



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

**LUCAS ANDRADE DE SÁ**

**CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR *p*-CIMENO CONTRA DANOS  
CONTRÁTEIS E OXIDATIVOS DECORRENTES DAS LESÕES DE REPERFUSÃO  
EM RATOS**

**Aracaju,  
2017**

**LUCAS ANDRADE DE SÁ**      **CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR *p*-CIMEÑO CONTRA DANOS CONTRÁTEIS E OXIDATIVOS DECORRENTES DAS LESÕES DE REPERFUSÃO EM RATOS**      **2017**

**LUCAS ANDRADE DE SÁ**

**CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR *p*-CIMENO CONTRA DANOS  
CONTRÁTEIS E OXIDATIVOS DECORRENTES DAS LESÕES DE REPERFUSÃO  
EM RATOS**

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

**Orientadora:** Dra. Sandra Lauton Santos

**Aracaju,**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S111c Sá, Lucas Andrade de  
Cardioproteção induzida por *p*-cimeno contra danos contráteis e oxidativos decorrentes das lesões de reperfusão em ratos / Lucas Andrade de Sá; orientador Sandra Lauton Santos. – Aracaju, 2017.  
71 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Infarto do miocárdio. 2. Stress oxidativo. 3. Antioxidantes. 4. Monoterpenos. I. Santos, Sandra Lauton, orient. II. Título.

CDU 616.127-005.8

**LUCAS ANDRADE DE SÁ**

**CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA POR *p*-CIMENO A DANOS CONTRÁTEIS E  
OXIDATIVOS DECORRENTES DAS LESÕES DE REPERFUSÃO EM RATOS**

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

---

**Presidente: Profa. Dra Sandra Lauton Santos**

---

**1º Examinador: Profa. Dra. Andréia Laura Prates Rodrigues**

---

**2º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo**

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar e dar forças para concluir cada etapa em minha vida.

A meus pais, Angela e Raimundo, por todo ensinamento e apoio dedicados a mim até hoje, são meus grandes exemplos, que nunca mediram esforços para eu trilhasse meu caminho da melhor forma possível. Ao meu irmão, Danilo, pelo incentivo e apoio de sempre, sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos.

A minha namorada e amiga, Bruna, pelo apoio e companheirismo, sempre do meu lado, com muito amor nos momentos bons e principalmente nos mais difíceis.

A minha orientadora Sandra Lauton, que abriu as portas do laboratório para mim, durante esse cinco anos, todo o ensinamento passado, por acreditar em mim e no meu trabalho, e pela amizade.

A toda a equipe do laboratório de biologia cardiovascular e estresse oxidativo: Peligris, Grace, Rodrigo, Marden, Maraisa, Mirian, Iolanda, Jeferson e Laisa, pela amizade e companheirismo durante esses anos de laboratório, onde estávamos os dias trabalhando para que cada um em particular alcançasse seu objetivo. A Éder pela parceria e contribuição nesse trabalho em um momento crucial. Sem essa equipe eu não teria conseguido.

Ao professor Lucindo Quintans pela parceria e colaboração no trabalho.

A UFS onde concluir minha graduação e agora o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Ao CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca, pela atenção e colaboração.

A todos que de forma direta ou indireta abraçaram esse empreitada, e me ajudaram a alcançar um sonho, meu muito obrigado!

## RESUMO

**Cardioproteção induzida por *p*-cimeno contra danos contráteis e oxidativos decorrentes das lesões de reperfusão em ratos. Lucas Andrade de Sá, 2017.** O infarto agudo do miocárdio (IAM), grave problema de saúde pública, é caracterizado pela morte tecidual após isquemia prolongada. A isquemia, seguida da reperfusão, desencadeia processos celulares, tais como sobrecarga intracelular de cálcio e estresse oxidativo, que são os eventos principais que levam a morte celular. Existem poucas estratégias de intervenção farmacológica para prevenção e limitação destas lesões, e ainda, vale destacar que as formas de intervenção disponíveis não são totalmente eficazes. Recentes pesquisas apontam que, como alternativa terapêutica, o uso de drogas derivadas de produtos naturais com ação antioxidante tem se mostrado importante ferramenta preventiva e de tratamento para as lesões decorrentes do infarto. O *p*-cimeno, um monoterpene presente em óleos essenciais de várias espécies vegetais, é uma substância que apresenta uma gama de atividades farmacológicas comprovadas, dentre elas, atividade antinocepsiva, anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do pré-tratamento com *p*-cimeno em lesões decorrentes da isquemia e reperfusão (I/R) em corações isolados de ratos. Para tanto, foi adotado o modelo de perfusão aórtico do tipo Langendorff para submeter corações isolados de ratos à isquemia global. Foram utilizados ratos *Wistar* pré-tratados com veículo ou *p*-cimeno na dose 150 mg/kg/dia, via oral (gavagem), durante 7 dias, e, posteriormente, seus corações isolados foram submetidos à isquemia global e reperfusão no sistema de Langendorff. Foram utilizados, como controle do modelo experimental adotado, corações que não foram submetidos à I/R. De todos os grupos de animais foram realizadas medidas de lactato desidrogenase (LDH), indicador de lesão tecidual e ainda, foram avaliados tanto os parâmetros contráteis no coração isolado [pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), derivada temporal de pressão ventricular (dP/dt) e o índice de severidade de arritmias (ASI)], quanto os parâmetros oxidativos no tecido cardíaco [formação malonaldeído (MDA), sulfidrilas totais; a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx)]. Observamos que o pré-tratamento com *p*-cimeno preservou a redução de PDVE, dP/dt e causou menor ASI, melhorando a função contrátil. Reduziu a formação de MDA e LDH (62%). Além disso, este monoterpene preserva os grupos sulfidrilas (38%) e a atividade das enzimas antioxidantes CAT (36%), SOD (62%), GPx e GR quando comparado ao veículo. Pode-se concluir que o pré-tratamento com *p*-cimeno previne a redução da força contrátil cardíaca provocada pela isquemia e reduz significativamente os danos oxidativos causados pelo infarto no modelo experimental.

**Descritores:** Infarto agudo do miocárdio. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Monoterpenos. *p*-Cimeno.

## ABSTRACT

***p*-Cymene induced cardioprotection against contractile and oxidative damage from reperfusion injury in rats. Lucas Andrade de Sá, 2017.** Acute myocardial infarction (AMI), a serious public health problem, is characterized by tissue death after prolonged ischemia. Ischemia, the reperfusion, triggers cellular processes, such as intracellular calcium overload and oxidative stress. There are few pharmacological intervention strategies for prevention and limitation of these lesions, and it is worth noting that the available forms of intervention are not fully effective. Recent research indicates that, as a therapeutic alternative, the use of drugs derived from natural products with antioxidant action has been shown to be an important preventive and treatment tool for the lesions resulting from the infarction. *p*-Cymene, a monoterpene present in essential oils of various plant species, is a substance that has a range of proven pharmacological activities, among them antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activity. The aim of this study was to evaluate the effect of pre-treatment with *p*-cymene on ischemia and reperfusion injury (I / R) in hearts isolated from rats. For this purpose, the Langendorff-type aortic perfusion model was used to submit isolated hearts from rats to global ischemia. Wistar rats pretreated with vehicle or *p*-cymene at the dose of 150 mg / kg / day orally (gavage) were used for 7 days, and thereafter their isolated hearts were subjected to global ischemia and reperfusion in the Langendorff system . As a control of the adopted experimental model, hearts that were not submitted to I / R were used. Measurements of lactate dehydrogenase (LDH), indicative of tissue damage, were also performed on all groups of animals, and the contractile parameters in the isolated heart (left ventricular pressure (LVDP), time derivative of ventricular pressure (dP / Dt) and arrhythmia severity index (ASI)], as well as oxidative parameters in cardiac tissue [malonaldehyde formation (MDA), total sulfhydryl; The activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx)]. We observed that the pre-treatment with *p*-cymene preserved the reduction of PDVE, dP / dt and caused lower ASI, improving the contractile function. It reduced the formation of MDA and LDH (62%). In addition, this monoterpene preserves the sulfhydryl groups (38%) and the activity of the antioxidant enzymes CAT (36%), SOD (62%), GPx and GR when compared to the vehicle. It can be concluded that pre-treatment with *p*-cymene prevents the reduction of cardiac contractile force caused by ischemia and significantly reduces the oxidative damage caused by infarction in the experimental model.

**Keywords:** Myocardial Infarction. Oxidative stress. Antioxidants. Monoterpenes. *P*-cymene

## SIGLAS E ABREVIACOES

ADP - Adenosina Difosfato

ANT - Adenina Nucleotdeo Translocase

ASI - ndice de Severidade de Arritmia (do inglês: *Arrhythmia Severity Index*)

ATP - Adenosina Trifosfato

CAT - Catalase

CL - Cardiolipina

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

COX - Clicoxygenase

DNA - cido Desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*)

-dP/dt - Derivada Temporal de Pressão Ventricular Mínima

+dP/dt - Derivada Temporal de Pressão Ventricular Máxima

eNOS - Oxido Nítrico Sintase endotelial

EDTA - cido Etilenodiamino Tetra-Acético

FC - Frequência Cardíaca

Fos-Ox - Fosforilao Oxidativa

GPx - Glutationa Peroxidase

GR - Glutationa Redutase

GSH - Glutationa

GSSG - Glutationa Oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrognio

I/R - Isquemia e Reperfusão

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

LDH - Lactato Desidrogenase

MDA - Malonaldeído

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2]

NADH - Nicotinamida Adenina nucleotídeo Hidreto

NADPH oxidase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase

NCX - Trocador Sódio-Cálcio

NHE - Trocador Sódio-Hidrognio

NO - xido Nítrico

NOS - xido Nítrico Sintase

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion Superóxido

$\text{OH}^\cdot$  - Radical Hidroxila

$\text{ONOO}^-$  - Peroxinitrito

$\text{ONOOH}$  - Ácido Peroxinitroso

PBS- Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês: *Phosphate Buffer Saline*)

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês: *Reactive Oxygen Species*)

RyR - Receptor de Rianodina.

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TTC - Cloreto de Trifeniltetrazólio

XO - Xantina Oxidase

$\Delta\psi_m$  - Potencial de Membrana Mitocondrial

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Solução de Krebs.....	30
<b>Tabela 2.</b> Índice de Severidade de Arritmias.....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo dos eventos ocorridos durante a isquemia.....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo dos eventos ocorridos durante a reperfusão.....	21
<b>Figura 3.</b> Esquema representando a cadeia transportadora de elétrons com formação de ROS.....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema do sistema antioxidante enzimático.....	24
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do <i>p</i> -cimeno .....	30
<b>Figura 6.</b> Modelo esquemático do período de tratamento o animal, para ser submetido ao protocolo de isquemia e reperfusão.....	34
<b>Figura 7.</b> Esquema representando o sistema de perfusão Langendorff.....	35
<b>Figura 8.</b> Esquema representando o protocolo de indução de isquemia e reperfusão e os intervalos para avaliação dos registros contráteis cardíacos antes e após a isquemia global...35	
<b>Figura 9.</b> Medida de malonaldeído (MDA) em coração de ratos pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (25, 50, 100 e 150 mg/kg/dia) durante 7 dias (gavagem).....	40
<b>Figura 10.</b> Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos <i>in vivo</i> em ratos pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (25, 50, 100 e 150 mg/kg/dia) durante 7 dias. ....	41
<b>Figura 11.</b> Medida de lactato desidrogenase (LDH) em perfusato de corações pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos a isquemia e reperfusão.....	42
<b>Figura 12.</b> Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) durante a estabilização, isquemia global e reperfusão do coração isolado de ratos pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias.....	42
<b>Figura 13.</b> Índice de Severidade de Arritmias (ASI) determinados nos corações isolados de ratos pré-tratados durante 7 dias com <i>p</i> -cimeno (150 mg/Kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão.....	43
<b>Figura 14.</b> Derivada temporal de pressão ventricular máxima (+dP/dt) em animais pré-tratados durante 7 dias com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão.....	44
<b>Figura 15.</b> Derivada temporal de pressão ventricular mínima (-dP/dt) em animais pré-tratados durante 7 dias com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão. ....	44
<b>Figura 16.</b> Medida de Malonaldeído (MDA) em coração de animais pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos a isquemia e reperfusão.....	45
<b>Figura 17.</b> Concentração de grupamentos sulfidrila em corações de animais pré-tratados com <i>p</i> -cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos à isquemia e reperfusão.....	46

**Figura 18.** Atividade das enzimas antioxidantes SOD (painel A), CAT (painel B), GPx (painel C) e GR (painel D) em corações de ratos pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos à isquemia e reperfusão.....47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Infarto agudo do miocárdio e a lesão de reperfusão .....	15
2.2 Estresse oxidativo .....	18
2.3 Produtos naturais.....	24
2.4 p-Cimeno .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 Objetivo geral .....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
<b>4 MATERIAI E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 Animais .....	29
4.2 Delineamento experimental .....	29
4.3 Modelo de isquemia e determinação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) .....	30
4.4 Determinação do índice de severidade da arritmia (ASI).....	32
4.5 Determinação de peroxidação lipídica.....	32
4.6 Mensuração do grupamento sulfidrila .....	33
4.7 Determinação da concentração total de proteínas.....	33
4.8 Mensuração da atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	33
4.9 Mensuração da atividade da Catalase (CAT) .....	34
4.10 Mensuração da atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx).....	34
4.11 Avaliação da Atividade da Glutationa Redutase (GR).....	34
4.12 Lactato Desidrogenase (LDH) .....	35
4.13 Análise estatística .....	35
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
5.1 Determinação da dose de p-cimeno a ser utilizada no pré-tratamento dos animais ..	36
5.2 Mensuração da lactato desidrogenase (LDH).....	37
5.3 Determinação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) .....	38
5.4 Determinação do índice de severidade da arritmia (ASI).....	39
5.5 Determinação das derivadas temporais de pressão ventricular máxima (+dP/dt) e mínima (-dP/dt).....	39
5.6 Determinação da Peroxidação Lipídica .....	40

5.7	Mensuração do grupamento sulfidril	41
5.8	Mensuração da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR)	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO I</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento de terapias farmacológicas e não farmacológicas, as doenças cardiovasculares ainda são responsáveis por elevados índices de morbimortalidade no mundo. Mudanças no estilo de vida, como adoção de hábitos saudáveis, dietas balanceadas e atividades físicas regulares, além dos tratamentos medicamentosos já empregados, procedimentos cirúrgicos como a revascularização são considerados meios de intervenção eficientes para melhorar a sobrevida e qualidade de vida de pacientes acometidos pelas doenças cardiovasculares (COLOMBO, AGUILLAR, 1997; CARVALHO et al., 2007; VEIGA et al., 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Verificou-se em 2015 que 17,7 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares, o que representa 31% de todas as mortes globais registradas naquele ano (OMS, 2017). No Brasil, dentre as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a primeira causa de morte, registrando cerca de 100 mil óbitos anuais. O Nordeste é a segunda região do país com maior número de casos de IAM, atrás apenas da região Sudeste (BRASIL, 2014). Em Sergipe, ocorreram cerca de 800 óbitos no ano de 2015 em pacientes vítimas de IAM (BRASIL, 2015).

Dentre as principais doenças cardiovasculares, a doença arterial coronariana é caracterizada pela insuficiência de irrigação sanguínea no coração. Esta doença ocorre devido à obstrução do fluxo sanguíneo causada por placas ateroscleróticas nas artérias coronárias, ocorrendo, assim, a diminuição da luz vascular e a consequente diminuição da perfusão no tecido cardíaco (FRANCO; MATOS, 2005).

Além da doença arterial coronariana, êmbolos coronarianos, inflamações vasculares, estresse, intoxicação ou má-formação congênita podem ser responsáveis pela baixa perfusão tecidual que resulta no IAM (ZORNOFF et al., 2008). Segundo Melo e colaboradores (2006), o IAM representa um grave problema de saúde pública, sendo, desta maneira, de grande relevância, a busca por ferramentas tanto para intervenção preventiva, quanto para minimizar os danos decorrentes das lesões desencadeadas pelo processo isquêmico.

