes sugerem que há correlação negativa entre consumo de alimentos ou bebidas ricas em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares (REIN *et al.*, 2000).

Segundo Dornas *et al.*, (2007), vários autores evidenciaram que os polifenóis poderiam inibir a agregação plaquetária por diferentes mecanismos, incluindo inibição da lipoxigenase, ciclooxigenase (LAUGHTON *et al.*, 1991) e AMPc (LANDOLFI *et al.*, 1984). Outros efeitos inibitórios de plaqueta incluem antagonismo de receptor de tromboxano (TZENG *et al.*, 1991), varredores de ROS como ânion superóxido (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988), diminuição da ativação da fosfolipase C (PIGNATELLI *et al.*, 2000) e inibição da peroxidação lipídica (GRYGLEWSKI *et al.*, 1987). Flavonoides também aumentam a produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio (ANDRIAMBELOSON *et al.*,

1997) que é potente inibidor da adesão e agregação plaquetárias e trombose (FREEDMAN *et al.*, 1997; Idem, 1998).

Estudos epidemiológicos em humanos também apoiam a ideia de que o baixo risco de câncer está fortemente associado a dietas ricas em antioxidantes (LEE *et al.*, 2003). Destes, o H₂O₂ é maior indutor de doenças humanas incluindo câncer, doença cardíaca e doença cerebrovascular por meio de diversos processos celulares, embora altas doses possam reduzir o crescimento de células tumorais (LEE *et al.*, 2003; HEO *et al.*, 2004).

A *posteriori*, verificamos a atividade sequestradora da FAE sobre o DPPH^{*}. A fração apresentou um potencial de inibição de $46,7 \pm 3,5\%$, e o IAA a classificou como forte antioxidante (acima de 1,0) sendo sua CE₅₀ de $20,9 \pm 0,3\%$. Este potencial antioxidante é observado em plantas que contém substâncias como antocianinas, lecitinas e compostos fenólicos, principalmente, flavonoides (JUSTO *et al.*, 2008). Estes achados corroboram nossos resultados, acreditamos que, possivelmente, os flavonoides, juntamente com outras substâncias presentes na fração em estudo, foram os responsáveis pelo efeito antioxidante observado.

Diante disto, os resultados aqui apresentados demonstraram que a FAE tem potencial antioxidante similar ao de outras substâncias como, por exemplo, extrato aquoso do broto de feijão-mungo (*Vigna radiata L.*) visto por Lima *et al.*, (2004), que avaliaram a atividade antioxidante deste em sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico. O extrato deste apresentou atividade oxidante (48,07% de inibição) embora tenha sido inferior ao BHT usado como referência (citado por RAMALHO *et al.*, 2006).

Kurian *et al.*, (2010), ao estudarem a fração acetato de etila de *Desmodium gangeticum*, que já era utilizada popularmente na Índia, observaram que a mesma apresentou, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, um potencial de inibição de $89,25 \pm 2,11\%$ e de $0,10 \pm 0,03\%$ quando a concentração foi de 5 $\mu\text{g/mL}$. Ainda pôde verificar que a CE₅₀ foi de $36,3 \pm 1,47$, mostrando que através do DPPH^{*}, a mesma podia ser um agente antioxidante.

Segundo Lima *et al.*, (2004), evidenciaram que a ação antioxidante desse vegetal está relacionada ao teor de compostos fenólicos, assim como aconteceu com o extrato aquoso de canela, com 60%, germe de trigo e ginseng, com 64,9 e 69,1% de inibição da oxidação, respectivamente. Também utilizando o β -caroteno/ácido linoleico. Melo *et al.*, (2003), avaliaram a atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum L.*). O extrato

aquoso exibiu 69,8% e o extrato etéreo 51,9% de proteção contra a oxidação, sendo essa habilidade atribuída, respectivamente, aos seus constituintes fenólicos e carotenoides (citado por RAMALHO *et al.*, 2006).

Como visto, os flavonoides presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e, além disto, como quelantes de metais (WANG *et al.*, 2011). Quando sais de ferro são adicionados à meio de cultura celular, podem reagir com o oxigênio e formar radical ânion superóxido que ainda poderá sofrer dismutação à H_2O_2 , podendo iniciar a peroxidação lipídica.

No presente trabalho esses efeitos foram observados através dos níveis de formação de TBARS, através do indutor $FeSO_4$. A proteção contra a lipoperoxidação induzida por $FeSO_4$ foi observada. Esta ação pode ter sido promovida pelos flavonoides, sendo estes, ou outro grupo, agentes quelantes e que estão presentes na FAE. Estes agentes “sequestram” os íons metálicos, formando quelatos que possibilitam a neutralização das espécies oxidantes.

Em nossos resultados verificamos que não houve diferença significativa entre o efeito antioxidante da FAE e do NAC (controle positivo para atividade antioxidante) na reação de lipoperoxidação induzida pelo $FeSO_4$, indicando, desta forma, que a FAE tem um efeito antioxidante importante.

Esta ação também foi observada por Schmitz *et al.*, (2011), quando estudou o efeito do chá verde como um antioxidante importante, capaz de proteger as células contra a ação dos radicais livres. Estes resultados corroboraram os estudos realizados por Jun *et al.*, (2002), e Saffari e Sadrzadeh (2004), que também sugeriram efeito antioxidante do chá verde, diminuindo a lipoperoxidação em membranas celulares.