No decurso do metabolismo natural do músculo cardíaco há um equilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio ( $O_2$ ) (CARVALHO; SOUSA, 2001). A interrupção do suprimento sanguíneo para o miocárdio, como consequência da obstrução vascular, culmina no desequilíbrio metabólico, com privação de oxigênio e nutrientes necessários para o

funcionamento adequado do tecido cardíaco, isto caracteriza o processo isquêmico (SILVA; MORESCO, 2011).

Após o processo isquêmico, instaura-se o estresse oxidativo, que ocorre devido ao desequilíbrio entre a alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema antioxidante do organismo. A alta produção de ROS leva a vários danos celulares, dentre eles a oxidação dos lipídeos e proteínas de membrana, danos ao DNA, agressão às enzimas e aos carboidratos (BARREIROS et al., 2006).

Paradoxalmente, a restauração do fluxo sanguíneo, denominada reperfusão, necessária para a recuperação da função celular, pode acometer ainda mais o tecido, desencadeando lesões irreversíveis e morte celular. Ademais, a reperfusão pode ocasionar distúrbios de contratilidade cardíaca, devido ao acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula cardíaca, que se inicia na isquemia e se exacerba na reperfusão, desencadeando arritmias. Essa reintrodução do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) em tecido isquêmico aumenta ainda mais a produção de ROS (MINAMINO, 2012; RODRIGO; PRIETO; CASTILLO, 2013). Apesar disso, sem a reperfusão, há necrose miocárdica, com consequente fibrose e déficit da contração cardíaca, resultando em insuficiência cardíaca, que está associada à maior morbimortalidade da população (PIEGAS et al., 2015).

Evidências indicam que as reações oxidativas e o estado redox celular alterado durante a isquemia do miocárdio tornam-se alvos atraentes para o desenvolvimento de novos medicamentos (KUSMIC, 2004).

Como alternativa para prevenção da lesão isquêmica e proteção contra os danos da reperfusão, estudos mostram que substâncias antioxidantes podem inativar as ROS (CAI et al., 2004; ZHONG et al., 2010). Destacam-se, nesse contexto, os produtos naturais, cujo potencial terapêutico e propriedades biológicas antioxidantes reduzem o risco de doenças cardiovasculares, além de se apresentarem como importantes ferramentas no tratamento das lesões decorrentes da isquemia e reperfusão (I/R) (MIGUEL-DOS-SANTOS; LAUTON-SANTOS, 2016; SHUKLA et al., 2010).

Dentre as substâncias encontradas em produtos naturais, os terpenóides constituem a maior classe, sendo classificados pelo número de carbonos em sua estrutura. Os monoterpenos são os compostos terpênicos mais encontrados em óleos essenciais, que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003). Nesta perspectiva, o *p*-cimeno, um monoterpeno natural presente em óleos essenciais, apresenta algumas propriedades já descritas na literatura, como atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2014), antinociceptiva (QUINTANS-JÚNIOR et

al., 2013; BONJARDIM et al., 2012), anti-inflamatória (LIAPIS et al., 2000;; YVON et al., 2012), bradicárdica e hipotensora (ZHONG et al., 2013).

Tendo em vista o potencial terapêutico do *p*-cimeno relatado na literatura científica, aliado à necessidade de desenvolvimento de meios efetivos para a prevenção de danos teciduais, tanto relacionados ao estado de funcionalidade contrátil quanto do ponto de vista das lesões provocados pelo estado de oxidação celular decorrentes da I/R no coração, considera-se que essa substância possa diminuir tais prejuízos ao tecido cardíaco. Desta forma, neste trabalho foi proposto, em modelo experimental de infarto em ratos, verificar os efeitos do pré-tratamento com o *p*-cimeno em corações isolados submetidos à isquemia global e reperfusão.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

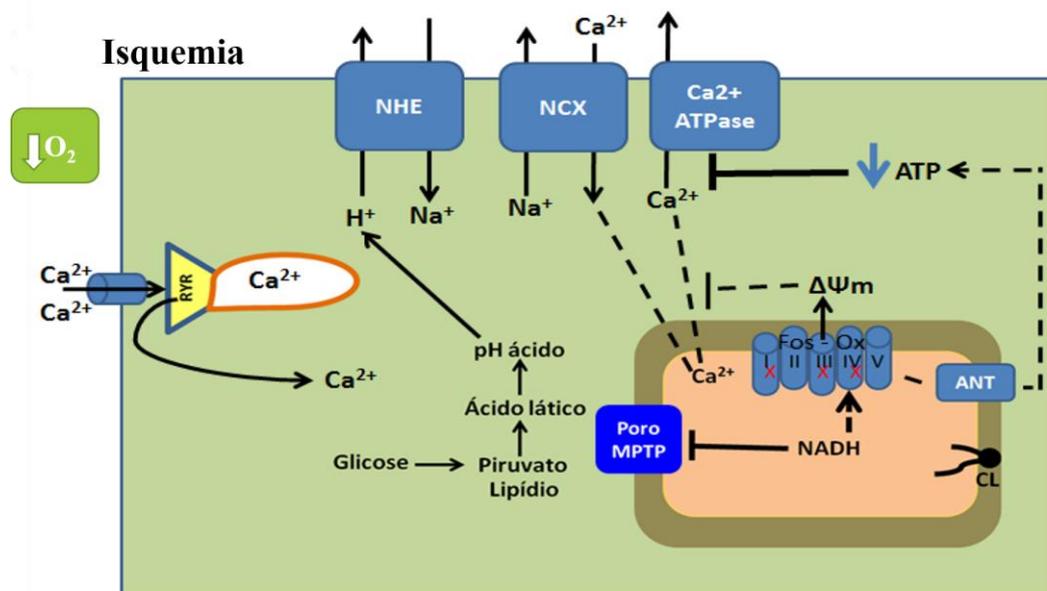
### 2.1 Infarto agudo do miocárdio e a lesão de reperfusão

O infarto agudo do miocárdio é definido como a ausência de suprimento de sangue, oxigênio e nutrientes aos cardiomiócitos, devido a um processo isquêmico prolongado, causando sofrimento e potencialmente morte celular (PESARO; SERRANO; NICOLAU, 2004). A isquemia causa diversos eventos celulares, dentre eles a disfunção mitocondrial. As mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de isquemia e reperfusão. Nelas ocorre a diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada ao hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato (ADP)/adenosina trifosfato (ATP) e da ATP sintetase. Com isso, há a inibição da fosforilação oxidativa e consequente diminuição da produção de ATP (FARBER et al., 1981; KONO et al., 1982;).

Durante a isquemia, prevalece o metabolismo anaeróbico, com o aumento de lactato e fosfato inorgânico, diminuição do pH e do ATP. Assim, com a redução na formação de ATP estimula-se a glicólise, e ocorre aumento na captação de glicose miocárdica e utilização do glicogênio armazenado (STANLEY et al., 1997; OPIE, 1998; SILVEIRA; YOSHIDA, 2004). Além disso, há elevação da taxa de conversão de piruvato em lactato no citosol, levando ao aumento no teor dessa substância no tecido. Com a elevação do lactato intracelular, a homeostase da célula é perturbada, elevando-se também a quantidade de íons  $H^+$ , com consequente queda do pH intracelular e redução do trabalho contrátil (STANLEY, 2001). A diminuição da concentração de ATP acarreta em falência das bombas transmembranares e alterações no gradiente iônico das células, com acúmulo de sódio e cálcio no meio intracelular (SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

A redução do pH induzida pela isquemia desencadeia efeitos deletérios ao bom funcionamento da célula. Dentre eles, a capacidade do músculo cardíaco de manter a homeostase das concentrações de  $Ca^{2+}$  (Figura 1). Devido à acidificação instalada, ocorre acúmulo de íons  $H^+$ , que é normalizado com a ativação do trocador  $Na^+/H^+$  (NHE). Como consequência, há aumento da concentração de  $Na^+$  no citosol, o que ativa o trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) a funcionar em sentido inverso para fazer a extrusão de  $Na^+$  e dessa forma acontece a sobrecarga de  $Ca^{2+}$  intracelular. Ao passo, que também há diminuição da função contrátil decorrentes do mau funcionamento das bombas iônicas ATP dependentes,  $Ca^{2+}$

ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, sendo a última a causa da exacerbação da sobrecarga intracelular de  $\text{Na}^+$  durante a isquemia. Em virtude da redução de ATP causada pelo processo isquêmico, o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular não é controlado, pois as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de ATP ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana citoplasmática e a SERCA) não são ativadas. A captação de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial também é alterada devido ao baixo potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Desse modo, há acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode desencadear arritmias cardíacas (MURPHY et al., 1991; WALTERS; PORTER; BROOKES, 2012). Sendo estas definidas como desregulação do padrão de batimentos do coração devido a alteração na frequência, formação e condução normal de impulsos elétricos que podem acontecer de irregular (PASTORE et al., 2016).

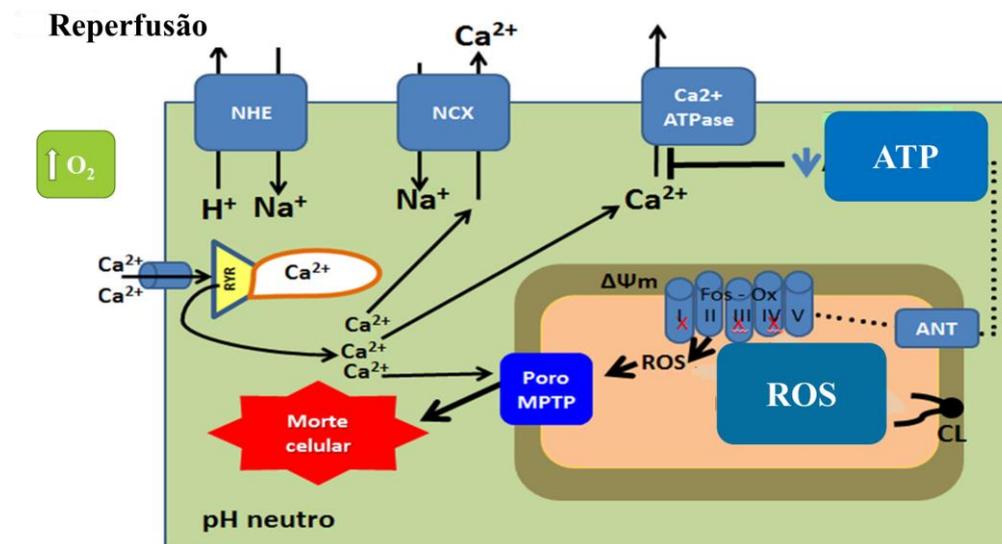


**Figura 1.** Esquema representativo dos eventos ocorridos durante a isquemia. NHE: trocador sódio-hidrogênio; NCX: trocador sódio-cálcio; ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: bomba de cálcio-ATPase); Poro PT: poro mitocondrial; Fos-Ox: cadeia de transporte de elétrons;  $\Delta\psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto; CL: cardiolipina;  $\text{Ca}^{2+}$ : íons cálcio; ATP: adenosina trifosfato; ANT: adenina nucleotídeo translocase; RyR: receptor de rianodina. Adaptado de Walters, Porter, Brookes (2012).

A reperfusão compreende a restauração do fluxo sanguíneo com o consequente restabelecimento das condições normóxicas após um período de isquemia. A terapia de reperfusão é a conduta prioritária no tratamento do IAM (ANDREENKO, BESSOLITSINA, 1977; NICOLAU et al., 2014). Apesar de a reperfusão ser a melhor intervenção durante a isquemia, ela por si só induz também danos ao miocárdio, levando a uma piora no quadro estabelecido na isquemia. Essa restauração do fluxo sanguíneo produz aceleração das

mudanças estruturais que se associam à morte celular (RUIXING; WENWU; AL-GHAZALI, 2007). Como exemplo, há a abertura do poro mitocondrial transmembranar (WALTERS; PORTER; BROOKES, 2012).

A produção exacerbada de ROS leva a piora da função cardíaca (RODRIGO; PRIETO; CASTILLO, 2013). O acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que ocorreu durante a isquemia é normalizado, porém com a alta produção de ROS, os receptores rianodina (RyR) são oxidados, culminando com a liberação de mais  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular (figura 2). A grande quantidade dessas espécies produzidas na reperfusão excede a capacidade antioxidante endógena, levando ao estresse oxidativo. As ROS reagem com biomoléculas como cardiolipina, fosfolípídios de membrana da mitocôndria, com conseqüente desequilíbrio da fluidez da membrana, alteração da permeabilidade iônica e ativação das metaloproteínas da matriz extracelular, enzimas proteolíticas que levam ao prejuízo da função mecânica cardíaca (MONASSIER, 2008; RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012).



**Figura 2.** Esquema representativo dos eventos ocorridos durante a reperfusão. NHE: trocador sódio-hidrogênio; NCX: trocador sódio-cálcio;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: bomba cálcio-ATPase); Poro MPTP: poro de permeabilidade mitocondrial; ROS: espécies reativas de oxigênio; Fos-Ox: cadeia de transporte de elétrons;  $\Delta\psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto; CL: cardiolipina;  $\text{Ca}^{2+}$ : íons cálcio; ATP: adenosina trifosfato; ANT: adenina nucleotídeo translocase; RyR: receptor rianodina. Adaptado de Walters, Porter, Brookes (2012).

As conseqüências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração, e muitas lesões são desenvolvidas durante o estágio da reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (SILVA; MORESCO, 2011). A redução de oxigênio no tecido isquêmico leva a uma

série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas principalmente pela formação das ROS. Os radicais livres causam grande lesão através da peroxidação lipídica das membranas, com posterior desintegração e morte celular. Além disso, o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão e lesão de isquemia/reperfusão (I/R) (FINKEL, 2005; VALKO et al., 2007).

Para o tratamento do IAM são utilizadas diversas drogas, apresentando-se como alternativas farmacológicas para conduta com os pacientes. Dentre elas, o ácido acetilsalicílico, como antiplaquetário, é usado para redução da formação de trombos, o que pode ajudar a prevenir a obstrução de artérias coronárias. Seu uso, porém, deve ser cauteloso pelo risco de desenvolvimento de distúrbios hemorrágicos (FUSTER et al., 1997).

Também são utilizados nitratos para melhorar a dor anginosa e manter a vasodilatação temporária em artérias, melhorando o fluxo sanguíneo (DEVITA et al., 1994); bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, que causam inotropismo negativo, normalizando a FC e a pressão arterial, o que melhora a perfusão cardíaca (CHEN et al., 2005); bloqueadores dos canais para  $Ca^{2+}$ , que provocam inotropismo negativo e relaxamento dos vasos sanguíneos, com aumento do fluxo sanguíneo (YUSUF; WITTES; FRIEDMAN, 1991); medicamentos para diminuir o colesterol como as estatinas (SPOSITO et al., 2011); inibidores da enzima conversora de angiotensina, que promovem vasorrelaxamento e diminuição da pressão arterial (PFEFFER et al., 1992); morfina, para alívio da dor anginosa (PARODI et al., 2013); fibrinolíticos, que atuam eliminando os possíveis trombos (VAN DE WERF et al., 2008).

Outras intervenções, não medicamentosas, incluem os procedimentos para melhorar o fluxo sanguíneo, como a intervenção coronária percutânea (que é utilizado o implante do *stent*, se necessário) e a revascularização cirúrgica (NORDMANN et al., 2004; HENRY, 2012).

## **2.2 Estresse oxidativo**

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo. Nesse processo são produzidas substâncias pró-oxidantes, como os radicais livres, que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo. Radicais livres são moléculas altamente reativas, espécies cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (BARREIROS et al., 2006). Sempre que o elétron desemparelhado se

encontrar centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, esses radicais livres são denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNE), respectivamente. Nem todos os agentes pró-oxidantes derivados do metabolismo do oxigênio apresentam elétrons desemparelhados, assim ROS é o termo que abrange todas as formas reativas do oxigênio, incluindo radicais e não- radicais que participam da formação de espécies radicalares (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

As gerações de radicais livres normalmente ocorrem nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Na mitocôndria, principal fonte desses radicais, a produção ocorre por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e oxigênio (BARBOSA et al., 2010). As ROS são produzidas naturalmente através do metabolismo do organismo como, por exemplo, na oxidação aeróbica, ou mesmo devido a alguma disfunção biológica. São formadas como um subproduto natural do metabolismo do oxigênio e têm papéis importantes na sinalização e homeostase celular (VALKO et al., 2007).

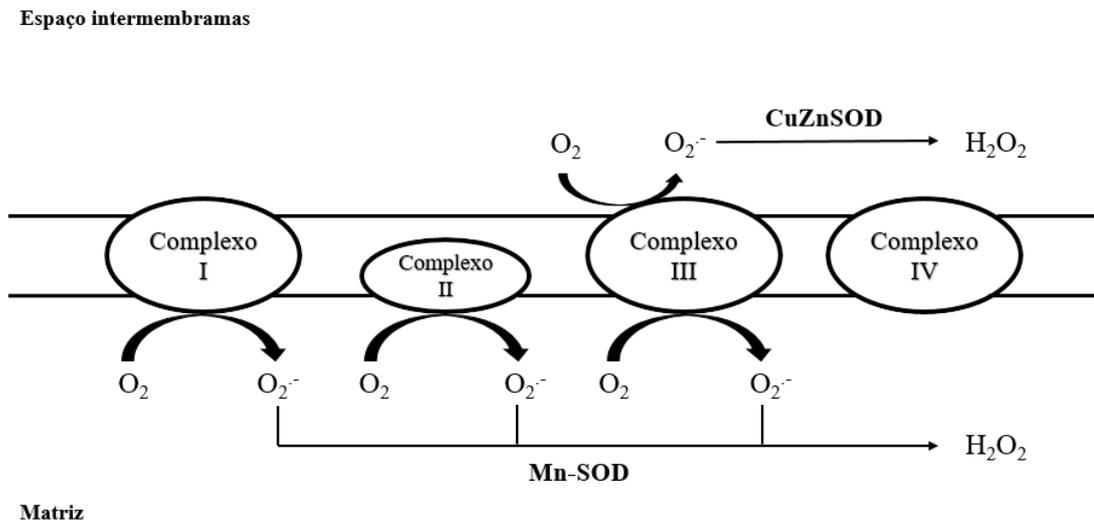
As ROS encontram-se envolvidos na produção de energia, em processos de fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, são moléculas instáveis e reagem com diversos compostos e estruturas celulares. Em situações de estresse, como na isquemia, pode ocorrer aumento na produção de espécies reativas, e seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (BARREIROS et al., 2006).

O estresse oxidativo é instalado quando o sistema antioxidante é sobrecarregado pela alta produção de ROS, que, em consequência, aumenta a produção dessas, o que causa danos a várias moléculas. A membrana celular é um dos componentes mais atingidos devido à peroxidação lipídica, com consequente alteração estrutural e na permeabilidade, que leva à perda na seletividade da troca iônica e liberação de conteúdos de organelas como os lisossomos e produtos citotóxicos, culminando em morte celular (FERREIRA et al., 1997).

A vulnerabilidade do tecido miocárdico em decorrência do estresse oxidativo depende da atividade do sistema antioxidante, sendo esse de fundamental importância. Entre alguns estados cardíacos patológicos associados à isquemia e reperfusão (I/R) que podem levar a distúrbios oxidativos temos o IAM, cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e transplante cardíaco (RODRIGO, PIETRO, CASTILLO, 2013).

As ROS podem ser geradas de várias maneiras nos miócitos cardíacos. A mais importante fonte da produção de ROS é a fosforilação oxidativa na mitocôndria, organela presente em grande densidade no tecido muscular cardíaco. Além disso, as ROS podem ser geradas enzimaticamente a partir da xantina oxidase (XO), NADPH oxidase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), COX (ciclo-oxigenase), mieloperoxidase e oxidação de catecolaminas (RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012; RODRIGO, PIETRO, CASTILLO, 2013).

Na fosforilação oxidativa ocorre a reação de redução do oxigênio ( $O_2$ ), diretamente ligada a produção de ATP. Quando em situações de estresse, ao invés do  $O_2$  receber quatro elétrons para completar a reação de redução, que ocorre na cadeia transportadora de elétrons (figura 3), esse recebe quantidade menor e é convertido, dessa forma, em ROS e radicais livres. Nesse processo, grande parte do volume de  $O_2$  sofre redução monoelétrica ao passar pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, resultando na geração de  $O_2^{\cdot-}$  que, por sua vez, pode reagir com outras moléculas originando outras ROS (KOWALTOWSKI et al., 2009).



**Figura 3.** Esquema representando a cadeia transportadora de elétrons com formação de ROS. CuZnSOD: superóxido dismutase-cobre/zinco; Mn-SOD: superóxido dismutase-manganês;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio;  $O_2^{\cdot-}$ : ânion superóxido. Figura adaptada de Cerqueira, Medeiros e Augusto (2007).

A enzima xantina oxidase é a segunda mais importante fonte geradora de ROS na isquemia-reperfusão. Ela está expressa, por exemplo, em vasos sanguíneos, células endoteliais, fígado e no plasma sanguíneo (MARTINEZ-HERVAS et al., 2010). A forma nativa dessa enzima é a xantina desidrogenase, que não atua reduzindo o oxigênio molecular

e, dessa maneira, não forma o  $O_2^{\bullet-}$ . Sua forma oxidase está pouco presente nos tecidos saudáveis. Em situações de estresse cardíaco como a isquemia, ocorre conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, através da modificação de um grupamento sulfidril ou por clivagem proteolítica. A xantina oxidase ainda é capaz de catalisar a reação da hipoxantina em ácido úrico, mas em acoplamento com a redução parcial do oxigênio molecular gerando dessa forma o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012).

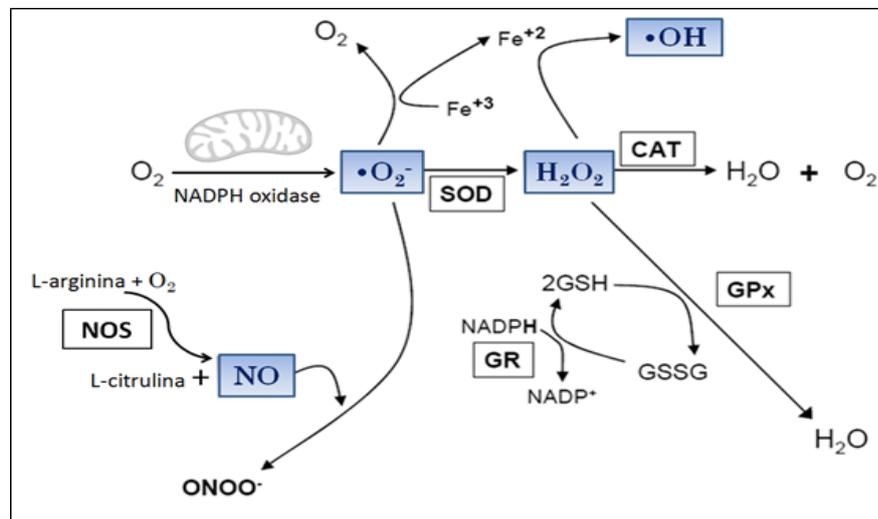
A NADPH oxidase é um complexo enzimático que atua como doador de elétron para a redução do  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$ , segundo a reação:  $2O_2 + NADPH = 2 O_2^{\bullet-} + NAD(P) + H^+$  (TOUYZ et al., 2002; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). É caracterizado como sendo um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e no citoplasma. O componente associado à membrana é o citocromo b558-oxidase, formado por uma subunidade maior, a gp91phox, e uma menor, p22phox; as três subunidades citoplasmáticas são p47phox, p67phox e p40phox e uma pequena proteína G regulatória (Rac2). A ativação da NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação da subunidade citoplasmática p47phox, desencadeando sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (RUECKSCHLOSS et al., 2001; CAI; GRIENGLING; HARRISON, 2003; DUSTING; SELEMIDIS; JIANG, 2005; TOUYZ et al., 2005).

A partir da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  pode ser gerado o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na matriz mitocondrial, no espaço intermembrana ou no citosol por ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD) (figura 4) ou pode ser formado através de reações entre dois  $O_2^{\bullet-}$ . Uma vez formado o  $H_2O_2$ , este pode, através da reação de *Fenton* ( $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^-$ ), reagir com metais de transição, principalmente o  $Cu^{1+}$  e o  $Fe^{2+}$ , gerando o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). Outra reação importante para a formação de radicais hidroxila é a de *Haber-Weiss* ( $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$ ), em que o  $H_2O_2$  reage com  $O_2^{\bullet-}$  (BARREIROS et al., 2006; BRADY et al., 2006; KOWALTOWSKI et al., 2009).

Segundo Evora e colaboradores (1996), as ROS podem ser lesivas por uma série de mecanismos, dentre eles a peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; oxidação de grupos sulfidril, que inativa uma variedade de enzimas, como a glutatona peroxidase (GPx); alterações do DNA; direta diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), o que compromete o relaxamento vascular dependente do endotélio, devido a formação de peroxidonitrito ( $ONOO^{\bullet-}$ ), um ânion instável e tóxico, formado a partir da reação do radical

superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) com o óxido nítrico (NO); e ativação de citocinas como a interleucina-1 (potente agente pró-inflamatório).

As ROS são naturalmente neutralizadas por sistemas endógenos de defesa antioxidante do organismo, enzimático e não enzimático, que servem para prevenir e/ou reparar a lesão oxidativa. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem SOD, a GPx (glutathiona peroxidase), a catalase (CAT), e a glutathiona redutase (GR). Os antioxidantes não enzimáticos incluem uma variedade de moléculas biológicas, tais como a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), os carotenóides, os flavonóides, os polifenóis e outros antioxidantes exógenos. (RODRIGO, PIETRO, CASTILLO, 2013).



**Figura 4.** Esquema do sistema antioxidante enzimático. Conversão do oxigênio ( $O_2$ ) em ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pelas enzimas NADPH oxidase. 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 ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela catalase (CAT) e/ou glutathiona peroxidase (GPx). O  $H_2O_2$  pode formar radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) após reação reagir com o ferro ( $Fe^{+2}$ ) na reação de Fenton. A glutathiona redutase (GR), mantém o equilíbrio entre a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona 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 ( $OONO^{\cdot}$ ) (adaptado de GRIENGLING; FITZGERALD, 2003).

A enzima SOD catalisa a dismutação de dois moles de  $O_2^{\cdot-}$  a um mol de  $O_2$  e um mol de  $H_2O_2$  (figura 4). (ISHIHARA et al., 2015). Possui três isoformas básicas: Cobre-zinco SOD (SOD-Cu/Zn), que é uma enzima de caráter constitutivo presente no citosol celular; manganês SOD (SOD-Mn), enzima expressa em caráter induzido em resposta a situações de estresse celular (estresse oxidativo e citocinas inflamatórias) e encontra-se nas mitocôndrias; e SOD extracelular (EC-SOD), enzima constitutiva localizada na matriz extracelular (FRIDOVICH,

1997). A Mn-SOD, por sua localização mitocondrial, desempenha papel fundamental na detoxificação do excesso de  $O_2^-$  produzido nas reações oxidativas aeróbicas (KINNULA, 2005).

A GPx é uma das principais enzimas no ciclo redox, utiliza glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons na degradação do  $H_2O_2$ . Nesse processo, há a formação de glutatona dissulfeto (GSSH) que é, conseqüentemente, reduzida à GSH pela GR utilizando o NADPH como doador de elétrons (figura 4). A glutatona (GSH) é um tripeptídeo contendo um aminoácido cisteína (grupo tiol - SH) e está presente no coração, exercendo papel central na proteção contra o excesso de radicais livres. Desse modo, as enzimas relacionadas ao metabolismo dos ROS, junto à CAT, são grandes responsáveis pela detoxificação da maior parte do  $H_2O_2$  produzido pelo organismo. Entretanto, diferentemente da CAT, elas são responsáveis pela degradação de hidroperóxidos, potencialmente nocivos ao organismo (FORGIONE, 2002; CHABORY et al., 2009).

A CAT é uma enzima responsável pela degradação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (figura 4). Essa enzima contém a estrutura heme ligada ao ferro. No coração, a CAT está presente nos perioxossomos e nas mitocôndrias. É ativada por acúmulo de grandes quantidades de  $H_2O_2$ , e pode atuar na degradação de pequenos hidroperóxidos (metil ou etil hidroperóxidos) (GOODSELL, 2004).

Os antioxidantes não enzimáticos como, por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), desempenham papéis importantes nas linhas de defesa contra a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. O  $\alpha$ -tocoferol é um potente captador de radicais peroxila ( $LOO^\cdot$ ), evitando a reação deste e de outros radicais livres com as membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas (BUETTNER, 1993; TRABER; MANOR, 2012). Estudos recentes têm mostrado que dose elevada de vitamina C pode prevenir ou restaurar comprometimento do fluxo microcirculatório por inibição da ativação de NADPH oxidase e da NOS, aumentando tetrahydrobiopterina, impedindo desacoplamento de fosforilação oxidativa, e diminuindo a formação de  $O_2^-$  e  $ONOO^-$ . Estes efeitos protetores podem promover a recuperação de pacientes que passaram por revascularização de miocárdio em combinação com outros antioxidantes (OUDEMANS-VAN STRAATEN; SPOELSTRA-DE MAN; DE WAARD, 2014).

### 2.3 Produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde os tempos antigos merecendo destaque os povos egípcios, greco-romanos e chineses. O conhecimento desenvolvido pelos povos primitivos do arsenal químico da natureza foi muito relevante para que fosse descoberta uma diversidade de substâncias, muitas delas para uso terapêutico (VIEGAS JR et al., 2006).

O uso popular e o aumento do interesse científico para os produtos naturais têm direcionado pesquisas para a promoção da saúde e tratamento de doenças como as cardiovasculares, por exemplo. Vários produtos naturais apresentam potencial terapêutico para as doenças do sistema cardiovascular, sendo que dentre os mecanismos de ação das mesmas está a de antioxidante na fisiopatologia provocada pelo IAM (HAMILTON et al., 2004; MIGUEL-DOS-SANTOS; LAUTON-SANTOS, 2016). Além da atividade antioxidante, os produtos naturais têm outras propriedades biológicas que levam ao risco reduzido para doenças cardiovasculares, desempenhando papel importante na prevenção e controle dessas (SHUKLA et al., 2010).

Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel significativo na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (HAMILTON et al., 2004). Dessa forma, o consumo de antioxidantes que inibem a formação de radicais livres diminui a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (DROGE, 2002; BARREIROS et al., 2006). Além disso, estudos mostraram que substâncias com ação antioxidante podem inativar as ROS e, assim, prevenir e/ou proteger contra a lesão isquêmica (CAI et al., 2004; ZHONG et al., 2010).

Estudos produzidos em modelo de infarto mostram alguns efeitos benéficos do uso de produtos naturais. Através da ligadura da artéria coronária descendente esquerda, foi observado que o tratamento com o extrato de raiz de *Ilex cornuta* diminuiu o tamanho da área do infarto do miocárdio e suprimiu as atividades de lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK). Além disso, foi capaz de atenuar as alterações histopatológicas dos tecidos cardíacos e a produção de MDA, ao mesmo tempo em que aumentou a atividade da SOD (YAUN et al., 2017).

Outro estudo submeteu ratos à ligadura da artéria coronária anterior esquerda e tratou-os com *Dang Gui Bu Xue Tang* (usada na medicina chinesa, obtido por decocção de sua folha). O tratamento foi capaz de reduzir a área de extensão tecidual do infarto do miocárdio, suprimir a quantidade de LDH, CK e MDA e aumentar os conteúdos de SOD, GSH e CAT (CHUNHUA et al., 2017).

Efeitos benéficos também foram observados nas lesões decorrentes do IAM em estudos cujos animais foram submetidos a isquemia e reperfusão e tratamento com algum produto natural. Dentre esses, no trabalho de Czompa e colaboradores (2014), os animais foram tratados com o extrato de amêndoa de cerejeira (*Prunus cerasos*) e, posteriormente, os corações foram submetidos a isquemia e reperfusão. Houve melhora da função cardíaca pós-isquemia e redução da extensão do infarto. Mohanty e colaboradores (2010) administraram *Bacopa monniera* via oral e observaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes e diminuição da lipoperoxidação. Esses resultados também foram observados em outros estudos que mostraram os benefícios da utilização de produtos naturais em corações isquêmicos reperfundidos (YIM et al., 2000; LIEBGOTT et al., 2000; DEVI et al., 2005).