A inibição da lipoperoxidação através de substâncias antioxidantes reduz a formação de $ROO\bullet$ bem como, das espécies reativas alcóxila ($RO\bullet$) e hidroxila ($OH\bullet$) produzidas por reações do tipo Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Contudo, o mecanismo proposto na supressão da lipoperoxidação envolve a formação de metabólitos secundários estáveis (SOUSA *et al.*, 2007; RAMALHO *et al.*, 2006).

Após a verificação do efeito antioxidante da FAE, partimos para a avaliação dos efeitos desta fração sobre o tecido cardíaco. Os parâmetros eletrocardiográficos foram avaliados em situação controle e após perfusão da FAE (300 $\mu g/mL$) em coração isolado de rato. Podemos observar que a FAE provocou um aumento médio de 25% na duração do PRi,

ou seja, induziu um retardo na propagação da onda elétrica através do NAV e/ou no sistema His-Purkinje. Esse tipo de efeito pode ser chamado de BAV de 1º grau. Nessa magnitude de bloqueio, os estímulos atriais são capazes de despolarizar os ventrículos com algum retardo, havendo apenas o aumento do PRi. Esse resultado pode ser decorrente da redução da entrada de cálcio no miocárdio, responsável tanto pela redução da força contrátil como pela redução da frequência cardíaca.

Além disso, os resultados mostraram que a FAE também foi capaz de aumentar o QT_i. Este intervalo foi medido do início do complexo QRS ao fim da onda T e representa a sístole elétrica ventricular, que corresponde ao tempo total de despolarização e repolarização ventricular, ou seja, é a duração do potencial de ação ventricular (AZEVEDO *et al.*, 1999). Este resultado mostra que o extrato dificultou a repolarização ventricular, efeito este, decorrente da inibição de correntes para potássio.

A velocidade de propagação do impulso elétrico na massa dos ventrículos pode ser medida indiretamente através da duração do complexo QRS. Dessa forma, os resultados mostraram que a FAE aumentou a duração do complexo QRS. Sabe-se que a velocidade de propagação do potencial de ação através do sistema excito-condutor dos ventrículos depende fundamentalmente de correntes rápidas de Na⁺ (JACK *et al.*, 1975 citado por VASCONCELOS, 2005). Drogas ou manobras experimentais que levam à diminuição de tais correntes contribuem para reduzir a primeira derivativa temporal da fase de despolarização do potencial de ação cardíaco, e isto, tornaria mais lento a condução do impulso elétrico, tanto em célula atrial, quanto ventricular. O aumento da duração do complexo QRS fornece fortes indícios de que as correntes rápidas de Na⁺ poderiam estar sendo bloqueadas pela ação da fração.

A FAE produziu, ainda, inotropismo negativo medido através da pressão interna do ventrículo esquerdo, após 8 minutos de perfusão do coração com 300 µg/mL da FAE (1,68 ± 0,02 cmHg para 0,92 ± 0,01 cmHg, p < 0,001). Assim como Cerqueira *et al.*, (2011), que verificaram que a R(+)-pulegona, um monoterpene encontrado em plantas pertencentes ao gênero *Mentha*, apresentava inotropismo negativo. Nossos resultados apontam que além de alterar a atividade elétrica do coração, a FAE reduziu a contratilidade do ventrículo esquerdo. Este efeito foi parcialmente reversível após lavarmos a FAE da preparação. Um efeito similar foi observado por Cerqueira *et al.*, (2011), onde tais autores verificaram bloqueio dos canais para cálcio e conseqüente diminuição do cálcio disponibilizado para contração. O extrato

obtido das folhas de *Costus spiralis* também induziu efeito inotrópico negativo, porém em coração de cobaia, por reduzir a entrada de cálcio no miocárdio e o aumento transitório de cálcio durante a contração (BRITTO *et al.*, 2011).

A frequência cardíaca é normalmente controlada pelo marcapasso primário do coração, que é o NS. Em nosso trabalho, em todos os corações analisados, a frequência cardíaca foi reduzida significativamente após a perfusão com a FAE. Esse resultado mostrou que esta fração também alterou a atividade marcapasso do coração isolado de rato, este efeito também é observado com os agonistas opioides que diminuem a frequência cardíaca (GOZZANI, 1994). Santos *et al.*, (2010), observaram, em seu estudo, que o extrato hidroalcoólico de *Alpinia speciosa* reduziu a força atrial e a pressão arterial sistêmica de rato.

As células marcapasso do coração exibem a propriedade de automacidade com resultado de uma gradual despolarização durante a diástole elétrica (despolarização diastólica lenta - DDL). A DDL e a fase de despolarização do potencial de ação do marcapasso são processos essenciais para a formação do impulso elétrico do NSA. Estes fenômenos estão intimamente ligados ao influxo de cálcio através do sarcolema. Quando essa corrente está severamente reduzida ocorre o desacoplamento eletromecânico do miocárdio e os marcapassos do coração são silenciados ou promovem redução da frequência cardíaca (LOSSNITZER *et al.*, 1984 citado por VASCONCELOS, 2005).

De acordo com o Lipsius *et al.*, (2001), citado por Vasconcelos (2005), muitas correntes iônicas contribuem para a DDL: 1) surgimento da corrente de sódio tipo *funny*, (I_f) e que é a ativada pela hiperpolarização; 2) redução da corrente de efluxo de K^+ ; 3) aumento da corrente do trocador Na^+/Ca^{+2} e, 4) aumento das correntes de influxo de Ca^{+2} pelos canais de cálcio do tipo L e T. A contribuição individual destas correntes para a atividade marcapasso é, no entanto, ainda controversa. Para diminuir a frequência cardíaca, como de fato a FAE faz, uma ou mais dessas correntes devem estar alteradas.