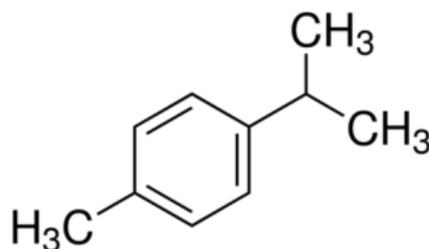
#### **2.4 *p*-Cimeno**

As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas, dentre essas moléculas encontram-se aquelas que fazem parte da constituição dos óleos essenciais (FIGUEIREDO et al., 2008). Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura (RAVEN et al., 2001). Nos óleos essenciais, os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (C15).

Os monoterpenos são constituintes básicos voláteis de óleos essenciais e pertencem a um grupo diverso de compostos químicos. Além disso, apresentam implicações em diversas atividades biológicas, dentre essas, a bradicardia, hipotensão, atividade antimicrobiana, ações sedativas, anticonvulsivantes, hipnóticas e hipotérmicas, efeitos antiespasmódicos, vasorrelaxantes e atividade antinociceptiva (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014; SANTOS et al., 2011).

O *p*-cimeno, que é um monoterpreno, está presente naturalmente em óleos voláteis de mais de 100 plantas, como o *Origanum saccatum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum solymicum*, *Protium sp*, *Nigella sativa*, e em mais de 200 alimentos, como uva, tangerina, laranja, cenoura, framboesa, noz-moscada, orégano e quase todas as especiarias (SELVARAJ et al., 2002).

O *p*-cimeno é definido quimicamente como 1-isopropil-4-metilbenzeno, um monoterpreno aromático biosintético de fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>. O *p*-cimeno apresenta um anel aromático (C1 a C6) ligado a um grupo metil e um grupo isopropílico na conformação para (figura 5) (POULOSE; CROTEAU, 1978; ADAMS et al., 2007; GAMES et al., 2016).



**Figura 5.** Estrutura química do *p*-cimeno (retirada de OLIVEIRA et al., 2014).

Estudos demonstram que o *p*-cimeno apresenta atividades antinociceptiva (SANTANA et al., 2011; BONJARDIM et al., 2012; QUINTANS-JUNIOR et al., 2013), antibacteriana (BAGAMBOULA et al., 2004), fungicida, herbicida (KORDALI et al., 2008), leishmanicida (DE MEDEIROS et al., 2011), anti-colinesterásico (ÖZTÜRK, 2012), anti-inflamatória (LIAPIS et al., 2000) e antioxidante (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, também foram observadas propriedades fitotóxicas e inseticidas no óleo essencial isolado de Turco *Origanum acutidens* que contém o *p*-cimeno como um de seus constituintes (KORDALI et al., 2008). Ademais, o *p*-cimeno é utilizado nas indústrias farmacêuticas, nas produtoras de fungicidas e pesticidas. Há também o emprego do *p*-cimeno como agente aromatizante (SELVARAJ et al., 2002).

Zhong e colaboradores (2013) testaram a toxicidade induzida pelo *p*-cimeno em cultura de macrófagos murinos (RAW 264.7) pelo teste com MTT [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio]. Observou-se no teste de MTT que o *p*-cimeno não apresentava toxicidade celular contra as células analisadas ao longo de 18 horas em concentrações variando de 0 a 428,65 µg / mL.

O estudo de Oliveira e colaboradores (2014) descreve atividade antioxidante do *p*-cimeno no sistema nervoso. Nesse estudo, ratos *Wistar* receberam as doses de 50, 100 e 150 mg/kg (i.p.), após 24 horas o hipocampo desses ratos foi avaliado. Constatou-se diminuição na peroxidação lipídica e aumento da atividade da CAT e SOD quando comparados ao grupo controle, demonstrando o seu potencial antioxidante *in vivo* e agente neuroprotetor para o cérebro. Outro estudo mostra que o *p*-cimeno é capaz de diminuir a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical hidroxil *in vitro* (QUINTANS-JUNIOR et al., 2013). Assim, observa-se que o *p*-cimeno apresenta potencial antioxidante, característica importante, que pode auxiliar na diminuição da produção de ROS, diminuindo consequentemente os danos causados pelo estresse oxidativo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do pré-tratamento com *p*-cimeno em lesões decorrentes da isquemia e reperfusão (I/R) em corações isolados de ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito promovido pelo *p*-cimeno sobre os parâmetros contráteis em corações submetidos a I/R;
- Investigar o efeito antioxidante do *p*-cimeno nos corações após I/R.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

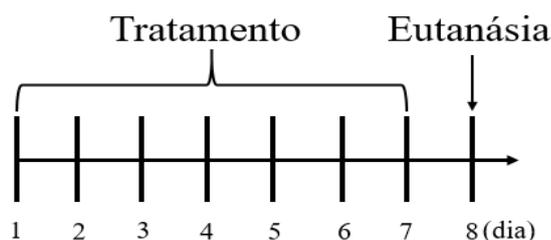
### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério do Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo da Universidade Federal de Sergipe (LaBCEO/UFS). Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12/12 horas e mantidos a temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa animal da Universidade Federal de Sergipe com número de protocolo #57/15. Durante a execução dos experimentos foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.2 Delineamento experimental

Inicialmente, foi realizado um ensaio prévio para determinar a dose do *p*-cimeno a ser utilizada. O 1-metil-4- (1-metiletil) benzeno ou *p*-cimeno (99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich, EUA. Os ratos foram distribuídos em 5 grupos (5 animais por grupo) sendo estes: controle, 25 mg, 50 mg, 100 mg e 150 mg/kg/dia. Estes foram pré-tratados durante 7 dias via gavagem e no oitavo dia foi realizado ECG *in vivo* e após a eutanásia, os corações foram submetidos ao teste TBARS (item 5.1).

Após a escolha da dose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (8 animais por grupo): Controle, Veículo e *p*-Cimeno (150 mg/kg/dia). Todos os grupos passaram pelo sistema Langendorff para a indução da I/R. No entanto, o grupo controle não foi submetido à I/R. Os grupos Controle, Veículo e *p*-Cimeno foram pré-tratados durante 7 dias com salina 0,9% (grupo controle e veículo) e *p*-cimeno (grupo *p*-Cimeno) (figura 6). Os animais receberam o *p*-cimeno via oral (gavagem) na dose de 150 mg/kg/dia, determinada pelo ensaio prévio e baseada na dose utilizada na literatura (OLIVEIRA et al., 2014). O *p*-cimeno foi administrado na forma livre, veiculado a 0,5 mL de solução salina 0,9%.



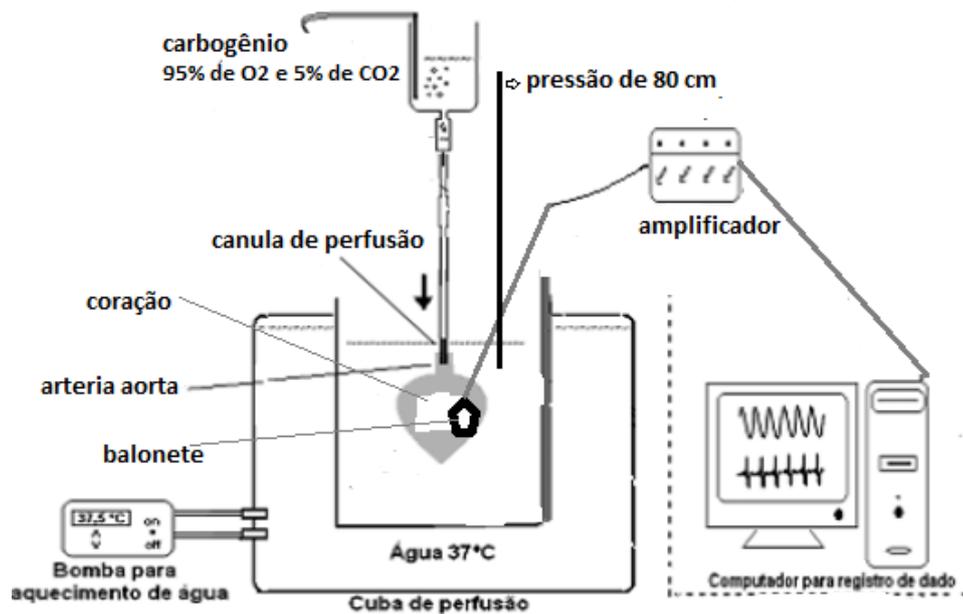
**Figura 6.** Modelo esquemático do período de tratamento o animal, para ser submetido ao protocolo de isquemia e reperfusão.

#### 4.3 Modelo de isquemia e determinação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE)

No oitavo dia, um dia após o encerramento do tratamento de sete dias, cada animal recebeu 400 unidades de heparina (i.p.). Após 15 minutos, os animais foram eutanasiados por decapitação. O coração foi exteriorizado rapidamente após toracotomia, imediatamente canulado via artéria aorta e conectado ao sistema de perfusão de órgão isolado do tipo Langendorff (figura 7) (BELL; MUCANU; YELLON, 2011). Após a montagem do sistema, o coração foi perfundido com solução fisiológica de Krebs (tabela 1) a 37°C e pH 7,4, aerada por mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), e pressão de 80 cmH<sub>2</sub>O. O átrio esquerdo foi retirado para o posicionamento do balonete (no interior do ventrículo esquerdo) conectado a um transdutor pressórico, que por sua vez estava ligado a um receptor analógico/digital ligado a um computador. Foram registrados os seguintes parâmetros: a PDVE e as derivadas temporais de pressão ventricular máxima (+dP/dt) e mínima (-dP/dt) nas condições basais do coração e durante o período de reperfusão. Em seguida, os dados foram captados pelo *software* WindaqEX® e no LabChart7® (AD Instruments), onde os dados obtidos de PDVE e as +dP/dt e -dP/dt, foram representados em percentual da linha de base.

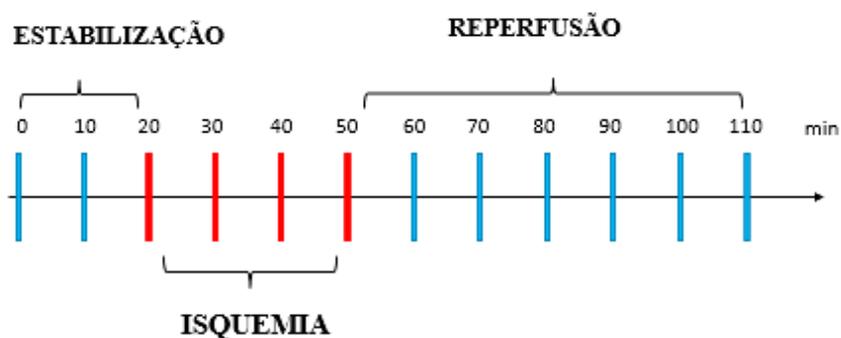
**Tabela 1.** Solução de Krebs

Substâncias:	Concentrações (mmol/L)
NaCl	118,4
KCl	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,5
Glicose	11,7
NaHCO <sub>3</sub>	26,5



**Figura 7.** Esquema representando o sistema de perfusão Langendorff. Adaptado de Tavares e colaboradores (2013).

Uma vez montado o sistema de perfusão com o coração canulado e o balonete devidamente posicionado no ventrículo esquerdo, foi aguardado um período de 20 minutos de estabilização. Após a estabilização, o fluxo da solução nutritora (Krebs) foi ocluído de forma global durante 30 minutos. Após esse tempo, esse fluxo foi reestabelecido e a solução de Krebs foi reestabelecido por 60 minutos sob o monitoramento da PDVE e as  $dp/dt$  máxima e mínima.



**Figura 8.** Esquema representando o protocolo de indução de isquemia e reperfusão e os intervalos para avaliação dos registros contráteis cardíacos antes e após a isquemia global.

#### 4.4 Determinação do índice de severidade da arritmia (ASI)

Conforme Bernauer (1986), a severidade das arritmias cardíacas foi avaliada e classificada durante os 30 minutos iniciais do período de reperfusão, através do índice de severidade das arritmias (ASI). O índice correlaciona a duração das arritmias com um fator, como demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2.** Índice de Severidade das Arritmias

Duração (minutos)	Fator
< 3	2
3-6	4
7-10	6
11-15	8
16-20	10
21-25	11
26-30	12
>30	Irreversível

#### 4.5 Determinação de peroxidação lipídica

Esta técnica baseia-se na reação entre produtos indiretos de peroxidação lipídica, como o malonaldeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições ácidas e em elevadas temperaturas. A mensuração dos produtos da peroxidação lipídica foi determinada segundo protocolo adaptado de Bose, Sutherland e Pinsky (1989). Resumidamente, as amostras foram cortadas, pesadas e homogeneizadas em solução de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), contendo butil-hidroxitoluol (BHT: 12,6 mmol/L). Em seguida, 200 µL do homogeneizado foi incubado a 90°C por 45 minutos em meio ácido, com a adição de 400 µL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,37%), ácido tricloroacético (TCA 15%) e ácido clorídrico (HCl: 0,25 mol/L). As amostras, em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Ao sobrenadante (300 µL), acrescentou-se n-butanol (300 µL) e solução saturada de NaCl (20 µL). A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 2 minutos. Alíquotas (200 µL) do sobrenadante foram pipetadas em placas de 96 poços para a leitura de absorbância em leitor de microplaca

(Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 535 nm, corrigindo pelos valores de absorvância a 572 nm. A quantidade de MDA produzida foi expressa em nanomoles por gramas de tecido.

#### **4.6 Mensuração do grupamento sulfidril**

Como medida de oxidação de grupamentos tiol de proteínas e peptídeos foi avaliada a concentração de grupamentos sulfidril. O método baseia-se na reação entre o DTNB [ácido 5'-ditio-bis- (2-nitrobenzóico)] com um grupo sulfidril livre para produzir dissulfeto misturado e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (NTB), um produto mensurável de cor amarela. As amostras foram incubadas com 3 mmol/L de DTNB por 10 minutos, e após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®) foram lidas em espectrofotômetro de microplacas a 412 nm (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

#### **4.7 Determinação da concentração total de proteínas**

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método adaptado de Lowry e colaboradores (1951). O tecido cardíaco foi homogeneizado em tampão fosfato (NaCl 137 mmol/L; KCl 2,7 mmol/L; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,1 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mmol/L) através da proporção: 1 mL de tampão/100 mg de coração de rato. Depois da homogeneização da amostra, todo o resultado do preparado foi transferido para microtubo (eppendorf). Em seguida, centrifugado a velocidade de 12.000 rpm, durante 30 minutos, a temperatura de 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e então adicionado NaOH (0,5 mol/L), solução A (CuSO<sub>4</sub> a 2% + Tartarato de Na/K + NaCO<sub>3</sub>) e posteriormente, reagente de Folin na placa de 96 poços e submetido a leitura a 630 nm em espectrofotômetro de placas (BioTeK®).

#### **4.8 Mensuração da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi mensurada através da formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> induzida pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2] segundo Madesh e Balasubramanian (1998). Em síntese, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4) na proporção de 1 mL de tampão/100 mg de tecido cardíaco. Após a preparação do tecido, o mesmo foi centrifugado a 12.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 30 minutos. A reação foi realizada pipetando em microplaca de 96 poços: o

sobrenadante obtido, tampão fosfato, MTT (1,25 mmol/L) e pirogalol (100 µmol/L). A microplaca foi agitada por 5 minutos e logo após acrescentado DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 570 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por micrograma de proteína.

#### **4.9 Mensuração da atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi mensurada conforme o método descrito por Nelson e Kiesow (1972) e adaptado por Gioda e colaboradores (2010). Em suma, a amostra foi homogeneizada em PBS (Solução salina tamponada com fosfato) e em seguida o preparado homogeneizado foi centrifugado (Heal Force, Neofuge 15R) a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em cubeta de quartzo foi pipetado tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e o sobrenadante (resultado da centrifugação). A reação foi iniciada com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mol/L). As medidas foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi, Japão) durante 1 minuto, em intervalos de 15 segundos, a 25°C, no comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima foi expressa pela diferença da variação das absorbâncias ( $\Delta E/\text{minuto}/\text{micrograma de proteínas}$ ).

#### **4.10 Mensuração da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)**

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (50 mmol/L), acrescido de KCl (140 mmol/L), com pH 7,4 (1:10, p/v). Em seguida, o preparado homogeneizado foi centrifugado (Heal Force, Neofuge 15R) a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante separado para o ensaio. Na microplaca foi colocado tampão fosfato (100 mmol/L, pH 7,0), NADPH (8,4 µmol/L), glutathione redutase (10 U/mg de proteína/mL), azida sódica (NaN<sub>3</sub>, 1,125 mol/L), glutathione (0,15 mmol/L), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2,2 mmol/L) e a amostra. O monitoramento foi feito a 340 nm, 25°C, por 8 minutos. A atividade da GPx foi avaliada pela oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos em nmol/NADPH/minuto/micrograma de proteínas (PAGLIA, VALENTINE, 1967).

#### **4.11 Avaliação da Atividade da Glutathione Redutase (GR)**

Em síntese, a amostra foi homogeneizada em tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 6,3 mmol/L), acrescido de Leupeptina (5 mg/mL) e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100 mmol/L). O preparado homogeneizado

foi centrifugado por 30 minutos, a 12.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) e a 4°C. Para o ensaio, ao sobrenadante retirado foi adicionado solução de albumina (0,5 mg/mL de tampão) e Glutathiona reduzida (GSSH) (10 mmol/L). A reação foi iniciada com a adição de NADPH (1,2 mg/mL). O monitoramento foi feito a 340 nm (Hitachi, Japão), 37°C, por 8 minutos. O resultado foi expresso em miliunidade de GR/minuto/micrograma de proteínas (CARLBERG; MANNERVIK, 1985).

#### **4.12 Lactato Desidrogenase (LDH)**

Para a determinação da atividade desta enzima a solução nutritora foi coletada após sua infusão e saída do coração durante o período de estabilização e reperfusão. A essa solução de Krebs coletada pós-perfusão do tecido cardíaco dá-se o nome de perfusato. Para realização do teste foram adicionados ao perfusato os reagentes do kit para determinação da atividade da LDH. A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância aferida em 340 nm, devido a oxidação do NADH, é proporcional à atividade da LDH na amostra conforme instruções do fabricante (LabTeste).

#### **4.13 Análise estatística**

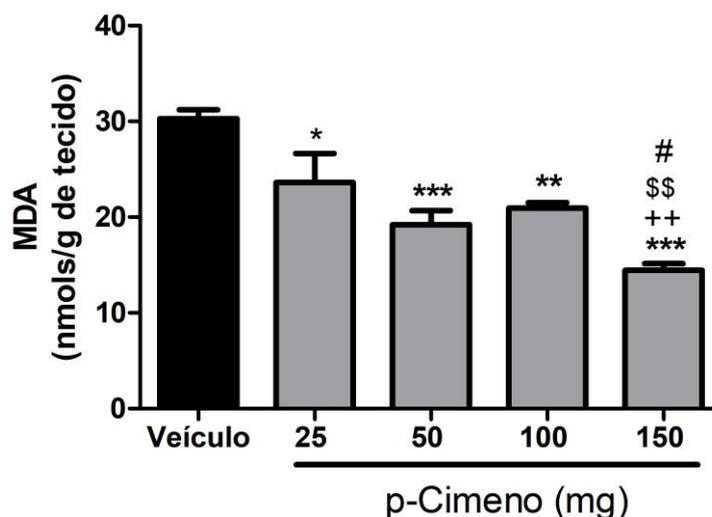
Para a sistematização e observação, os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, depois tabulados e confeccionados em gráficos utilizando-se o *software* GRAPHPAD PRISMA, versão 5.1 (*GraphPad Software, Inc.*, EUA). As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) para esquema de um (*one-way*) ou dois fatores (*two-way*), complementada com o pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, quando os resultados das variáveis apresentaram distribuição normal. As conclusões estatísticas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação da dose de *p*-cimeno a ser utilizada no pré-tratamento dos animais

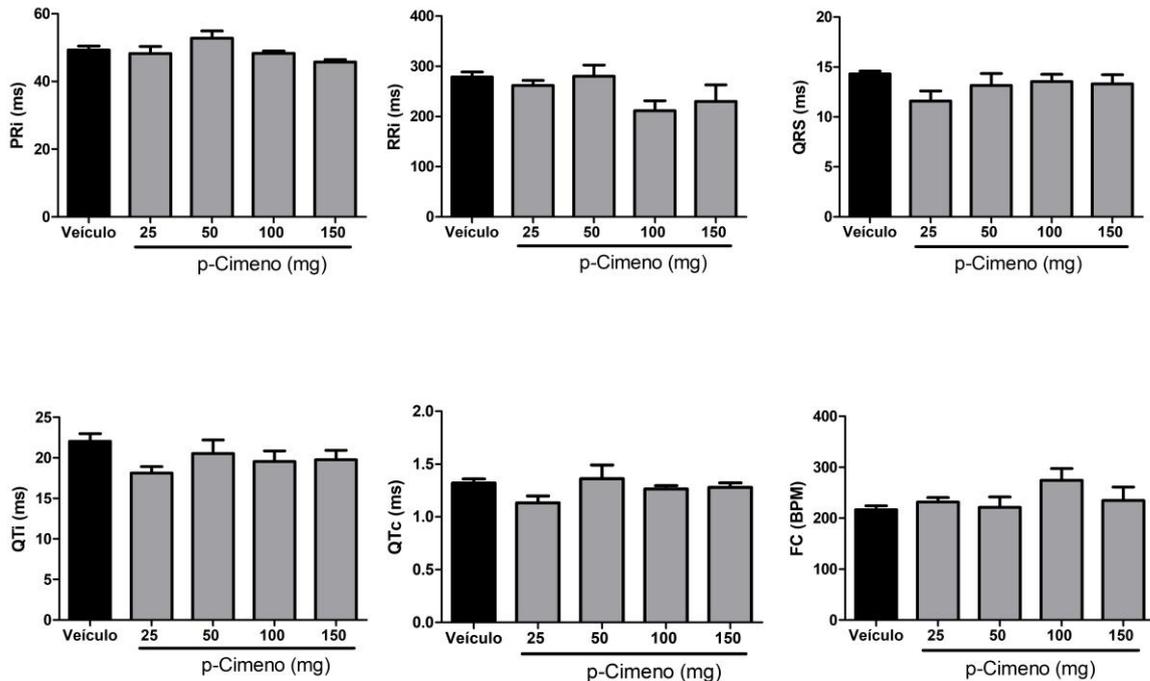
Para a determinação da dose a ser utilizada no pré-tratamento dos ratos foram realizados os testes de peroxidação lipídica (TBARS) e os parâmetros eletrocardiográficos *in vivo*. Nesses ensaios, foram comparadas as doses de 25, 50, 100 e 150 mg/kg/dia quanto ao efeito sobre a peroxidação lipídica no tecido cardíaco e também quanto a interferência nos parâmetros elétricos do coração dos animais vivos avaliados.

O pré-tratamento com essas doses avaliadas diminuiu a formação de MDA, sendo que a dose de 150 mg/kg/dia reduziu a formação de MDA para valores próximos a 50% quando comparados ao grupo Veículo, e apresentou redução significativa de MDA em relação as outras doses (figura 9). Oliveira e colaboradores (2014) utilizando o *p*-cimeno nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg/dia, constatou que a dose de 150 mg/kg/dia apresentou um efeito pronunciado quando comparado as outras doses nos parâmetros avaliados (formação de MDA e atividade da SOD e CAT). Assim nesse estudo foi utilizado o *p*-cimeno na dose de 150 mg/kg/dia.



**Figura 9.** Medida de malonaldeído (MDA) em coração de ratos pré-tratados com *p*-cimeno (25, 50, 100 e 150 mg/kg/dia) durante 7 dias (gavagem) (n=4, por grupo). \*p<0,05, 25 mg vs. veículo; \*\*p<0,01, 50 mg vs. veículo e 100 mg vs. veículo; \*\*\*p < 0,001, 150 mg vs. veículo; ++p<0,01, 150 mg vs. 25 mg; #p<0,05, 150 mg vs. 50 mg; \$\$ p<0,01 150 mg vs. 100 mg/kg/dia.

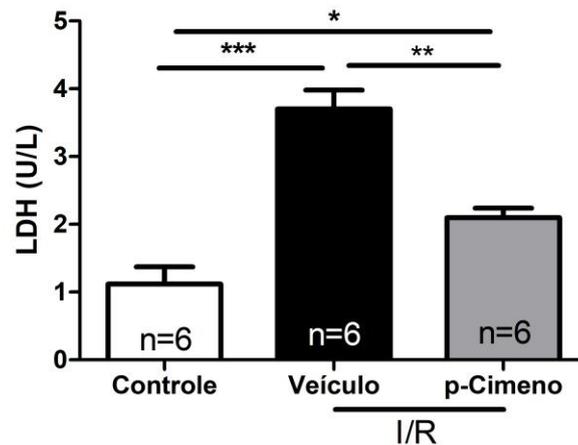
A avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos desses animais foi realizada *in vivo*, e foi observado que o pré-tratamento com o *p*-cimeno não alterou nenhum dos intervalos elétricos cardíacos avaliados (figura 10).



**Figura 10.** Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos *in vivo* em ratos pré-tratados com *p*-cimeno (25, 50, 100 e 150 mg/kg/dia) durante 7 dias. (n=4, por grupo). Teste ANOVA “one way”, seguido do pós-teste Bonferroni. PRi (intervalo entre a onda P e o R do complexo QRS); RRi (intervalo entre dois complexos QRS); QRS (complexo QRS); QTl (intervalo entre Q e a onda T); QTc (intervalo QT corrigido); FC (frequência cardíaca).

## 5.2 Mensuração da lactato desidrogenase (LDH)

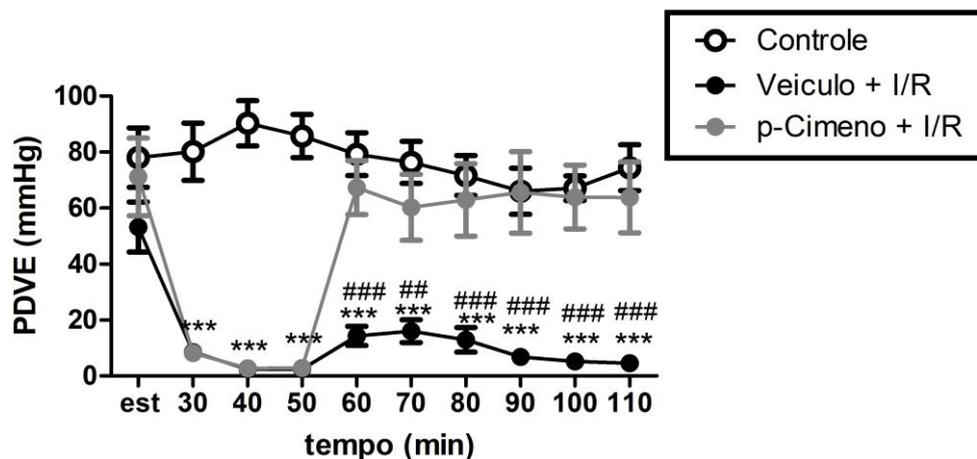
Para avaliação dos danos teciduais através da liberação de biomarcadores do tecido, a LDH foi mensurada no perfusato. Na figura 11, observa-se que o grupo Veículo ( $3,70 \pm 0,28$  U/L; n=6) apresenta maior produção de LDH quando comparado ao grupo Controle ( $1,10 \pm 0,25$  U/L; n=6). O grupo pré-tratado com *p*-cimeno ( $2,10 \pm 0,14$  U/L; n=6) mostrou taxa de inibição de 62% na concentração de LDH, quando comparado ao grupo Veículo.



**Figura 11.** Medida de lactato desidrogenase (LDH) em perfusato de corações pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos a isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “one way”, seguido do pós-teste Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3 Determinação da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE)

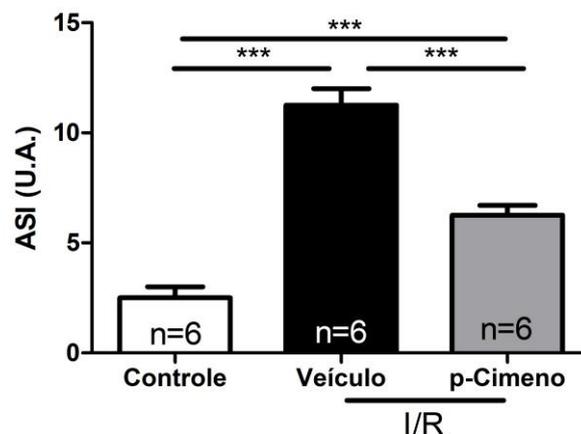
Para a avaliação da contratilidade cardíaca em corações submetidos à I/R em modelo experimental foi analisada a PDVE (figura 12). Após a isquemia, durante a reperfusão, foi verificado que os corações dos animais do grupo Veículo apresentaram decaimento da força contrátil quando comparados aos dos animais do grupo Controle. Em contraste com o grupo Veículo, o pré-tratamento com o *p*-cimeno melhorou a força contrátil em até 85,9%.



**Figura 12.** Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) durante a estabilização, isquemia global e reperfusão do coração isolado de ratos pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias. Teste ANOVA “two-way”, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$ , controle vs veículo; ### $p < 0,001$ , veículo vs *p*-cimeno; (n=6, por grupo).

#### 5.4 Determinação do índice de severidade da arritmia (ASI)

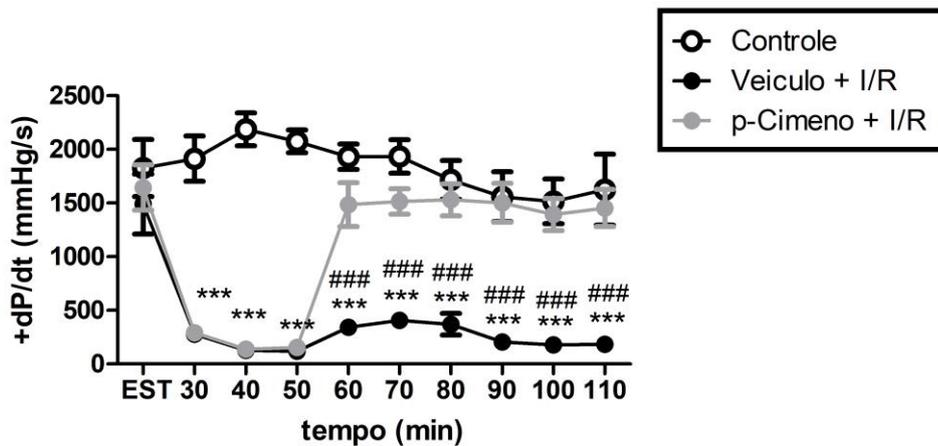
Com o objetivo de avaliar as alterações no ritmo cardíaco após a isquemia foi mensurado o ASI (figura 13). Observamos que o grupo Veículo ( $11,00 \pm 1,00$  U.A.,  $n=6$ ) apresentou maiores índices comparados ao Controle ( $2,67 \pm 0,67$  U.A.,  $n=6$ ). O grupo que recebeu o *p*-cimeno ( $6,33 \pm 0,61$  U.A.,  $n=6$ ) apresentou menores índices que o grupo Veículo, mas não preveniu totalmente a ocorrência de arritmias.