Após estas elucidações, avançamos no estudo a fim de esclarecermos se a FAE poderia diminuir os danos em coração de rato promovido pela injúria de reperfusão após um período isquêmico de 30 minutos. Na isquemia e reperfusão do coração, radicais livres derivados de oxigênio desempenham um papel importante na gênese de lesão tecidual. Muitos autores têm demonstrado que sequestradores de radicais livres reduzem lesões provocadas por estas últimas em coração reperfundidos após isquemia. Tais fatos dão suporte do seu uso como potenciais terapêuticos (LU *et al.*, 2011).

Os efeitos deletérios das ERO sobre o tecido cardíaco podem ser bloqueados por enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT. Estes estudos indicam que os antioxidantes capazes de sequestrar as ERO, como o $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , e os radicais peroxil (ROO^{\cdot}), podem ter vantagens terapêuticas para tratar a lesão cardíaca isquêmica mediada pela reperfusão. Assim, existe uma necessidade de compreender e identificar intervenções antioxidantes adequadas para salvar o miocárdio a partir de danos teciduais decorrentes da I/R (LU *et al.*, 2011).

Os resultados dos nossos experimentos com a perfusão prévia com FAE no coração isolado, e posterior indução de isquemia, mostraram que esta fração foi capaz de produzir uma melhora significativa da pressão ventricular após a reperfusão tecidual. Podemos observar também, que a perfusão prévia com NAC promoveu melhora neste parâmetro avaliado, quando comparado com o grupo Veículo + I/R.

As derivadas máximas da pressão ventricular nas fases de sístole (+dP/dt) e diástole (-dP/dt), que são parâmetros que avaliam a velocidade em que os fenômenos da contração e relaxamento acontecem, respectivamente, foram avaliados. Os resultados revelaram que a FAE promoveu um decréscimo significativo desses parâmetros indicando que, na presença da FAE, a velocidade da sístole e diástole ficou diminuída em relação ao controle.

Durante perfusão da FAE, confirmamos uma redução da frequência cardíaca, porém após o período isquêmico, a frequência cardíaca obteve um aumento significativo em relação ao grupo Veículo. Semelhante aos bloqueadores β -adrenérgicos, a FAE provoca uma diminuição da contratilidade, da velocidade da contração cardíaca e diminuição da frequência cardíaca. Os β -bloqueadores levam a uma diminuição do consumo de oxigênio pelo miocárdio, uma das razões do seu efeito benéfico na doença coronariana. Diminuem, ainda, a velocidade de condução do estímulo elétrico cardíaco e aumentam o tempo de condução no NAV e são muito úteis no tratamento da taquicardia supraventricular.

O ISA foi calculado e pudemos verificar que este índice apresentou redução significativa no grupo perfundido previamente pela FAE, sendo significativamente melhor do que o grupo previamente perfundido com o veículo. Este dado corrobora nossos resultados anteriores referentes à atividade elétrica cardíaca, uma vez que os experimentos sugerem alteração na condutância do íon cálcio nas células marcapasso, diminuindo, desta forma, a frequência cardíaca. Este dado nos sugeriu que a fração possivelmente previna arritmias oriundas da reperfusão pós-isquêmica. Como os dados reforçam a hipótese de que a FAE diminui ambas correntes de cálcio e potássio, verificado pelas alterações eletrocardiográficas,

ela teria propriedade antiarrítmica semelhante às drogas antiarrítmicas da Classe IV (bloqueadores de canais para cálcio) e da Classe III (bloqueadores de canais para potássio).

Vários compostos naturais tem a capacidade de atuar bloqueando canais iônicos em célula cardíaca. Vasconcelos *et al.*, (2006), verificaram que o extrato aquoso obtidos das folhas de *Averrhoa carambola* apresentava também a propriedade de inibir correntes de cálcio do tipo L e correntes de potássio em coração de cobaia. A R(+)-pulegona também é capaz de inibir correntes de cálcio do tipo L e potássio em cardiomiócito de camundongo (CERQUEIRA *et al.*, 2011).

Após a constatação da melhora em alguns parâmetros da função cardíaca, resolvemos investigar os possíveis mecanismos celulares envolvidos nesse processo cardioprotetor. Sabe-se que durante a isquemia e reperfusão há grande produção de ROS e que estas espécies são deletérias e são responsáveis pela lesão de reperfusão. Devido ao forte potencial antioxidante observado nos experimentos *in vitro* com a FAE indicando um possível papel protetor contra a lipoperoxidação passamos para a análise desse parâmetro no tecido cardíaco submetido à manobra isquêmica.

Verificamos a diminuição da medida do MDA no grupo perfundido previamente com a FAE. Esta observação pode ser devido ao fato da inativação da via de Fenton, provavelmente, pela ação quelante da fração ao íon ferro. Esta ação pode ser inferida pela Figura 12, onde o agente indutor da peroxidação era o FeSO_4 . Com a via de Fenton bloqueada, há um aumento da concentração de H_2O_2 no tecido. Este aumento, além de induzir uma maior atividade da GPx, evento também observado nos corações perfundidos previamente com a FAE, leva a um aumento na atividade da CAT que só ganha um papel de destaque no tecido cardíaco quando há uma sobrecarga de H_2O_2 (VALKO *et al.*, 2007).

Esta quelação já foi vista previamente, e, segundo Sousa *et al.*, (2007), a atividade antioxidante encontrada em plantas se deve principalmente à presença de compostos fenólicos e às suas propriedades redutoras e estruturas químicas. Segundo estes autores, estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.

Durante a isquemia e reperfusão, o estresse oxidativo, decorrente da alta formação de ERO, modifica os fosfolipídios e como também proteínas, levando à peroxidação lipídica e

oxidação dos grupos tióis das cadeias polipeptídicas. Acredita-se que estas mudanças alteram tanto a permeabilidade da membrana quanto compromete sua integridade, além de produzir alteração funcional de várias proteínas e enzimas celulares (DHALLA *et al.*, 2000).

Os neutrófilos são as principais células efetoras da lesão de reperfusão. Sob as condições de isquemia / reperfusão, a xantina - desidrogenase é convertida em xantina oxidase, que utiliza oxigênio como um substrato. Durante a isquemia, o consumo de ATP conduz à acumulação de grandes quantidades de catabólitos de purina, hipoxantina e xantina, o qual após a reperfusão e subsequente influxo de oxigênio são metabolizados pela xantina - oxidase para a produção de grandes quantidades de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio (GRANGER *et al.*, 2001 citado por VALKO *et al.*, 2007). A SOD tem papel fundamental como primeira linha de defesa do organismo contra as ROS atuando na remoção do radical superóxido. Apesar de inúmeras pesquisas realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito, mostrando a sua especificidade para $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

O $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário da redução univalente do oxigênio, e a partir deste serão formado as demais ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Este radical é produzido a partir de ambos os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons, e uma vez formado é facilmente carregado atravessando a membrana mitocondrial interna (VALKO *et al.*, 2007). Seus efeitos deletérios vêm da habilidade de gerar radicais secundários como H_2O_2 , por sua dismutação espontânea em radicais extremamente tóxicos, como OH^{\cdot} , através da redução de quelatos de Fe^{3+} formando Fe^{2+} .

Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ tem habilidade de liberar Fe^{2+} das proteínas e de ferro-sulfoproteínas. Esse radical pode ainda reagir com NO para formar ONOO- e com o radical $^{\cdot}OH$ produzindo 1O_2 (ANDRADE JR *et al.*, 2005; BARREIROS *et al.*, 2006).

Em nossa avaliação, encontramos um aumento na atividade da SOD nos corações perfundidos previamente com a FAE, quando comparados com o veículo, da mesma forma da que Kurian *et al.*, (2010) também observaram com sua fração em tecido cardíaco. Este aumento pode ter permitido um maior sequestro do $O_2^{\cdot-}$, primeiro radical livre produzido, limitando assim o dano celular. Verificamos, em nossas análises, que os corações perfundidos previamente com o NAC não tiveram aumento na atividade desta enzima. No grupo Veículo o aumento significativo da atividade da SOD, em relação ao *Sham* pode ser devido,

principalmente, a alta produção de radicais de $O_2^{\cdot-}$ que ocorre na reperfusão, levando a ativação desta enzima, para prevenir o dano ao tecido.

Após a formação do H_2O_2 , dois mecanismos de defesas endógenos são ativados, a CAT e a GPx, sendo esta última, um dos agentes mais importantes dos sistemas de defesas antioxidantes. Após a exposição da glutatona (GSH) ao agente oxidante ocorre sua oxidação à GSSH, via enzima GPx, que a utiliza como substrato para catalisar a reação para remoção dos peróxidos, gerando uma molécula de água. A recuperação da GSH é então feita pela enzima GR, uma flavoproteína dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), sendo essa, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular.

A CAT é a enzima que catalisa, usando o ferro como cofator, a conversão de duas moléculas de H_2O_2 em água e O_2 , sendo altamente específica por atuar em hidroperóxidos de hidrogênio, de etila e de metila (DEL MAESTRO, 1980).

A CAT divide essa função com a GPx, e na presença de baixas quantidades de H_2O_2 , os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente por esta última. Já em condições onde há altas concentrações de H_2O_2 predomina a ação da CAT (CHUNG-MAN *et al.*, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Nos nossos resultados pudemos verificar que a FAE aumentou a atividade da GPx, porém o mesmo não foi observado na GR, o NAC, por outro lado, aumentou a atividade da CAT, assim como a atividade da GPx e GR. A glutatona (2GSH/GSSG) representa o principal sistema de tamponamento redox celular e, por conseguinte, e a medida de sua atividade é um indicador representativo para o ambiente redox da célula (VALKO *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho pudemos observar que a FAE foi capaz de reduzir as medidas de CK quando comparadas ao grupo Veículo, porém este último não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo perfundido previamente com NAC. A CK catalisa e adiciona um grupo de fosfato à creatina, tornando-a uma molécula de fosfocreatina. A fosfocreatina é utilizada pelo organismo para fornecer energia às células. Durante o processo de degeneração muscular, as células musculares degradam e liberam seu conteúdo para a corrente sanguínea, incluindo a CK, esta pode ser reversivelmente inativada por ERO, produzindo potencialmente um estado pró-arrítmico (GURJI *et al.*, 2013).