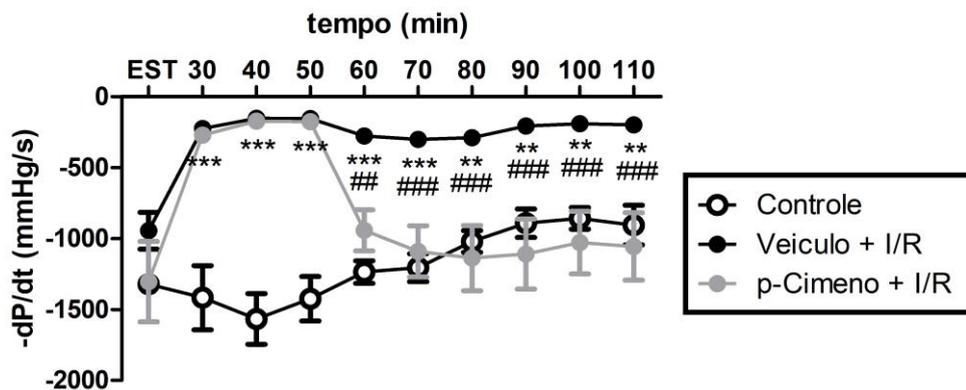
**Figura 13.** Índice de Severidade de Arritmias (ASI) determinados nos corações isolados de ratos pré-tratados durante 7 dias com *p*-cimeno (150 mg/Kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “one way”, seguido do pós-teste Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$ . U.A. (Unidade Aleatória)

#### 5.5 Determinação das derivadas temporais de pressão ventricular máxima (+dP/dt) e mínima (-dP/dt)

Para avaliação da função sistólica do coração foi utilizada a derivada de pressão dividida pelo tempo, que demonstra se houve aumento ou diminuição da força contrátil. Podemos observar nas figuras 14 e 15 que os corações do grupo Veículo, apresentaram decaimento das dP/dt quando comparados ao grupo Controle. Por sua vez o grupo de animais pré-tratados com o *p*-cimeno apresentou melhora da +dP/dt em até de 81,0% e da -dP/dt em até 67,8% com o passar do tempo, quando comparados aos animais do grupo Veículo.



**Figura 14.** Derivada temporal de pressão ventricular máxima (+dP/dt) em animais pré-tratados durante 7 dias com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “two-way”, seguindo do pós-teste Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$ , controle vs. veículo; ### $p < 0,001$ , veículo vs. *p*-cimeno. (n=6, por grupo).

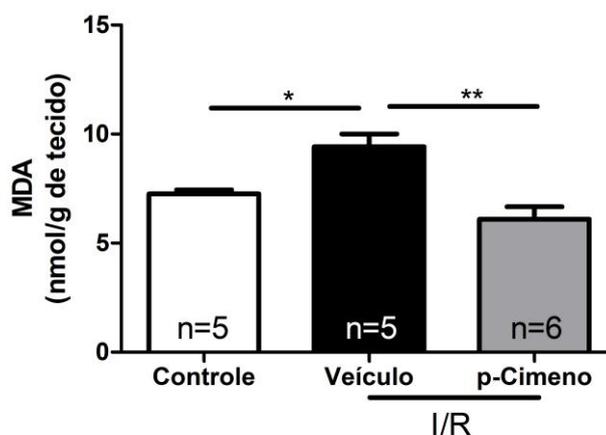


**Figura 15.** Derivada temporal de pressão ventricular mínima (-dP/dt) em animais pré-tratados durante 7 dias com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) e submetidos a isquemia e reperfusão. Teste ANOVA *one-way*. \* $p < 0,05$ , controle vs. veículo; \*\*\* $p < 0,001$ , controle vs. veículo; ### $p < 0,001$ , veículo vs. *p*-cimeno. (n=6, por grupo).

## 5.6 Determinação da Peroxidação Lipídica

No intuito de avaliarmos os danos causados aos lipídeos de membrana através da mensuração da formação do MDA utilizamos o teste TBARS. Observamos que houve maior formação do MDA no grupo Veículo ( $9,40 \pm 0,58$  nmol/g de tecido, n=5) quando comparado ao grupo Controle ( $7,20 \pm 0,17$  nmol/g de tecido, n=5). Nos animais tratados com *p*-cimeno

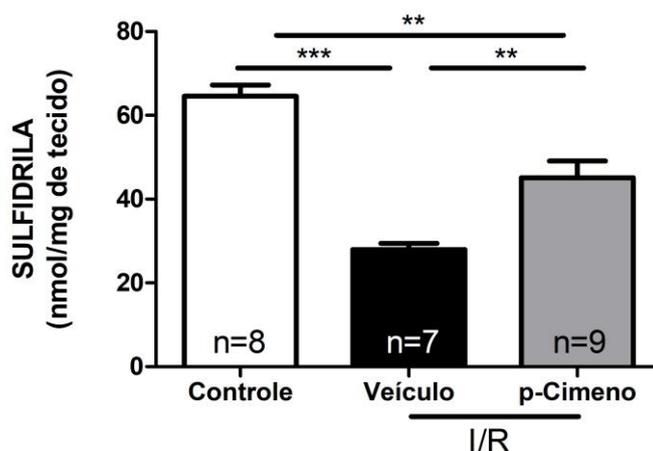
( $6,10 \pm 0,56$  nmol/g de tecido,  $n=6$ ) houve reversão da formação do MDA, quando comparamos com o grupo Veículo (figura 16).



**Figura 16.** Medida de Malonaldeído (MDA) em coração de animais pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos a isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “one-way”, seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 5.7 Mensuração do grupamento sulfidril

Na figura 17 foi observado que os corações isolados de animais do grupo Veículo apresentaram diminuição de grupamentos sulfidrilas ( $27,90 \pm 1,45$  nmol/mg de tecido;  $n=7$ ) quando comparado ao grupo Controle ( $64,50 \pm 2,66$  nmol/mg de tecido;  $n=8$ ). No grupo tratado com *p*-cimeno ( $45,10 \pm 3,98$  nmol/mg de tecido;  $n=9$ ) houve preservação de 53% dos grupamentos sulfidrilas, em relação ao grupo veículo.

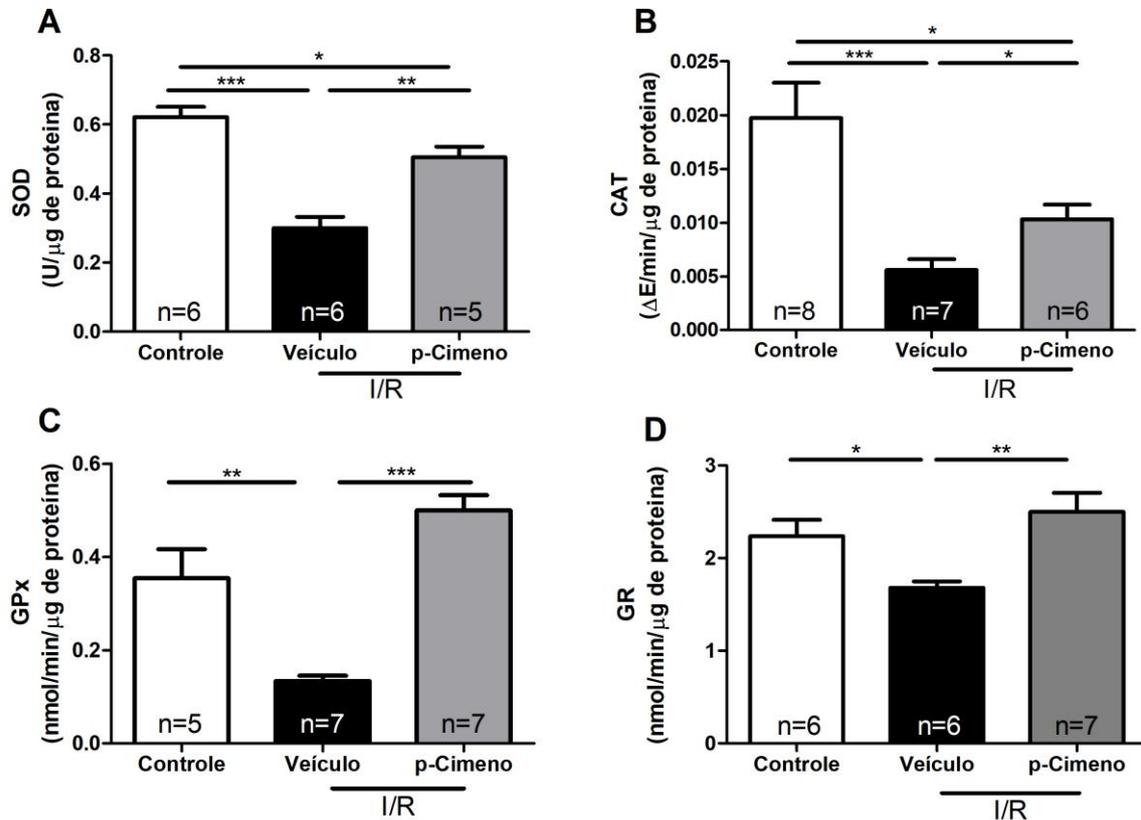


**Figura 17.** Concentração de grupamentos sulfidrila em corações de animais pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos à isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “one way”, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.8 Mensuração da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Glutathiona Redutase (GR)

Com o objetivo de identificar a origem da cardioproteção durante a I/R conferida pelo pré-tratamento com *p*-cimeno, verificamos a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GR) presentes no tecido cardíaco. Observamos diminuição da atividade das enzimas no grupo Veículo, quando comparamos com o Controle em todos os ensaios analisados. Porém, identificamos que a atividade da SOD (figura 18 A) no grupo de animais pré-tratados com *p*-cimeno ( $0,50 \pm 0,03$  U de SOD/ $\mu$ g de proteína,  $n=5$ ) apresentou uma preservação de 62,5% da atividade enzimática comparada ao grupo de animais que receberam o veículo ( $0,300 \pm 0,03$  U de SOD/ $\mu$ g de proteína,  $n=6$ ), não apresentando diferença comparado aos animais do grupo controle ( $0,62 \pm 0,02$  U de SOD/ $\mu$ g de proteína,  $n=6$ ). O que também é observado na atividade da enzima CAT (figura 18 B), apresentando maior preservação atividade cerca de 36% no grupo *p*-cimeno ( $0,01 \pm 0,001$   $\Delta$ E/min/ $\mu$ g de proteína,  $n=6$ ) comparado ao grupo Veículo ( $0,005 \pm 0,001$   $\Delta$ E/min/ $\mu$ g de proteína,  $n=7$ ), porém não foi capaz de preservar a ponto de ficar próximo a valores basais, demonstrado no grupo controle ( $0,019 \pm 0,003$   $\Delta$ E/min/ $\mu$ g de proteína,  $n=8$ ). A enzima GPx (figura 18 C) também apresentou atividade aumentada no grupo *p*-cimeno ( $0,50 \pm 0,03$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína,  $n=7$ ), quando comparamos com o Veículo ( $0,13 \pm 0,01$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína,  $n=7$ ), recuperando a atividade da enzima, como demonstrado pelo controle ( $0,35 \pm 0,06$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína,

n=5). A enzima GR (figura 18 D) também apresentou maior atividade no grupo *p*-cimeno ( $2,50 \pm 0,20$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína, n=7) quando comparado com o veículo ( $1,68 \pm 0,06$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína, n=6). Recuperando a atividade dessa enzima quando comparado ao grupo controle ( $2,23 \pm 0,17$  nmol/min/ $\mu$ g de proteína, n=6).



**Figura 18.** Atividade das enzimas antioxidantes SOD (painel A), CAT (painel B), GPx (painel C) e GR (painel D) em corações de ratos pré-tratados com *p*-cimeno (150 mg/kg/dia) durante 7 dias e submetidos à isquemia e reperfusão. Teste ANOVA “one way”, seguido do pós-teste de Bonferroni. SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GPx (glutaciona peroxidase) e GR (glutaciona redutase). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6 DISCUSSÃO

Durante a isquemia miocárdica é deflagrada uma série de eventos metabólicos celulares e de transportes iônicos que, em última análise, podem ser danosos para o tecido cardíaco que se tornam ainda mais deletérios de acordo com a progressão do período de tempo em isquemia (MALBOUISSON et al., 2005). Há relatos na literatura de que a reperfusão pós-isquêmica também provoca sérios prejuízos ao tecido e induz danos irreversíveis ao tecido cardíaco (AALTO; RAIVIO, 1993; FRÖHLICH et al., 2013; ZHANG, J. et al., 1994).

No presente estudo, para avaliar o efeito promovido pelo *p*-cimeno sobre os parâmetros fisiológicos contráteis em corações isolados submetidos a I/R, foram avaliados a PDVE, a  $dP/dt$  mínima e máxima e as arritmias, classificadas conforme o ASI. Observou-se inicialmente, que no grupo Veículo houve depressão contrátil cardíaca com diminuição da força após a I/R, bem como altos índices de arritmias. Achado semelhante foi demonstrado por Rodrigo; Prieto e Castillo (2013), que observaram dano contrátil severo com diminuição progressiva da pressão desenvolvida no ventrículo (PVDE), bem como no índice de contratilidade ( $dP/dt$ ) quando os corações foram submetidos a isquemia global com a duração de 30 minutos. O mesmo foi constatado por Sant'ana Júnior e colaboradores (2005), demonstrando um efeito depressor na contração cardíaca induzida pela I/R.

Vários biomarcadores cardíacos específicos desempenham um papel importante na identificação precoce de danos ao coração, melhorando, dessa forma, a precisão diagnóstica e fornecendo informações prognósticas na cardiopatia isquêmica. Dentre estes biomarcadores o LDH é uma ferramenta importante para avaliar danos teciduais devido a mudança da sua concentração tanto em condições experimentais quanto para acompanhamento clínico de pacientes (RECCHIONI et al., 2013). No presente estudo, observou-se que o grupo Veículo apresentou maior quantidade de LDH liberada pelo tecido submetido a I/R. Os resultados obtidos nesta primeira análise são corroborados por outros estudos, e desta forma comprova-se o comprometimento cardíaco e que o modelo de I/R adotado é viável para os testes propostos (RODRIGO; PRIETO; CASTILLO, 2013; SANT'ANA JÚNIOR et al., 2005).

Assim, ao avaliar os animais pré-tratados com o *p*-cimeno (150 mg/kg/dia), observou-se redução da quantidade de LDH liberado pelo tecido cardíaco após à I/R. Como também, verificou-se recuperação da força contrátil após a isquemia, com preservação tanto da PDVE

quanto das  $dp/dt$  máxima e mínima. Observou-se também que o *p*-cimeno reduziu o índice de arritmias nos corações isolados. Este fato é um indicador importante para a cardioproteção induzida pelo *p*-cimeno, apontando, possivelmente, que essa substância interfere nas correntes iônicas que governam a função contrátil, como a do cálcio. Drogas que bloqueiam canais para cálcio podem oferecer um potencial benefício terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como as arritmias cardíacas (BOMBIG; PÓVOA, 2009; OIGMAN; FRITSCH, 1998; LUFT et al., 1999). A capacidade dos terpenos de atuar nos canais para  $Ca^{2+}$  tem sido observado em músculo cardíaco (SANTOS et al., 2011). Evidenciou-se em cardiomiócito isolado que monoterpenos, tais como a R(+)-pulegona (DE CERQUEIRA et al., 2011) e (-)-mentol (BAYLIE et al., 2010) bloqueiam canais para  $Ca^{2+}$  tipo-L. Magyar e colaboradores (2004), relatou inibição da corrente de cálcio induzida pelos terpenos carvacrol e timol em cardiomiócito canino isolado. O bloqueio desses canais, como por exemplo o do tipo L e do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , podem estar relacionadas com a diminuição das arritmias, pois modulam a entrada de  $Ca^{2+}$  e a contratilidade cardíaca (BOURGONJE et al., 2013). Dessa forma, esse bloqueio pode ser benéfico para o coração, controlando as arritmias.

Uma outra hipótese para esse achado pode estar relacionada ao efeito antioxidante do *p*-cimeno, interferindo deste modo, no ciclo do  $Ca^{2+}$ . A regulação adequada do ciclo do  $Ca^{2+}$  é essencial para a função contrátil normal e é um dos principais locais de falha potencial patológica, contribuindo não só para a disfunção contrátil, mas também para arritmia, disfunção energética e produção de ROS mitocondrial (BERS, 2008). Sabe-se que a sinalização de cálcio envolvida na regulação da função contrátil cardíaca é afetada pelo *status* redox celular (SANTOS, 2011). Estudos mostram que há modificação redox de receptores rianodina (RyR) e canais para cálcio do tipo L, levando a desregulação dos mecanismos de controle intracelular de  $Ca^{2+}$ . Essa desregulação se dá através da oxidação dos resíduos de cisteína presentes na proteína do canal, levando a ativação deste, com consequente sobrecarga de cálcio, resultado da estimulação da liberação do mesmo, desencadeando, desta forma, arritmias, bem como uma depressão contrátil cardíaca (TOCCHETTI et al., 2007; ZENG et al., 2008; ZIMA; BLATTER, 2006). Fatos esses evidenciados nos animais do grupo Veículo, com altos índices de arritmias e depressão contrátil.

Essas arritmias são causadas pelo acúmulo de  $Ca^{2+}$  intracelular que se dá durante a I/R e pela produção ROS (TER KEURS et al., 2006, RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012). Evidências mostram que o estresse oxidativo, com a produção exacerbada de ROS, pode modular canais iônicos como os canais para  $Ca^{2+}$ , e que substâncias que inativam tais

espécies podem diminuir essa atividade do canal (HUANG et al., 2005). Os mecanismos envolvidos na captação de cálcio intracelular, que podem retirar o excesso desse íon, também são afetados pelo estresse oxidativo. Dentre eles temos a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), cuja alta produção de ROS causa sua inativação, impedindo, assim, a recaptção do cálcio após a contração (SHAROV et al., 2006). Dessa forma, agentes antioxidantes podem evitar o acúmulo desse íon de modo a melhorar a contratilidade cardíaca e diminuir a ocorrência de arritmias, o que é constatado no grupo *p*-cimeno.

Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo, também foram citados em estudos que utilizaram produtos naturais em modelos de I/R *ex-vivo*. Por exemplo, o uso de flavonoides, como a Diocleina, mostra efeito antiarrítmico e antioxidante da molécula nas doses de 30, 150 e 300 nmol/L (VIANNA et al., 2006); o uso de monoterpenos como o Timol, em que observou-se efeitos cardioprotetores contra I/R, uma vez que o pré-tratamento dos animais com timol (7,5 mg/kg/dia – durante 7 dias) preserva a função contrátil cardíaca após a isquemia global e reperfusão, reduz danos a componentes celulares e limita a área de infarto, mostrando efeito benéfico para o tecido cardíaco (SANTOS, 2016).

Para investigação do possível efeito antioxidante induzido pelo pré-tratamento com o *p*-cimeno foram avaliados a peroxidação lipídica (através da formação de MDA), atividade das enzimas antioxidantes e a preservação dos grupamentos sulfidrilas das proteínas celulares. Assim, observou-se que após o pré-tratamento com *p*-cimeno, a atividade de todas as enzimas antioxidantes cardíacas aqui estudadas apresentou-se aumentada, enquanto que nos animais que receberam apenas o veículo foi observada inibição da atividade dessas enzimas no tecido cardíaco em comparação com a atividade padrão do tecido saudável, ou que não passou pelo processo de I/R. Este fato sugere que o pré-tratamento com o *p*-cimeno está modulando a atividade enzimática, seja aumentando a expressão destas enzimas no tecido ou mesmo aumentando a atividade das mesmas, protegendo assim, contra a formação dos produtos do estresse oxidativo. Uma vez que, o aumento do estresse oxidativo pode contribuir na patogênese das doenças cardiovasculares. Após a isquemia e reperfusão miocárdica são produzidas elevadas quantidades de ROS que podem gerar peroxidação lipídica (SILVA; MORESCO, 2011). O excesso na produção de ROS leva ao desequilíbrio no estado redox celular, em favor da oxidação, com danos celulares e instalação do estresse oxidativo. Estudos mostram que esse processo está associado tanto a formação de radicais livres quanto a redução das defesas antioxidantes (ÖREM et al., 2002; PRATICÒ et al., 1998). A quantidade dessas espécies oxidantes é normalmente controlada pelo sistema de defesa antioxidante

enzimático do organismo através das enzimas SOD, CAT, GPx e GR, que promovem a reação de catálise de tais espécies em produtos com menor habilidade de produzir dano celular ou mesmo inativando-as (WICKENS, 2001; GOMES, 2011; COSTA, 2012). Dessa forma, observou-se neste trabalho, uma proteção contra o estresse oxidativo produzido pela I/R nos corações dos animais que receberam o *p*-cimeno.

Evidências mostram que a administração de antioxidantes durante o processo de I/R pode proteger o tecido substancialmente contra esta lesão, reduzindo a morte celular na reperfusão (BECKER, 2004).

Constatou-se uma maior produção de MDA nos animais do grupo Veículo, remetendo maior peroxidação lipídica, por outro lado, no grupo pré-tratado com *p*-cimeno ocorreu diminuição na formação dessa molécula. No estudo de Oliveira e colaboradores (2014) também foi observada ação antioxidante do *p*-cimeno, através de achados semelhantes ao encontrado no nosso estudo. O tratamento via intraperitoneal de camundongos *Swiss* com o *p*-cimeno, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, causou diminuição na formação do MDA no hipocampo após 24 horas da administração do *p*-cimeno, bem como, aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Foi proposto que esse efeito antioxidante se daria pela reação do *p*-cimeno com radicais lipídicos, através da doação de um elétron, transformando-os em produtos menos deletérios ou inativos. Quintans-Júnior e colaboradores (2013) mostraram que o *p*-cimeno diminuiu a formação de radicais hidroxila e de peróxido de hidrogênio *in vitro*, demonstrando também efeito antioxidante.

A alta produção de ROS é um dos principais mecanismos que aumentam a lesão miocárdica após isquemia e reperfusão (HU et al., 2016; MAULPOIL et al., 1993). A peroxidação lipídica desencadeada durante esse processo leva a diversos eventos a nível celular, tais como a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, além da formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o MDA e outros aldeídos, danosos para a célula (VASCONCELOS et al., 2007). O aumento da concentração de MDA resulta na liberação de enzimas miocárdicas para o meio extracelular e no subsequente ataque às proteínas estruturais e células, sendo detectado em várias doenças, funcionando desta forma como um marcador de estresse oxidativo (LOCATELLI et al., 2003; PÉREZ et al., 2012; LIU et al., 2013). Assim, pode-se afirmar que o estresse oxidativo apresenta-se como um evento crucial na lesão I/R e agentes antioxidantes podem atenuar os consequentes danos.

Outros estudos demonstram ação antioxidante proveniente de moléculas extraídas de produtos naturais, como os monoterpenos carvacrol e seu isômero timol, que são encontrados em diversas plantas aromáticas, e são biossintetizados a partir de monoterpenos como o *p*-cimeno (NOSTRO, PAPALIA, 2012). Chen e colaboradores (2016), administrando o carvacrol (25, 50 e 100 mg/kg; i.p.) em ratos *Wistar* durante 7 dias consecutivos em modelo de I/R cardíaca *ex-vivo*, observaram aumento na atividade das enzimas CAT e SOD, e ainda diminuição da formação de MDA. Em um outro estudo, avaliando-se a proteção promovida pela administração destes monoterpenos sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, que causa um elevado estresse oxidativo no tecido cardíaco, resultado semelhante também foi relatado. Neste trabalho El- Sayed, Mansour e Abdul- Hameed (2016) pré-trataram camundongos *Swiss* por 14 dias consecutivos com o timol (20 mg/kg, p.o.) e carvacrol (25 mg/kg, p.o.) e no 14º dia foi induzida cardiotoxicidade com doxorubicina. Foi observada diminuição na formação de MDA e da quantidade de LDH liberada, além de aumento da atividade das enzimas CAT e SOD no tecido cardíaco dos animais tratados com esses monoterpenos.

No presente estudo, um outro ponto importante observado foi a preservação dos grupamentos sulfidrilas nos animais pré-tratados com o *p*-cimeno. Sabe-se que ROS podem desencadear eventos danosos também às proteínas celulares, dentre eles a fragmentação da cadeia peptídica, que leva à susceptibilidade proteica, e, como consequência, à sua degradação (KELLY, MUDWAY, 2003). Uma porção química passível de ser oxidada no ambiente celular são os grupamentos sulfidrilas (SH) presentes nas cadeias polipeptídicas e que podem ser consideradas marcadores de estresse oxidativo celular (HIMMELFARB; MCMONAGLE; MCMENAMIN, 2000; PÉREZ et al., 2012). A oxidação de grupamentos sulfidrilas de proteínas causam alterações conformacionais, desdobramento de proteínas e degradação, levando a perda de atividade ou função proteica (BIRBEN et al., 2012). Evidenciou-se maior preservação de tais grupamentos nos corações de animais pré-tratados com o *p*-cimeno. Esse achado, provavelmente, está relacionado a inativação das ROS por ação das enzimas antioxidantes, as quais apresentam sua atividade preservada nestes animais. Pode-se ainda sugerir que a cardioproteção observada pode ter sido promovida também pela inativação das ROS através da reação direta destas com a molécula do *p*-cimeno, diminuindo sobremaneira o prejuízo às proteínas celulares.

Possivelmente, estes achados benéficos verificados através do pré-tratamento dos animais com *p*-cimeno podem estar relacionados à ativação de canais para potássio sensível a

ATP ( $K_{ATP}$ ), modulando, dessa forma, a função contrátil e diminuindo os danos das ROS no tecido cardíaco. Este fenômeno foi observado no estudo de Silva e colaboradores (2015) no qual o *p*-cimeno, adicionado em banho de órgão isolado, promoveu vasorelaxamento em anéis isolados de aorta de rato, de forma dependente da concentração ( $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  mol/L), com o envolvimento de canais para potássio, especialmente os canais para potássio “*inward rectifier*” ( $K_{IR}$ ) e os  $K_{ATP}$ . Os canais para potássio, principalmente os  $K_{ATP}$ , expressos tanto no sarcolema quanto na mitocôndria, desempenham, quando ativados, efeitos cardioprotetores (COLE et al., 1991; CAVERO et al., 1995; CHICCO et al., 2007; WANG et al., 2015), uma vez que podem diminuir a entrada de  $Ca^{2+}$  e seu acúmulo no meio intracelular (CAVERO et al., 1995; GOLBIDI; BELISLE, KOWALTOWSKI, 2002; LAHER, 2011). Além disso, a ativação de canais para potássio mitocondrial está relacionada a menor produção de ROS (FERRANTI; DA SILVA; KOWALTOWSKI, 2003; FACUNDO; DE PAULA; KOWALTOWSKI, 2007). Uma vez abertos, os canais  $K_{ATP}$  presentes no sarcolema, levam à hiperpolarização celular, reduzindo assim a quantidade de potenciais de ação da célula cardíaca e, por conseguinte, o número de batimentos cardíacos, o que demanda menos ATP, sendo assim, benéfico diante do cenário metabólico do coração em isquemia. Além disso, a célula cardíaca com diminuída demanda metabólica diminui também o acionamento do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons que passa assim a produzir menos ROS (NICHOLS, RIPOLL, LEDERER, 1991).

No presente estudo não foi realizado nenhum teste de toxicidade induzida pelo *p*-cimeno no tecido cardíaco e nenhuma avaliação específica comportamental nos animais utilizados. É sabido que os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, bem como alterações comportamentais, apatia e má condição da pelagem (CUNHA et al., 2009; RAZA et al., 2002). Porém, não foi observada nenhuma anormalidade no comportamento dos animais, bem como também não foi detectado perda de peso e modificação da pelagem nos ratos durante os 7 dias de tratamento, sendo esses animais acompanhados diariamente após a administração do *p*-cimeno.

A lesão de reperfusão pós-isquêmica resultou em depressão contrátil significativa, aumento na incidência de arritmias, declínio do *status* antioxidante, elevação da peroxidação lipídica e dos danos às proteínas. A administração oral do *p*-cimeno aos animais protegeu os corações da lesão decorrente da I/R, à qual os corações foram submetidos, os quais demonstraram preservação da PDVE e das  $dP/dt$  máxima e mínima, redução das arritmias e do marcador de dano tecidual (LDH), diminuição da peroxidação dos lipídios de membrana e

dos danos às proteínas, o que foi associado à maior atividade das enzimas antioxidantes. Assim, pode-se afirmar diante do conjunto destes resultados encontrados no presente trabalho, que o pré-tratamento com *p*-cimeno promove cardioproteção no tecido submetido à isquemia e reperfusão, e também, pode-se destacar que esses achados são corroborados por dados da literatura científica, que evidenciaram, de forma direta ou indireta, efeitos benéficos do *p*-cimeno para diversos tecidos do organismo desafiados a algum processo patológico.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a administração de *p*-cimeno (150 mg/kg/dia, v.o.) reduziu os danos oxidativos causados pela I/R em modelos experimentais, além de diminuir os danos contráteis de forma significativa. As ações protetoras, tanto contrátil quanto antioxidante, podem estar vinculadas entre si, e ligadas à ativação das enzimas antioxidantes e/ou ao sequestro e inativação das ROS pelo *p*-cimeno.

A melhora na função contrátil pode ainda estar relacionada com a modulação de correntes iônicas que promoveram alteração de vias intracelulares de sinalização, culminando na melhora na sobrevivência do tecido cardíaco e de sua funcionalidade.

## 8 PERSPECTIVAS

Ainda é necessário aprofundamento no estudo dos mecanismos de ação envolvidos no efeito cardioprotetor observado pelo pré-tratamento dos animais com esta molécula e confirmar a eficiência protetora através de mais testes experimentais que posteriormente, podem servir de suporte para trabalhos clínicos afim de que o *p*-cimeno possa ser disponibilizado para pacientes acometidos com doenças cardiovasculares isquêmicas ou para administração prévia à cirurgias cardíacas eletivas.

Dentre esses testes, destaca-se: a investigação do envolvimento dos canais de potássio e cálcio nesse efeito; determinação da expressão das enzimas antioxidantes, através da técnica “*Western blot*”, a fim de concluir por qual mecanismo o *p*-cimeno modula a atividade enzimática, se através da ativação ou aumento de número dessas enzimas; e realização da marcação da área do infarto, para melhor quantificar a extensão da lesão e do estado de vitalidade das células e relacionar com quanto o tratamento com o *p*-cimeno pode preservá-las. Além disso, a realização do infarto *in vivo* pode ser feito para constatação dos efeitos observados e compará-los aos detectados em órgão isolado.

## REFERÊNCIAS

- AALTO, T. K.; RAIVIO, K. O. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants and 3-aminobenzamide. **Pediatric research**, v. 34, n. 5, p. 572-576, 1993.
- ADAMS, R. P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured publishing corporation, 2007.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letter**, v.302, p.141-5, 2001.
- ANDREENKO, G. V; BESSOLITSINA, L. A. Changes in fibrinolysis system in patients with acute myocardial infarction in intracoronary administration of fibrinolysin with heparina. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 49, n. 4, p. 8–13, 1977.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, Mieke; DEBEVERE, Johan. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food microbiology**, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2004.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo , v. 29, n. 1, p. 113-123, fev., 2006.
- BAYLIE, R. L. et al. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist,(-)-menthol. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 543, 2010.
- BECKER, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovascular research**, v. 61, n. 3, p. 461-470, 2004.
- 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**, 2011.

BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu. Rev. Physiol**, v.70, p. 23–49, 2008.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BOMBIG, M. T. N.; PÓVOA, R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo–Antagonistas dos canais de cálcio. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 16, p. 226-230, 2009.

BONJARDIM, L.R. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of *p*-Cymene in mice. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 67, p. 15-21, fev. 2012.

BOSE, R.; SUTHERLAND, G.R.; PINSKY, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochemical research**. p.217-220, 1989.

BOURGONJE, V. J. A. et al. Combined Na(+)/Ca(2+) exchanger and L-type calcium channel block as a potential strategy to suppress arrhythmias and maintain ventricular function. **Circulation. Arrhythmia and electrophysiology**, v. 6, n. 2, p. 371–9, abr. 2013.

BRADY, N.R. et al. A Wave of Reactive Oxygen Species (ROS)-Induced ROS Release in a Sea of Excitable Mitochondria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n. 9, p. 1651-1665, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS**, 2015. [Acesso em 01 de agosto de 2016]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10se.def>

BRASIL, Ministério da Saúde. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS**, 2014. [Acesso em: 19 dezembro 2016]. Disponível em:< <http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-cao-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus>>.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–43, 1 fev. 1993.

CAI, H.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 9, p. 471-8, set. 2003.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.13, n.3, p.381-387, set./dez. 2014.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 484-90, 1985.

CARVALHO, A. C. C.; SOUSA, J. M. A. Cardiopatia isquêmica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 297-305, jul./set. 2001.

CARVALHO, T. et al. Cardiovascular Rehabilitation of Patients with Ischemic Heart Disease Undergoing Medical Treatment, Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, and Coronary Artery Bypass Grafting. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 72-78, jan. 2007.