Dzeja et al, (1998), propôs que a inativação de CK, principalmente na isquemia, por ROS provoca acúmulo ADP que abre canais K_{ATP} , encurtando, assim, potenciais de ação cardíaco, controlando o influxo de Ca^{2+} e provocando arritmias. A CK mostrou-se fisicamente associada com uma subunidade do canal K_{ATP} sarcolemal, levantando a possibilidade de que mudanças na atividade de CK podem modular diretamente o canal K_{ATP} . Assim, a inativação da CK por ROS pode contribuir para a instabilidade elétrica cardíaca (citado por GURJI *et al.*, 2013).

Desta forma, nosso trabalho mostrou que a FAE provocou diminuição da contratilidade, da velocidade da contração cardíaca e diminuição da frequência cardíaca, com também a velocidade de condução do estímulo elétrico cardíaco aumentando o tempo de condução no NAV e são muito úteis no tratamento da taquicardia supraventricular. Além disso, a fração tem forte poder antioxidante, e mostra benefícios ao ser utilizado para este fim na prevenção da lesão tecidual, minimizando os danos provocados pela reperfusão, pois diminui a peroxidação lipídica e a CK, assim como, aumenta a atividade das enzimas essenciais do sistema antioxidante.

7 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Nos estudos de caracterização *in vitro* da FAE, observamos:

- Presença de compostos antioxidantes.
- Redução do DPPH[•].
- Redução da lipoperoxidação induzida pelo FeSO₄.

A FAE promove as seguintes alterações elétricas e contrácteis em coração isolado:

- Aumento da duração dos intervalos PR, QT e complexo QRS.
- Redução da PVE.
- Diminuição da frequência cardíaca;

A FAE promove em músculo cardíaco submetido à isquemia e reperfusão:

- Recuperação da PVE.
- Recuperação da frequência cardíaca.
- Diminuição do ISA.
- Diminuição na formação de TBARS.
- Aumento da atividade das enzimas SOD e GPx.
- Diminuição do marcador de necrose celular CK.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTO, T.K.; RAIVIO, K.O. Nuclotide depletion due to reative oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants. *Pediatric Res*, v. 34, p. 572-76, 1993.
- AGUIAR, J; BARBA, M M; ALBA GIL, J; CAETANO, J; FERREIRA, A; NOBRE, Â; CRAVINO, J.. Aneurisma do ventrículo esquerdo e diagnóstico diferencial com pseudo-aneurisma. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, v. 31, p. 459-62, 2012.
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. *Cellular Immunology*, v 194, p.98-102, 1999.
- ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANAB, A.E.G.; PLETSCHB, M.; COELHO, L.C.B.B.. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 229–233, 2004.
- ASSREUY, A. M. S.; FONTENELE, S. R.; PIRES, A. F.; FERNANDES, D. C.; RODRIGUES, N. V. F. C.; BEZERRA, E. H. S.; MOURA, T. R.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, v.380, p.509–521, 2009.
- AVEZUM, A et al . III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. *Arquivo Brasileiro Cardiologia*, v. 83, supl. 4, 2004.
- AZEVEDO, D. F. Iniciação à eletrocardiografia. *Editora Artes Médicas Sul Ltda*. 1999.
- BANOTH, R. K.; THAAKUR, S. R.. Anti-Parkinsonian effect of various extract of *Canavalia gladiata* seeds in Mice. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, p. 4050, 2011.
- BARRAL-NETTO, M. et al.. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. *Eur. Journ. Derm.*, [S. l.], v. 5, p. 104-113, 1995.
- BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL; A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonenses*. *Acta Tropica*, v. 60, p. 237-250,1996.

- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P.. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, v. 29, nº. 1, p. 113-123, 2006
- BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M.. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 50, p. 940 – 950, 2011.
- BELLO, R. B.; GONÇALVES, J. P.; RIOS, S. L. Comunicação interventricular como complicação do infarto agudo do miocárdio. *Revista Médica Ana Costa*, 2007.
- BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, p. 198-205, 2002.
- BLOMHOFF, R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. v.16, p. 47–54, 2005.
- BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Vitis vinifera L. Fitoterapia*, v. 66, p. 291-317, 1995.
- BOSE, R.; SUTHERLAND, G.R., PINSKY, C. Biological and Methodological Implications of Prostaglandin Involvement in Mouse Brain Lipid Peroxidation Measurements. *Neurochem Res.*, v. 14(3), p. 217-20, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)
- BRITTO, R. M., SANTOS, A. L., CRUZ, J. S., GONDIM, A. N. S., LAUTON-SANTOS, S; LARA, A., GUATIMOSIM, S.; VASCONCELOS, C. M. L., ESTEVAM, C.S., DIAS, A. S., OLIVEIRA, E. D., LIMA, A. K.; SOUZA, R. C., CONDE-GARCIA, E. A.. Aqueous fraction from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaf reduces contractility by impairing the calcium inward current in the mammalian myocardium. *Journal of Ethnopharmacology*, v.138, p. 382–389, 2011.

- BUDNI, P; LIMA, M; POLYDORO, M; MOREIRA, J; SCHRODER, N; DAL-PIZZOL, F. Antioxidant Effects of Selegiline in Oxidative Stress Induced by Iron Neonatal Treatment in Rats. *Neurochemical Research*, v. 32, nº 6, p. 965-972(8), 2007.
- CALIXTO, J.B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal Ethnofarmacology*, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CAMARA, A. K. S.; BIENENGRAEBER, M.; STOWE, D. F. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Frontiers in Physiology*. Review Article. v. 2, article 13, p. 01-34, 2011.
- CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J Vasc Br*, v. 3, nº4, 2004.
- CARLINI, C.R.; GUIMARAES, J.A.. Isolation of a Toxic Protein from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) Seeds, Distinct from Concanavalin A. *Toxicon*, v.19 (5), p.667-675, 1981.
- CARLINI, C.R.; GUIMARAES, J.A.; GOMES, C.B.; MARKUS, R.P.; SATO, H.; TROLIN, G.. Central nervous effect of the convulsant protein canatoxin. *Acta pharmacol, Toxicon*, v. 54, p. 161-166, 1984.
- CARVALHO, A. C. C.; SOUSA, J. M. A.. Cardiopatia isquêmica. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, p. 297-305, 2001.
- CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARAL-NETO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein & Peptide Science*, v.2, p.1–13, 2001.
- CERQUEIRA, N F; YOSHIDA, W B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.*, v. 17, n.6, 2002.
- CERQUEIRA, S. V. S.; GONDIM, A. N. S.; ROMAN-CAMPOS, D.; CRUZ, J. S.; PASSOS, A. G. DA S.; LAUTON-SANTOS, S.; LARA, A.; GUATIMOSIM, S.; CONDE-GARCIA, E. A.; OLIVEIRA, E. D.; VASCONCELOS, C. M. L.. R(+)-pulegone impairs Ca²⁺ homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. *European Journal of Pharmacology*. v. 672, p. 135–142, 2011.

CHUNG-MAN, H.J.; ZHENG S.; COMHAIR, S.A.; FARVER, C.. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res*, v. 61, p. 8578-8585, 2001.

COSTA, C. R. A., FIGUERÔA, M. A., ANDRADE, Y. B., BARREIROS, A. L. B. S. Atividade antioxidante dos extratos de folhas e caule de *Canavalia rosea*. *Sociedade Brasileira de Química (SBQ) - 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2010.

COSTANZO, L. S., 1947 7. Fisiologia / Linda S. Costanzo; [tradução Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues... *et al.*]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.

CUEVAS, C. K. J. .Non-Specific Inhibition of Ischemia- and Acidosis-Induced Intracellular Calcium Elevations and Membrane Currents by α -Phenyl-N-tert-butyl nitron, Butylated Hydroxytoluene and Trolox. *Int. J. Mol. Science*, v.15, p. 3596-3611, 2014.

DATASUS Disponível em : <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acessado em 26 de janeiro de 2014.

DEL MAESTRO, R.F.. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 492, p.153-168, 1980.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.D.A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K S.; FREIRE, V N.; SAMPAIO, A. H, AZEVEDO JR , W. F; CAVADA, B S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *Journal of Structural Biology*, v. 154, p. 280–286, 2006.

DHALLA, N. S.; ELMOSELHI, A. B.; HATA, T.; MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, v. 47, p.446-456, 2000.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F., SCHAFF, H. V.. Lesão de Isquemia-Reperfusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. *Arq Bras Cardiologia*, v. 66, nº 4, 1996.

FREEDMAN, J.E.; LOSCALZO, J.; BARNARD, M.R.; ALPERT, C.; KEANEY, J.F.; MICHELSON, A.D. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest*, v. 100(2), p.350-6, 1997.

FREEDMAN, J.E.; TING, B.; HANKIN, B.; LOSCALZO, J.; KEANEY, J.F.JR.; VITA, J.A. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* v. 98(15), p. 1481-6, 1998.

GADELHA, C.A.D.A.; MORENO, F.B.M.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; LIMA MOTA, M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO JR., W.F.; CAVADA, B.S.. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol*, v. 152 (3), p. 185– 194, 2005.

GOZZANI, J. L. Opióides e Antagonistas. *Rev Bras Anesthesiol*. v. 44; nº 1, p. 65 – 73, 1994.

GRANGER, D.N.; HOLLWARTH, M.E.; PARKS, D.A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl*, v. 548, p. 47-63, 1986.

GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury. Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Circulation*, v. 108, p.1912-1916, 2003.

GURJI, H. A.; WHITE, D. W.; HOXHA, B.; SUN, J.; OLIVENCIA-YURVATI, A. H.; MALLET, R. T. Pyruvate-fortified resuscitation stabilizes cardiac electrical activity and energy metabolism during hypovolemia. *World J Crit Care Med*, v.4; nº2(4), p. 56-64, 2013.

GUTTERIDGE, J.M., HALLIWELL, B.. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*, v. 15, p. 129-34, 1990.

GUYTON, A. C; HALL, J. E.. Tratado de Fisiologia Médica. 11 ed. Elsevier, 2006.

HAENDCHEN, R. V. Apoptose miocárdica. Um novo mecanismo de morte celular. *Arq. Bras. Cardiologia*, v. 70, n. 1, 1998.

HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; JAVADOV, S. A.. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion — a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, v. 61, p. 372– 385, 2004.

HALLÉN, J. Troponin for the Estimation of Infarct Size: What Have We Learned?. *Cardiology*, v. 121, p. 204–212, 2012.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, v. 281, p. 9-19, 1991.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E.. Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, 1994.

HEO, H.J.; LEE, C.Y. Protective effects of quercetin and vitamina C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem*, v. 52(25), p.7514-7, 2004.

IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq. Bras. Cardiologia*, v. 93, n. 6, supl. 2, 2009.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J. Genética Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 368, 2010.

JUN, Y.; LAN, P. M.; LI, F. H.; BO, Z.; LI, Y.; ZHONG, L. L. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, Limerick, v. 120, p. 109-117, 2002.

JUSTO, O.R. et al. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química Nova*, v.31, n.7, p.1699-705, 2008.

KERRIGAN, C.L.; STOTLAND, M.A. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*, v.14, p. 165-75, 1993.

KITAJIMA, E. W.; ALCÂNTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A. M.; ZERBINI, F. M.. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in Brazil. *Arch Virol*, v. 153, p.743 – 747, 2008.

KURIAN, G.A.; SURYANARAYANAN, S.; RAMAN, A. , PADIKKALA, J. Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts. *Chinese Medicine*, v. 5, p. 3, 2010

- KUSMIC, C.; BASTA, G.; LAZZERINI, G.; VESENTINI, N; BARSACCHI, R. THE Effect of *Ginkgo Biloba* in Isolated Ischemic/Reperfused Rat Heart - A Link between Vitamin E Preservation and Prostaglandin Biosynthesis . *Journal Cardiovasc Pharmacology*, v. 44, p. 356–362, 2004.
- LAGE, S. G.; RAMIRES, J. F. *Cardiologia no internato: bases teórico-práticas*. São Paulo: Atheneu, p. 388, 2001.
- LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M.. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by biflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*, v. 33(9), p.1525-30, 1984.
- LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT; J.R.; HALLIVELL, B.. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, v. 42(9), p. 1673-81, 1991.
- LEE, K.W.; LEE, H.J.; SURH, Y.J.; LEE, C.Y.. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am J Clin Nutr*, v. 78, p. 1074-8, 2003
- LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R. Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med*, v. 26 (3-4), p.285-94, 1999.
- LIMA, V. L. A. G. de et al . Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). *Rev. Nutr.*, Campinas , v. 17, n. 1, 2004 .
- LU, S., GUO, X., ZHAO, P.. Effect of Ginkgo Biloba Extract 50 on Immunity and Antioxidant Enzyme Activities in Ischemia Reperfusion Rats. *Molecules*, v. 16, p. 9194-9206, 2011.
- MADAMANCHI, N.R.; RUNGE, M. S. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 61, p. 473–501, 2013.
- MANSUR, P. H. G., CURY, L. K. P., DESTRO-FILHO, J. B., RESENDE, E. S., DESTRO, J. P. B., OLIVEIRA, L.M.; MORAES, D. C. G., FREITAS, G. R. R.; ROCHA, L. S. S.. Análise de Registros Eletrocardiográficos Associados ao Infarto Agudo do Miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, nº 2, 2006.

- MARCHETTI, M.; MASTROMARINO, P.; RIETI, S.; SEGANTI, L.; ORSI, N..Inhibition of Herpes Simplex, Rabies and Rubella Viruses by Lectins with Different Specificities. *Res. Virol.*, v.146, p. 211-215, 1995.
- MATOS, A. B.; ARTILES, G. R.; VALDÉS, L. H.; OLIVER, P. H. Revisioón taxonômica del género *Canavalia* DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba. *Ver. Acad. Colomb. Cienc.* v. 28 (107), p. 157-175, 2004.
- MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza, UFCe, 1998.
- MCCORD, J.M. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, v. 185, p. 529-31, 1974.
- MELO, E.A. et al. Antioxidant activity of coriander extracts (*Coriandrum sativum* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.195-9, 2003
- MILLER, A. L. Botanical Influences on Cardiovascular Disease. *Alternative Medicine Review*, v.3, nº6, p.422-431, 1998.
- MINAMINO, T. Cardioprotection from Ischemia/Reperfusion Injury - Basic and Translational Research. *Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society*, vol.76, p. 1074 - 1082, 2012.
- MIRANDA, G.S.; SANTANA, G.S.; MACHADO B.B.; COELHO, F.P.; Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.15, n.1, p.104-111, 2013.
- MONTEIRO, P; OLIVEIRA, P. J.; GONÇALVES, L; PROVIDÊNCIA, L. A.. Mitocôndrias: Que Papel na Isquemia, Reperusão e Morte Celular?. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, v. 22 (2), p. 233-254, 2003.
- MUSABAYNE, C.B.. The effects of medicinal plants on renal function and blood pressure in diabetes mellitus. *Cardiovascular Journal of Africa*, v.23, nº8, 2012.
- NIVEDITHA, V.R.; SRIDHAR, K. R.. Antioxidant activity of raw,cooked and *Rhizopus oligosporus* fermented beans of *Canavalia* of coastals and dunes of South west India. *Journal Food Scientists & Technologists (India)*, 2012.

PATTAMADILOK, D.; PENGSUPARP, T.; PHUMMIRATCH, D.; ONGPIPATTANAKUL, B.; MEKSURIYEN, D.; KAWANISHI, K.; KANEDA, N.; SUTTISRI, R. Canarosine: A new guanidine alkaloid from *Canavalia rosea* with inhibitory activity on dopamine D1 receptors. *Journal of Asian Natural Products Research*. v.10, nº.10, p. 915-918, 2008.

PERRELLI, M-G.; PAGLIARO, P.; PENNA, C.. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World Journal Cardiology*, v. 26, p. 186 - 200, 2011.

PINHEIRO, B. V.; HOLANDA, M. A.; ARAÚJO, F. G.; ROMALDINI, H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J. Pneumologia*, São Paulo, v. 25, n. 2, 1999.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v. 29, nº. 4, p. 755-760, 2006.

REIN, D.; PAGLIERONI, T.G.; PEARSON, D.A.; WUN, T.; SCHMITZ, H.H.; GOSSELIN, R.; KEEN, C.L.. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr*, v. 130, p. 2120S-6S, 2000.

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. *J Vasc Br*. v. 4(2), p.183-94, 2005.

RIBEIRO-DASILVA, G.; PRADO, J.F.. Increased Insulin Circulating Levels Induced by Canatoxin in Rat., *Toxicon*, v. 31 (9), p. 1131-1136, 1993.

ROSENTHAL, G A. The Biochemical Basis for the Deleterious Effects of L-Canavanine. *Phytochemistry*, v.30, p. 1055-1058, 1991.

ROSENTHAL, G.A.; BELL, E.A.. Herbivores – Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. *Academic Press*, p. 353-385, 1979.

RUIZ-HURTADO, G.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; MOURELLE; M., DELGADO, C.. LA419, a novel nitric oxide donor, prevents pathological cardiac remodeling in pressure-overloaded rats via endothelial nitric oxide synthase pathway regulation. *Hypertension*, v. 50(6), p. 1049-56, 2007.

SAFFARI, Y.; SADRZADEH, S. M. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Science*, Varanasi, v. 74, p. 1513-1518, 2004.

SAHNA, E.; ACET, A.; OZER, M.K.; OLMEZ, E.. Myocardial ischemia–reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *Journal of Pineal Research*, v. 33, p. 234–238, 2002.

SARMENTO-LEITE, R.; KREPSKY, A. M.; GOTTSCHALL, C. A. M.. Acute Myocardial Infarction. One Century of History. *Arq Bras Cardiol*, v.77 (nº 6), p. 602-10, 2001.

SASIPRIYA, G; SIDDHURAJU, P.. Effect of different processing methods on antioxidant activity of under utilized legumes, *Entadascandens* seedkernel and *Canavalia gladiata* seeds. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 2864 - 2872, 2012.

SAUER, J. Revision of *Canavalia* - Departments of Botany and Geography, University of Wisconsin. *Brittonia - The New York Botanical Garden*, v. 16, p. 106 – 181, 1964.

SCHLÜTER, M.; BORDAS, E.. Canavanina in *Canavalia paraguayensis*, *C. gladiata* and *Dioclea paraguayensis*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3533-3534, 1972.

SCHMITZ, W. O.; ESTEVÃO, D.; CECCHINI, R.; SAITO, A.; SARIDAKIS, H. O. Ação quimioprotetora do chá verde em ratos tratados com Dietilnitrosamina. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 223-234, 2011.

SILVA JR, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17 (Suplemento 3), 2002.

SILVA, J.N., BEIRÃO, T., FELIPE, P., FERNANDES, A.. Efeito de flavonoides no estresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. *Boletim da SPHM*. v. 21 (1), 2006.

SOLER-RIVAS, C; ESPÍN, J.C.; WICHERS; H.J.. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, v.11, (2000), pp. 1–9, 2000.

SOUSA, C. M. de M. et al . Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 30, n. 2, 2007.

SRIDHAR, K.R.; SEENA, S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. *Food Chemistry* , v. 99, p. 267–288, 2006.

STANKOVIÈOVÁ, T; FRÝDL, M.; KUBICOVÁ, M. The effect of *Ligustrum delavayanum* on isolated perfused rat heart. *Exp Clin Cardiol*, v. 6(3), p.132-136, 2001.

SUN, J.; KH TAN, B.; HUANG, S-H; WHITEMAN, M.; ZHU, Y-Z. Effects of natural products on is chemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta Pharmacol Sin*, v. 23 (12), p. 1142 -1151, 2002.

SZABO, C.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A.L.. Role of poly- ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxinitrite. *Circ Res*, v. 78, p. 1051-63, 1996.

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

VALLI, G.; GIARDINA, E-G. V. Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects. *Am. Coll. Cardiol.*, v. 39, p.1083-1095J, 2002.

VASCONCELOS, C. M. L.. Estudo dos efeitos contráteis e eletrofisiológicos de extratos obtidos das folhas de *Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae)* em coração de cobaia (*Cavia porcellus*). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Paraíba, 2005.

VEIGA-JUNIOR V.F.; MELO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 464-471, 2008.

VERÇOZA, F. C.; NASCIMENTO, E. C.; CÔRTEZ, I. M. R. Melitofilia em *Canavalia rosea* (Sw.) DC. (Leguminosae-Papilionoideae). *EntomoBrasilis*, v. 3 (3), p.73-76, 2010.

WANG, C-Z; MEHENDALE, S.; CALWAY, T; YUAN, C-S. Botanical Flavonoids on Coronary Heart Disease. *Am J Chin Med*. v. 39(4), p. 661–671, 2011.

YOSHIDA, H; YOSHIDA, N; KURIYAMA, I; TOMIYAMA-SAKAMOTO, Y.; MIZUSHINA, Y. Profiles of lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in Jack beans (*Canavalia gladiata* DC.) Food Chemistry, v. 136, p. 807–812, 2013.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 87, n. 6, 2006.

ZHANG, J.; DAWSON, V.L.; DALSON, T.M. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, v. 263, p. 687-9, 1994.

ZORNOFF, L. A. M.; PAIVA, S. A. R.; MINICUCCI, M. F.; SPADARO, J. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo. *Arq Brasileiro de Cardiologia*, v. 93(3), p. 434 – 440, 2009.