CAVERO, I.; DJELLAS, Y.; GUILLON, J.M. Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 9, p. 245-255, 1995.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova [online]**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-9, abr. 2007.

CHABORY, E. et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 7, p. 2074-85, jul. 2009.

CHEN, Y. et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 90-100, 2016.

CHEN, Z.M. et al. COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomized placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 366, n. 9497, p. 1607-21, 2005.

CHICCO, Adam J. et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. H2432-H2437, 2007.

CHUNHUA, Ma et al. Dang Gui Bu Xue Tang ameliorates coronary artery ligation-induced myocardial ischemia in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 617-624, 2017.

COLE, W. C.; MCPHERSON, C. D.; SONTAG, D. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. **Circulation Research**, v. 69, n. 3, p. 571-581, 1991.

COLOMBO, R.C.R.; AGUILLAR, O.M. Estilo de vida e fatores de risco de pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio. **Revista latino-americana de enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 2, p. 69-82, abr. 1997.

COSTA, D.A. Preclinical study of biochemical and pharmacological effects of the cyanocarvone in mice: Allowance for the development of phyto [Master dissertation]. **Federal University of Piauí**, 2012.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira. Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 403-11, 2009.

CZOMPA, A. et al. Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1. **Journal cardiovascular pharmacology**, Nova York, v. 64, n. 5, p. 412-419, 2014.

DE CERQUEIRA, S. V. S. et al. R (+)-pulegone impairs Ca<sup>2+</sup> homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. **European journal of pharmacology**, v. 672, n. 1, p. 135-142, 2011.

DE MEDEIROS, M. G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology international**, v. 60, n. 3, p. 237-241, 2011.

DEVI, R. et al. Extract from *Clerodendron colebrookianum* Walp protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury (IRI). **Life science**, Oxford, v. 77, n. 24, p. 2999-3009, 2005.

DEVITA, C. et al.; GISSI-3. effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular-function after acute myocardial-infarction. **The Lancet**, v. 343, n. 8906, p. 1115-1122, 1994.

DROGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

DUSTING, G.J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 97-103, mar. 2005.

EL- SAYED, E. S. M.; MANSOUR, A. M.; ABDUL- HAMEED, M. S. Thymol and carvacrol prevent doxorubicin- induced cardiotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2016.

EVORA, P. R. B. et al. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 66, n. 4, p. 239-45, 1996.

FACUNDO, H.T.F.; DE PAULA, J.G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 7, p. 1039-1048, 2007.

FARBER, J. L.; CHIEN, K. R.; MITTNACHT JR, S. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. **The American journal of pathology**, v. 102, n. 2, p. 271, 1981.

FERRANTI, R.; DA SILVA, M. M.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ATP- sensitive K<sup>+</sup> channel opening decreases reactive oxygen species generation. **FEBS letters**, v. 536, n. 1-3, p. 51-55, 2003.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 665–668, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FINKEL, T. Radical medicine: treating ageing to cure disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 971-6, dez. 2005.

FORGIONE, M. A. Heterozygous Cellular Glutathione Peroxidase Deficiency in the Mouse: Abnormalities in Vascular and Cardiac Function and Structure. **Circulation**, v. 106, n. 9, p. 1154–1158, 27 ago. 2002.

FRANCO, F.G.M; MATOS, L.D.N.J. Exercício físico e perfusão miocárdica. In: Negrão CE, Barreto AC (eds). **Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata**. São Paulo: Manole. p. 179-259, 2005.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–7, 25 jul. 1997.

FRÖHLICH, G. M. et al. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. **European heart journal**, v. 34, n. 23, p. 1714-1722, 2013.

FUSTER, V. et al. Randomised double-blind trial of fixed low-dose warfarin with aspirin after myocardial infarction. **The Lancet**, v. 350, n. 9075, p. 389, 1997.

GAMES, E. et al. Structurally Related Monoterpenes *p*-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1390, 2016.

GIODA, C. R. et al. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 298, n. 6, p. H2039–45, jun. 2010.

GOLBIDI, S.; LAHER, I. Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. **Cardiology research and practice**, v. 2011, 2011.

GOMES, D.B.V. Study of antioxidant activity of liquid cashew (*Anacardium occidentale* L.) and technical in nature for pharmaceutical formulations [Master dissertation]. **Federal University of Piauí**, 2011.

GOODSELL, D. S. Catalase. **RCSB Protein Data Bank**, 1 set. 2004.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: Animal and Humans Studies. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2034-40, out. 2003.

HAMILTON, C. A. et al. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 219-234, 2004.

HENRY, T.D. From concept to reality: a decade of progress in regional ST-elevation myocardial infarction systems. **Circulation**, v. 126, n. 2, p. 166-8, 2012.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney international**, v. 58, n. 6, p. 2571-2578, 2000.

HU, L. et al. Ischemic postconditioning protects the heart against ischemia–reperfusion injury via neuronal nitric oxide synthase in the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. **Cell death & disease**, v. 7, n. 5, p. e2222, 2016.

HUANG, M. et al. Effects of 4- piperidinomethyl- 2- isopropyl- 5- methylphenol on oxidative stress and calcium current. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 9, p. 1191-1197, 2005.

ISHIHARA, T. et al. Scavenging of superoxide anions by lecithinized superoxide dismutase in HL-60 cells. **Molecular biosystems**, v. 12, n. 1, p. 274–82, 15 dez. 2015.

JIE, Z. et al. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 687-690, 1994.

KELLY, F. J.; MUDWAY, I. S. Protein oxidation at the air-lung interface. **Amino acids**, v. 25, n. 3, p. 375-396, 2003.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, v. 60, n. 8, p. 693–700, ago. 2005.

KONO, Y. et al. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**, v. 33, n. 2, p. 150-155, 1982.

KORDALI, S., ÇAKIR, A., ÖZER, H. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cimeno. **Bioresource Technology** 99. 8788–8795, 2008.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

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 of cardiovascular pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 356-362, 2004.

LIAPIS, P. et al. Characterisation of tolbutamide hydroxylase activity in the common brushtail possum, (*Trichosurus vulpecula*) and koala (*Phascolarctos cinereus*): inhibition by the Eucalyptus terpene 1,8- cineole. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 351-7, 2000.

LIEBGOTT, T. et al. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. **Basic research cardiology**., Darmstadt, v. 95, n. 5, p. 368-377, 2000.

LIU, H. et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat by an antioxidant action via inhibition of NADPH oxidase and iNOS expression. **Pharmacology**, v. 92, n. 3-4, p. 198-206, 2013.

LOCATELLI, F. et al. Oxidative stress in end- stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 184–188, 1998.

MAGYAR, J. et al. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, n. 1-3, p. 29–36, 2004.

MALBOUISSON, L.M.S. et al. Proteção miocárdica em cirurgia cardíaca. **Revista Brasileira Anestesiologia**, Campinas, v. 55, n. 5, p. 558-574, out., 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-8, 2002.

MARTINEZ-HERVAS, S. et al. Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. v.20, p.734-739, 2010.

MAUPOIL, V. et al. Identification et evaluation des radicaux libres dans la sequence ischémie-reperfusion cardiaque. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 86, p. 63-68, 1993.

MELO, E. C. P. et al. Distribuição espacial da mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 1225-36, jun. 2006.

MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; LAUTON-SANTOS, S. Revisão sistemática dos efeitos de substâncias naturais com ação antioxidante no tratamento da injúria de reperfusão após isquemia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 218-222, 2016.

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.

MOHANTY, I. R., et al. Bacopa monniera protects rat heart against ischaemia-reperfusion injury: role of key apoptotic regulatory proteins and enzymes. **Journal pharmacy and pharmacology**, London, v. 62, n. 9, p. 1175-1184, 2010.

MONASSIER, J. P. Reperfusion injury in acute myocardial infarction: from bench to cath lab. Part II: Clinical issues and therapeutic options. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 101, n. 9, p. 565-575, set. 2008.

MURPHY, E. et al. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. **Circulation Research**, v. 68, n. 5, p. 1250-8, mai. 1991.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NICOLAU, J. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 102, p. 1-61, 2014.

NORDMANN, A.J. et al. Clinical outcomes of primary stenting vs. balloon angioplasty in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Medicine**, v. 116, n. 4, p. 253-62, 2004.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M.T. Antagonistas de canais de cálcio. **Revista Brasileira hipertensão**, v. 5, n. 2, p. 104-9, 1998.

OLIVEIRA, T. M. et al. Evaluation of *p*-cimeno, a natural antioxidant. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 423-8, dez. 2014.

OPIE, L. **Heart Physiology: from Cell to Circulation**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.

ÖREM, C. et al. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. **Coronary artery disease**, v. 13, n. 1, p. 65-71, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cardiovascular diseases, 2017. [Acesso em: 19 maio 2017]. Disponível: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>.

OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M.; SPOELSTRA-DE MAN, A. M.; DE WAARD, M. C. Vitamin C revisited. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 4, p. 460, 2014.

ÖZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 48-54, 2012.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-69, jul. 1967.

PASTORE, CA et al. III Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia sobre análise e emissão de laudos eletrocardiográficos. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**. São Paulo , v. 106, n. 4, supl. 1, p. 1-23, Apr. 2016.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 70-80, fev. 2008.

PARODI, G. et al. Comparison of prasugrel and ticagrelor loading doses in ST-segment elevation myocardial infarction patients: RAPID (Rapid Activity of Platelet Inhibitor Drugs) primary PCI study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 15, p. 1601-6, 2013.

PÉREZ, Y G. et al. Malondialdeído e grupo sulfidrila como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 52, n. 4, p. 656-660, 2012.

PESARO, A. E. P.; SERRANO, C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio-síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 214-20, 2004.

PFEFFER, M.A. et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with leftventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survivaland ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. **New England journal of Medicine**, v. 327, n. 10, p. 669-77, 1992.

PIEGAS, L. S. et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 105, n. 2, p. 1-121, 2015.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of  $\gamma$ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

PRATICÒ, D. et al. Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 15, p. 1777-1783, 1998.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J. et al. Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, *p*-cymene, and geranyl acetate in experimental models. **ISRN Toxicology**, Cairo, v. 2013, 2013.

RAEDSCHELDERS, K.; ANSLEY, D.M.; CHEN, D.D.Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 133, n. 2, p. 230-55, fev. 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 906p.

RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

RECCHIONI, R. et al. Conventional and novel diagnostic biomarkers of acute myocardial infarction: a promising role for circulating microRNAs. **Biomarkers**, v. 18, n. 7, p. 547-558, 2013.

RODRIGO, R.; PRIETO, J.C.; CASTILLO, R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. **Clinical Science**. v. 124, p. 1-15, 2013.

RUECKSCHLOSS, U. et al. Induction of NAD(P)H Oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy. **Circulation**. v. 104, p. 1767-72, 2001

RUIXING, Y.; WENWU, L.; AL-GHAZALI, R. Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion. **Translational Research**, v. 149, n. 3, p. 152-160, mar. 2007.

SANADA, S.; KOMURO I.; KITAKAZE, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures.

**American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 301, n. 5, p. 1723-41, ago. 2011.

SANT'ANA JÚNIOR, O. et al. A depressão miocárdica pós-isquemia/reperfusão não altera a resposta cardíaca à elevação da frequência de contrações. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2005

SANTANA, M. F. et al. *p*-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1138-1143, 2011.

SANTOS, JF. Efeito cardioprotetor do timol em corações de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão. 2016. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da saúde da Universidade Federal de Sergipe, 2016.

SANTOS, M.R.V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

SELVARAJ, M. et al. Comparison of mesoporous Al-MCM-41 molecular sieves in the production of *p*-cimeno for isopropylation of toluene. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 186, n. 1-2, p. 173-186, 2002.

SHAROV, V. S. et al. Quantitative mapping of oxidation-sensitive cysteine residues in SERCA in vivo and in vitro by HPLC-electrospray-tandem MS: selective protein oxidation during biological aging. **Biochemical Journal**, v. 394, n. 3, p. 605-615, 2006.

SHUKLA, S. K. et al. Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. **Natural product research**, v. 24, n. 9, p. 873-898, 2010.

SILVA, M. et al. The Vasorelaxant Effect of *p*-Cymene in Rat Aorta Involves Potassium Channels. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

SILVA, S. H.; MORESCO, R. N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Scientia medica**, v. 21, n. 3, 2011.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **Jornal vascular brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 367-78, 2004.

SPOSITO, A.C. et al. Timing and dose of statin therapy define its impact on inflammatory and endothelial responses during myocardial infarction. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 1240-6, 2011.

STANLEY, W. C. Cardiac energetics during ischaemia and the rationale for metabolic interventions. **Coronary artery disease**, v. 12, p. S3-7, 2001.

STANLEY, W.C. et al. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions: potential for pharmacological interventions. **Cardiovascular Research**, v. 33, p. 243-57, 1997.

TAVARES, J. G. P. et al. Estimulação Elétrica para Reversão da Cardiodepressão na Preparação de Langendorff em Circuito Fechado. In: **V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011 May 16-21, 2011, Habana, Cuba**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1230-1233.

TER KEURS, H. E. et al. Role of sarcomere mechanics and Ca<sup>2+</sup> overload in Ca<sup>2+</sup> waves and arrhythmias in rat cardiac muscle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1080, n. 1, p. 248-267, 2006.

TOCCHETTI, C. G. et al. Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling. **Circulation research**, v. 100, n. 1, p. 96-104, 2007.

TOUYZ, R.M. et al. Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. **Hypertension**, v. 45, p. 530-7, mar. 2005.

TOUYZ, R.M. et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. **Circulation Research**, v. 90, p. 1205-13, mai. 2002.

TRABER, M. G.; MANOR, D. Vitamin E. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 3, p. 330-331, mai. 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DE WERF, F. et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. **European heart journal**, v. 29, n. 23, p. 2909-2945, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, Oct. 2007.

VEIGA, E. C. A. et al. Repercussões cardíacas após infarto do miocárdio em ratas submetidas previamente a exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 100, n. 1, dez. 2012.

VIANNA, H. R., et al. Antiarrhythmogenic and antioxidant effect of the flavonoid dioclein in a model of cardiac ischemia/reperfusion. **Planta medica**, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 300-303, 2006.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALTERS, A. M.; PORTER, G. A.; BROOKES, P. S. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy. **Circulation research**, v. 111, n. 9, p. 1222-1236, out. 2012.

WANG, C. et al. Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC- $\epsilon$  in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 6, p. 528-536, 2015.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

YIM, T. K. et al. Myocardial protection against ischaemia-reperfusion injury by a Polygonum multiflorum extract supplemented 'Dang-Gui decoction for enriching blood', a compound formulation, ex vivo. **Phytotherapy research**, London, v. 14, n. 3, p. 195-199, 2000.

YUAN, Y. et al. Antioxidant and cardioprotective effects of Ilex cornuta on myocardial ischemia injury. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 2, p. 94-104, 2017.

YUSUF S, WITTES J, FRIEDMAN L. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. I. Treatment following myocardial infarction. **Journal of the American Medical Association**: 2088–2093, 1991.

YUSUF, S.; HELD P.; FURBERG C. Update of effects of calcium antagonists in myocardial infarction or angina in light of the second Danish Verapamil Infarction Trial (DAVIT-II) and other recent studies. **American Journal of Cardiology**, v. 67, n. 15, p. 1295-7, 1991.

YVON, Y., E. et al. Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. 184-91, ago. 2012.

ZENG, Q. et al. Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD (P) H oxidase-derived superoxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 3, p. 732-738, 2008.

ZHONG, H. et al. Salidroside attenuates apoptosis in ischemic cardiomyocytes: a mechanism through a mitochondria-dependent pathway. **Journal of pharmacological sciences**, v. 114, n. 4, p. 399-408, 2010.

ZHONG, W. et al. *p*-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B activation. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 529-537, 2013.

ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 310-321, 2006.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Remodelación ventricular postinfarto de miocardio: conceptos e implicaciones clínicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 150-164, 2009.

## ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do p-cymeno sobre os danos oxidativos cardíacos provocados pelo infarto**”, registrada com o nº **57/2015**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Sandra Lauton Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **27/10/2015**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 02/11/2015, Término: 02/11/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico (Wistar)
Nº de animais	500
Peso/Idade	250-300g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia (DFS/UFS)

*Josemar Sena Batista*

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS