

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CiPharma)

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOPROTETORA DA
IPRIFLAVONA VEICULADA EM UM SISTEMA
AUTOEMULSIONÁVEL EM MODELO DE ISQUEMIA DO
MIOCÁRDIO EM RATOS FÊMEAS**

KEMILE ALBUQUERQUE LEÃO

Ouro Preto – MG - BRASIL

Junho de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CiPharma)

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOPROTETORA DA
IPRIFLAVONA VEICULADA EM UM SISTEMA
AUTOEMULSIONÁVEL EM MODELO DE ISQUEMIA DO
MIOCÁRDIO EM RATOS FÊMEAS**

KEMILE ALBUQUERQUE LEÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Andrea Grabe Guimarães

Co-orientadora: Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Ouro Preto – MG

2009

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia, Laboratório Multiusuário e no Laboratório de Farmacologia Experimental da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dra. Cláudia Martins Carneiro
Departamento de Análises Clínicas, UFOP

Prof. Dra. Jaqueline de Souza
Departamento de Farmácia, UFOP

Prof. Dra. Eunice Kazue Kano
Professora visitante do CiPharma, UFOP

Prof. Dr. Homero Nogueira Guimarães
Departamento de Engenharia Elétrica, UFMG

Este trabalho contou com apoio financeiro da FAPEMIG - Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos, CAPES e UFOP

Dedico este trabalho aos meus pais, Tânia e Valdir, pelo incentivo constante.
À minha irmã, Samlla, pela amizade e cumplicidade nos momentos difíceis.
Ao meu marido, Alexandre, pela paciência e pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A todos que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, Andrea Grabe Guimarães, agradeço não só pelo conhecimento cedido, mas também por me ensinar a ser mais paciente e tolerante, pelos conselhos, pelas palavras de amizade, e principalmente pela confiança depositada em mim.

“Obrigado por fazer do aprendizado não um trabalho, mas sim um contentamento.
Por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor e, assim fazê-lo cada vez melhor.

Obrigado por afastar o medo das coisas que eu pudesse não compreender;
levando-me, por fim, a compreendê-las...

Por resolver o que achei complicado...

Por ser uma pessoa digna da minha total confiança e a quem
pude recorrer nos momentos de dificuldade...

Obrigada por me convencer de que eu era melhor do que suspeitava.”

À co-orientadora Vanessa Carla Furtado Mosqueira, pela orientação no desenvolvimento da formulação e pela dedicação e atenção constantes, mesmo estando tão longe.

Às professoras Jaqueline de Souza e Eunice Kazue Kano pela orientação nos ensaios de cromatografia.

À professora Cláudia Martins Carneiro e à aluna Luísa Helena Perin de Melo pela colaboração nos trabalhos de histopatologia.

Aos professores do laboratório de farmacologia e terapêutica experimental: Neila, Carla e Rômulo pelo tempo de convivência.

Aos alunos de iniciação científica, Gustavo e Tamara, responsáveis por parcela significativa deste trabalho.

Às estagiárias e mestrandas do laboratório de farmacologia experimental: Alessandra, Carol, Dani, Kelly, Lorena e Priscila, pela companhia, pelos bate-papos e pelo apoio.

Ao funcionário Wilson pela companhia nas longas tardes de experimentos e pela dedicação ao cuidar dos animais do biotério da Escola de Farmácia.

Aos professores do CIPHARMA pelos ensinamentos, em especial à Professora Dênia, que me recebeu e me orientou sobre o programa nos meus primeiros dias em Ouro Preto.

Às amigas Gleici e Raquel e à todos os colegas da pós-graduação, em especial à amiga Líliam que me acolheu nos últimos meses em Ouro Preto.

Às “irmãzinhas” Fernanda e Renata, agradeço pelo apoio, pelas palavras de amizade e até mesmo pelas broncas. Sentirei saudades da nossa família!

À todos os amigos e familiares que torceram por mim.

“Nem que seja regado a lágrima, suor ou sangue
Eu faço desse solo duro brotar raiz
E colho no tempo certo meu justo ganho
Se aqui plantei os meus grãos de sonhos
Vai ser aqui que eu vou ser feliz”

Irah Caldeira

RESUMO

A Ipriflavona, um isoflavonóide sintético, é utilizada no tratamento e prevenção da osteoporose em mulheres. Sua potencial atividade cardioprotetora foi relatada em apenas um artigo, no qual a Ipriflavona livre foi avaliada utilizando o mesmo modelo deste trabalho. Por ser uma substância lipofílica a absorção da Ipriflavona pela via oral é dificultada, resultando em baixa biodisponibilidade e variabilidade intra e inter individual. Este fato justifica o desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas para a veiculação deste fármaco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação autoemulsionável contendo Ipriflavona e avaliar a potencial atividade cardioprotetora em modelo de ligadura da coronária em ratos fêmeas. Após desenvolvimento e caracterização, foi selecionada a formulação contendo 60% de óleo de milho, 25% de capryol e 15% de lecitina de soja para os estudos *in vivo*. Foi observado no estudo de liberação *in vitro* que 85% da Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável se tornou solúvel em meio similar ao intestinal ao passo que apenas 59% da Ipriflavona livre solubilizou-se no mesmo meio. A avaliação dos efeitos cardiovasculares foi realizada utilizando as doses de 30 mg/kg e 1 g/kg de Ipriflavona livre em dose única e doses de 30 mg/kg e 240 mg/kg de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, em dose única e por 7 dias. Após a ligadura de coronária em animais anestesiados foi observado aumento dos intervalos PR e QT nos animais não tratados ao passo que nos animais tratados com Ipriflavona não foi observado aumento de PR ou prolongamento de QT. O modelo de ligadura provocou elevação da área sob a curva do segmento ST e o tratamento com a Ipriflavona independente da dose, tempo de tratamento e formulação foi capaz de impedir significativamente esta elevação. A ligadura da coronária reduziu significativamente a pressão arterial e a frequência cardíaca, tanto nos animais sem tratamento como nos animais tratados. Em relação à morfologia do ECG, foram observadas alterações em todos os grupos, porém as arritmias só ocorreram nos animais sem tratamento, submetidos à ligadura. A concentração plasmática da Ipriflavona livre (39,6 ng/ml) foi significativamente menor que a concentração plasmática da Ipriflavona autoemulsionável (204 ng/ml a 290 ng/ml). Neste trabalho foi possível demonstrar o potencial cardioprotetor da Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável na prevenção da isquemia aguda do miocárdio.

ABSTRACT

Ipriflavone, an isoflavone synthesized from daidzein (soy derived isoflavone) holds great promise to prevent and treat osteoporosis. Its cardioprotection was reported in 1981, using the same model described here, but without follow up studies. Oral absorption of ipriflavone is limited by its poor water solubility, leading to low bioavailability and high variability, which justify the development of a suitable drug delivery system. The main goal of the present work was to develop a self-emulsifying drug delivery system of ipriflavone and evaluate its potential cardioprotection using the model of coronary artery occlusion in female rats. After development and characterization the formulation containing corn oil 60%, capryol 25% and soy lecithin 15% was chosen to further studies. A release study showed that solubilization of self-emulsifying ipriflavone was 85%, while free ipriflavone solubilization was 59%. Cardioprotection was evaluated for free ipriflavone (30 mg/kg and 1 g/kg) and self-emulsifying ipriflavone (30 mg/kg and 240 mg/kg), administered at a single dose or during 7 days. After coronary occlusion, it was observed increases on PR and QT intervals in non-treated animals while in animals treated with ipriflavone these intervals were not significantly changed. The ligature procedure elevated the area under curve of ST segment and ipriflavone was able to reduce this elevation, without difference between formulations and doses. Coronary artery occlusion reduced significantly blood pressure and heart rate in sham-operated and ligature groups. It was also observed electrocardiographic alterations in all groups, but only non-treated group presented arrhythmias. Plasma concentration of free ipriflavone (39,6 ng/ml) was significantly lower than the concentration of self emulsifying ipriflavone (204 ng/ml to 290 ng/ml). This work showed the potential cardioprotective effect of a self-emulsifying drug delivery system of ipriflavone in preventing acute myocardial ischemia.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas da daidzeína, Ipriflavona e do estradiol.....	5
Figura 2 – Estrutura química da fosfatidilcolina.....	10
Figura 3 – Sistema de aquisição dos sinais de ECG e PA.....	24
Figura 4 – Segmentos amostrados de animal representativo do grupo não tratado.....	26
Figura 5 – Estabilidade do sistema autoemulsionável após adição de água.....	35
Figura 6 – Estabilidade do sistema autoemulsionável após 24 horas de armazenamento.....	35
Figura 7 – Diagrama ternário as autoemulsões desenvolvidas.....	36
Figura 8 – Curva de calibração da Ipriflavona em metanol a 251nm.....	39
Figura 9 – Cinética de liberação <i>in vitro</i> da Ipriflavona.....	39
Figura 10 – Avaliação do tamanho médio dos glóbulos formados após armazenamento.....	41
Figura 11 – Avaliação do pH da formulação desenvolvida durante a estocagem.....	41
Figura 12 – Valores absolutos para o intervalo PR do ECG.....	44
Figura 13 – Valores absolutos para o complexo QRS do ECG.....	44
Figura 14 – Valores absolutos para o intervalo QT do ECG.....	45
Figura 15 – Valores absolutos para o parâmetro QTc do ECG.....	46
Figura 16 – Valores absolutos de PAS, PAD e FC dos animais tratados com Ipriflavona.....	48

Figura 17 – Variação percentual da área sob a curva do segmento ST após administração de diferentes doses e formulações de Ipriflavona.....	53
Figura 18 – Variação percentual máxima da área sob a curva do segmento ST 30 min após tratamento com Ipriflavona nas diferentes doses e formulações.....	53
Figura 19 – Registro representativo dos ECGs.....	55
Figura 20 – Exemplos de arritmias verificadas nos animais sem tratamento, após a ligadura da coronária.....	56
Figura 21 – Exemplos de arritmias observadas nos animais sem tratamento e tratados com Ipriflavona.....	57
Figura 22 – Curva de Calibração obtida a partir da relação P/PI.....	59
Figura 23 - Percentual de alterações cardíacas observadas em diferentes graus nos animais sem tratamento e nos animais submetidos ao tratamento agudo.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de absorvância utilizados para a construção da curva de calibração da Ipriflavona em acetonitrila.....	32
Tabela 2 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes óleos.....	32
Tabela 3 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes tensioativos.....	33
Tabela 4 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes meios.....	33
Tabela 5 – Composição dos diferentes sistemas autoemulsionáveis avaliados no estudo de compatibilidade.....	35
Tabela 6 – Determinação do tamanho médio dos glóbulos de diferentes formulações contendo Ipriflavona.....	37
Tabela 7 – Tamanho médio dos glóbulos da autoemulsão vazia e contendo Ipriflavona.....	37
Tabela 8 – Determinação da área sob a curva de liberação da Ipriflavona.....	39
Tabela 9 – Mortalidade nos primeiros 30 min após oclusão da coronária.....	42
Tabela 10 – Valores médios de área para avaliação da linearidade da Ipriflavona em plasma de ratos.....	59
Tabela 11 – Determinação da concentração plasmática da Ipriflavona em diferentes grupos.....	59
Tabela 12 – Percentual de animais que apresentaram as alterações histopatológicas cardíacas classificadas de acordo com a intensidade.....	61
Tabela 13 – Valores absolutos do intervalo QT para os grupos controle, sem tratamento e tratados com dose única de Ipriflavona livre, nas diferentes doses.....	89
Tabela 14 – Valores absolutos do intervalo QT para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.....	90
Tabela 15 – Valores absolutos do parâmetro QTc para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.....	91

Tabela 16 – Valores absolutos do parâmetro QTc para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.....	92
Tabela 17 – Valores absolutos de PAS para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.....	93
Tabela 18 – Valores absolutos de PAS para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.....	94
Tabela 19 – Valores absolutos de PAD para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.....	95
Tabela 20 – Valores absolutos de PAD para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.....	96
Tabela 21 – Valores absolutos de FC para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.....	97
Tabela 22 – Valores absolutos de FC para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.....	98
Tabela 23 – Variação da área sob a curva do segmento ST após a ligadura da coronária em relação ao período controle, antes da ligadura.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCV	Doenças cardiovasculares
DL50	Dose letal para 50% da amostra
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FDA	Food and drug administration
HE	Hematoxilina-eosina
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IP	Intraperitoneal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PEG	Polietilenoglicol
PPG	Propilenoglicol
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
TGI	Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Ipriflavona.....	5
2.2. Sistemas Autoemulsionantes.....	8
2.3. Isquemia do miocárdio e cardioproteção.....	12
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. METODOLOGIA	
4.1. <i>Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionante.....</i>	20
4.1.1. Avaliação da solubilidade.....	20
4.1.2. Obtenção do sistema autoemulsionante.....	20
4.1.3. Avaliação da emulsificação espontânea.....	21
4.1.4. Determinação do tamanho dos glóbulos.....	21
4.1.5. Cinética de liberação.....	22
4.1.6. Avaliação da Estabilidade.....	23
4.2. <i>Avaliação dos efeitos cardiovasculares da Ipriflavona in vivo.....</i>	23
4.2.1. Animais.....	23
4.2.2. Obtenção dos sinais de eletrocardiograma e pressão arterial.....	23
4.2.3. Indução de isquemia do miocárdio.....	25
4.2.4. Análise do ECG e PA.....	25
4.2.5. Determinação da concentração plasmática de Ipriflavona.....	27
4.2.6. Análise histopatológica cardíaca.....	28

4.2.7. Protocolos Experimentais.....	29
4.2.7.1. Protocolo I: Tratamento Agudo.....	29
4.2.7.2. Protocolo II: Tratamento Sub-Agudo.....	29
4.2.8. Análise estatística.....	30

5. RESULTADOS

5.1. <i>Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionante</i>	32
5.1.1. Avaliação da solubilidade.....	32
5.1.2. Obtenção do sistema autoemulsionante.....	33
5.1.3. Avaliação da emulsificação espontânea.....	36
5.1.4. Determinação do tamanho dos glóbulos.....	37
5.1.5. Cinética de liberação.....	38
5.1.6. Avaliação da Estabilidade.....	40
5.2. <i>Avaliação dos efeitos cardiovasculares da Ipriflavona in vivo</i>	42
5.2.1. Mortalidade.....	42
5.2.2. Análise do ECG.....	42
5.2.3. Avaliação da PA e FC.....	49
5.2.4. Área sob a curva do segmento ST.....	53
5.2.5. Morfologia do ECG.....	55
5.2.6. Determinação da concentração plasmática de Ipriflavona.....	60
5.2.7. Avaliação histopatológica cardíaca.....	63

6. DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do sistema autoemulsionável.....	67
6.2. Avaliação da atividade cardioprotetora da Ipriflavona <i>in vivo</i>	70

7. CONCLUSÕES	76
----------------------------	----

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
--	----

9. ANEXOS	94
------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morte em mulheres com mais de 50 anos no Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde (2006). Ao longo da vida, a incidência destas doenças ocorre em menor frequência nas mulheres do que nos homens devido ao efeito protetor do hormônio estrógeno. No entanto, após a menopausa, com a redução na produção de estrógeno, ocorre aumento na incidência de hipertensão arterial, isquemia do miocárdio, osteoporose e aparecem sintomas característicos desta fase (BYYNY e SPEROFF, 1996; GUS, 2006).

A terapia com estrógeno foi aprovada pelo *Food and Drug administration* (FDA) em 1942 e, desde então, é considerada tratamento de escolha para o alívio dos sintomas relacionados ao hipoestrogenismo da mulher climatérica (WEHBA *et al.*, 1999). Entretanto, desde a década de 90, diversos estudos (ROSSOUW *et al.*, 2002; LISSIN e COOKE, 2000) têm atribuído à terapia estrogênica ou estroprogestativa o aumento no risco de câncer de mama e tromboembolismo e, desta forma, seu uso tem sido limitado (ver FERNANDES *et al.*, 2000). Por essa razão, acrescida ao fato da crescente demanda por alternativas terapêuticas naturais, um número significativo de mulheres têm utilizado os fitoestrogênios, particularmente a isoflavona, como alternativa terapêutica para o alívio dos sintomas climatéricos.

Estudos epidemiológicos demonstraram menor incidência de doenças cardiovasculares na população oriental (NAGATA *et al.*, 2001) e alguns estudos observacionais sugerem melhora dos sintomas da menopausa com a suplementação dietética do extrato de soja, em mulheres climatéricas (ALBERT *et al.*, 2002; NELSON *et al.*, 2006). Sabe-se que as isoflavonas são encontradas em alimentos à base de soja, um dos principais componentes da alimentação oriental. Em contraste, nos países ocidentais a industrialização contribuiu para a modificação dos hábitos alimentares, tornando a dieta rica em colesterol, gordura e calorias (ver LISSIN e COOKE, 2000).

A Ipriflavona é um isoflavonóide sintético derivado da daidzeína, um isoflavonóide natural (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997). Está disponível em mais de 22 países, sendo frequentemente comercializada como suplemento dietético sem prescrição médica. A comercialização de Ipriflavona para a prevenção da osteoporose na menopausa é comum na Itália, Turquia e no Japão. Em 1981, Feuer e colaboradores demonstraram pela primeira vez o potencial da Ipriflavona como fármaco cardioprotetor. No entanto, não foram encontrados outros trabalhos confirmando as hipóteses propostas por estes autores.

A maior limitação da Ipriflavona é a sua baixa solubilidade em água, levando à baixa biodisponibilidade após administração por via oral (KIM e LEE, 2002), contribuindo também para a alta variabilidade intra e inter individual e ausência de dose-dependência (AMIDON *et al.*, 1995). O mesmo acontece com aproximadamente 40 % das novas drogas candidatas a fármacos. Algumas metodologias já foram empregadas para melhorar a biodisponibilidade da Ipriflavona, como por exemplo, o desenvolvimento de uma dispersão sólida (LI *et al.*, 1999) e a utilização da técnica de *spray-dryer* (KIM e LEE, 2002).

Nos últimos anos, formulações à base de lipídeos têm sido desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. As formulações mais estudadas são aquelas que consistem na incorporação do fármaco em um veículo lipídico inerte, tais como óleos (BURCHAM *et al.*, 1997), dispersões de surfactantes (SERAJUDDIN, 1999; AUNGST, 1993), emulsões (PALIN *et al.*, 1986; KARARLI *et al.*, 1992), lipossomas (SCHWENDENER e SCHOTT, 1996), nanosuspensões (DATE *et al.*, 2004) e formulações autoemulsionantes (CHARMAN *et al.*, 1992; CRAIG *et al.*, 1993).

A busca por fármacos que conferem cardioproteção é constante e necessária, assim como formulações farmacêuticas adequadas para veicular esses fármacos. O objetivo desta busca é ampliar o arsenal terapêutico e contribuir para a redução dos índices de morbi-mortalidade por doença coronariana. Sendo assim, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, como o sistema autoemulsionável, para a veiculação da Ipriflavona e a demonstração da sua potencial atividade cardioprotetora contribuirão para a melhoria da qualidade de vida e da capacidade produtiva da população acometida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ipriflavona

A Ipriflavona (figura 1) é um isoflavonóide sintético utilizado por via oral no tratamento e prevenção da osteoporose. Ela é derivada da daidzeína (figura 1), um isoflavonóide natural (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997). Está disponível em mais de 22 países, sendo freqüentemente comercializada como suplemento dietético sem prescrição médica. A comercialização de Ipriflavona como terapia anti-osteoporose é comum na Itália, Turquia e no Japão. Diferentes autores demonstraram a sua capacidade de inibição da reabsorção óssea (BENVENUTI *et al.*, 1994; AGNUSDEI e BUFALINO, 1997), cujo mecanismo ainda é incerto, mas que parece estar mais relacionado à redução do recrutamento e diferenciação de pré-osteoclastos do que à inibição da reabsorção dos osteoclastos maduros (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997). Além da inibição da reabsorção óssea, a Ipriflavona reduz a excreção renal de cálcio, aumenta a secreção da calcitonina estimulada pelo cálcio na presença de estrogênio e melhora a osteopenia induzida pelos baixos níveis de cálcio e por dieta pobre em vitamina D (KIM e LEE, 2002; BENVENUTI *et al.*, 1994).

Além da osteoporose, a Ipriflavona tem sido avaliada em outras condições. Dentre as ações identificadas da Ipriflavona podemos citar: inibição da proliferação da maturação dos osteoclastos em linhagem de células humanas leucêmicas (BENVENUTI *et al.*, 1994), inibição do desenvolvimento de metástases ósseas e da progressão de lesões osteolíticas estabelecidas (TOKIWA *et al.*, 1986) e também reversão da hipocolesterolemia que ocorre na presença de tumores (AMIN *et al.*, 2006). Ao contrário das isoflavonas de origem natural, a Ipriflavona (figura 1) não apresenta efeitos estrogênicos (MONOSTORY e VERECZKEY, 1995).

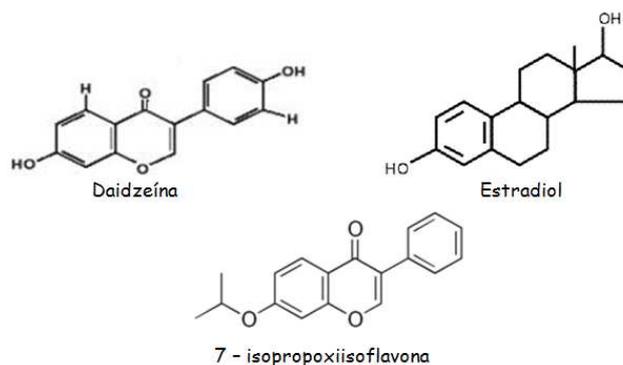


FIGURA 1 – Estruturas químicas da daidzeína, Ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona) e do estradiol.

As isoflavonas pertencem a uma classe de fitoestrógenos, compostos polifenólicos de ocorrência natural, cuja estrutura química é similar ao estradiol (figura 1), por apresentarem um anel fenólico com um radical hidroxila no carbono 3 (UNFER *et al.*, 2004). O interesse por fitoestrógenos cresceu na última década devido ao aumento das publicações confirmando o potencial antioxidante destas substâncias (BRAVO, 1998; FERTE *et al.*, 1999; COTELLE *et al.*, 1996). As isoflavonas são a classe mais comum e mais estudada de fitoestrógenos. A genistina e a daidzina, são exemplos de isoflavonóides encontrados em abundância na natureza. De acordo com Douglas e colaboradores (2006), estes dois isoflavonóides estão presentes na soja na forma glicosilada e sua concentração pode variar de 0,4 a 2,4 mg por grama de soja. Nesta forma glicosilada (genistina, daidzina), as isoflavonas estão inativas, porém as agliconas (genisteína, daidzeína) podem ser absorvidas pelo intestino.

De acordo com Kuiper e colaboradores (1998), os fitoestrógenos se ligam com maior afinidade aos receptores estrogênicos do tipo β . Os receptores estrogênicos estão presentes em diferentes órgãos, como ovários, glândulas mamárias e nos vasos sanguíneos (MORITO *et al.*, 2002). Em 1999, Dickson e Stancel demonstraram que os receptores do tipo α estão mais relacionados ao desenvolvimento de tumores do que os receptores do tipo β . O estradiol se liga com a mesma afinidade aos dois receptores, independente do subtipo de receptor (GUSTAFSSON, 1999), sugerindo que a utilização dos fitoestrógenos antes ou durante a menopausa é mais vantajosa devido à menor possibilidade de se desenvolverem tumores.

Em relação à cardioproteção, Feuer e colaboradores (1981), utilizando o modelo de ligadura da coronária em corações isolados, demonstraram que o tratamento de coelhos com Ipriflavona durante 8 dias (30 mg/kg/dia) inibiu a entrada de cálcio nas mitocôndrias levando à redução do consumo de oxigênio pelo músculo cardíaco. No mesmo trabalho, os autores constataram que o tratamento na mesma dose durante 10 dias levou ao decréscimo significativo do conteúdo de ácido lático no miocárdio, especialmente na região isquêmica. Demonstraram ainda que o tratamento de ratos durante 6 dias (10 mg/kg/dia) reduziu o dano induzido nas mitocôndrias ocasionado pela técnica de ligadura da coronária.

Os estudos realizados com a Ipriflavona são conflitantes. Ao mesmo tempo em que alguns pesquisadores demonstraram a sua eficácia, principalmente na prevenção da osteoporose (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997), outros alegaram que o tratamento da osteoporose com a Ipriflavona não é eficaz (ALEXANDERSEN *et al.*, 2001). Uma das explicações para os diferentes resultados encontrados nos estudos é a baixa biodisponibilidade oral da Ipriflavona, entre 21% e 24% (KIM e LEE, 2001). Para que ocorra a absorção da Ipriflavona administrada

por via oral, é necessária a dissolução deste fármaco no estômago ou no intestino delgado e subsequente absorção pela parede do intestino grosso. A Ipriflavona é uma substância lipofílica, com baixa solubilidade em água, o que dificulta sua absorção pela via oral. Além disso, a Ipriflavona sofre um extenso metabolismo de primeira passagem hepático, sendo metabolizada principalmente no fígado (KIM e LEE, 2001).

O interesse na utilização da Ipriflavona como alternativa à terapia de reposição hormonal tradicional está relacionado à sua baixa toxicidade. Em 1986, Tokiwa e colaboradores tentaram determinar a dose letal para 50% da amostra (DL₅₀) da Ipriflavona em cães e concluíram que doses de até 2,5 g/kg não foram tóxicas, sugerindo que a Ipriflavona possui uma ampla janela terapêutica. Kenkyu (1989) também tentou determinar a DL₅₀ da Ipriflavona em ratos e camundongos por diferentes vias de administração (oral, peritoneal e subcutânea) concluindo, da mesma forma, que as doses avaliadas não foram tóxicas. O valor encontrado para a DL₅₀ de Ipriflavona é mencionado na *United States National Library of Medicine* como 3,185 g/kg por via oral em camundongos (ZHURNAL, 1990).

Diversos autores (TANI *et al.*, 2004; AGNUSDEI e BUFALINO, 1997; TOKIWA *et al.*, 1986) avaliaram os efeitos adversos da Ipriflavona em diferentes modelos animais e em seres humanos. Foi relatado que os efeitos colaterais gastrointestinais ocorrem com frequência após a administração da Ipriflavona. Tani e colaboradores (2004) demonstraram que a Ipriflavona induz a apoptose em culturas de células gastrointestinais, o que pode ser uma provável causa para esses efeitos colaterais. Outro efeito relatado é a redução dos níveis de linfócitos plasmáticos (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997; ALEXANDERSEN *et al.*, 2001). Interações medicamentosas com teofilina, tolbutamida, fenitoína e warfarina (MONOSTORY e VERECZKEY, 1995; MONOSTORY *et al.*, 1998) também foram relatadas.

Mesmo sendo alvo de muita discussão no meio científico, a Ipriflavona tem sido utilizada na prevenção e no tratamento da osteoporose durante os últimos vinte anos em vários países, seja como fármaco, seja como suplemento alimentar (AGNUSDEI e BUFALINO, 1997; ARJMANDI *et al.*, 1997). A partir do desenvolvimento de uma formulação capaz de melhorar a biodisponibilidade por via oral da Ipriflavona e da demonstração do seu potencial cardioprotetor, a Ipriflavona passará a ser uma forte candidata para utilização como alternativa à terapia de reposição hormonal convencional, com a vantagem de possuir menos efeitos colaterais do que a clássica terapia com estrógeno. Entretanto, seus efeitos precisam ser adequadamente investigados.

2.2. Sistemas Autoemulsionantes

Os sistemas autoemulsionantes de liberação de fármacos são definidos como misturas isotrópicas de óleos (naturais ou sintéticos), surfactantes (sólidos ou líquidos), co-surfactantes e co-solventes (CHARMAN *et al.*, 1992). Estes sistemas são administrados sob a forma de cápsulas gelatinosas duras ou moles e, ao serem liberados no lúmen do intestino, encontram o meio aquoso e se dispersam para formar uma emulsão de aspecto fino, de tal maneira que o fármaco permanece em forma de dispersão no intestino, melhorando assim a velocidade de dissolução do fármaco, fator limitante da velocidade de absorção (CRAIG *et al.*, 1993; POUTON, 1997).

O fenômeno da emulsificação espontânea foi explorado durante muitos anos na comercialização de herbicidas e pesticidas, com o objetivo de solubilizar componentes hidrofóbicos destes agrodefensivos (GROVES, 1978). O potencial das autoemulsões em formulações para a administração de fármacos por via oral já é reconhecido há pelo menos vinte anos (AUNGST, 1993).

Em comparação com as emulsões convencionais, os sistemas autoemulsionantes são fisicamente estáveis e de fácil preparo (POUTON e PORTER, 2007). De acordo com revisão de Pouton (1997), as autoemulsões em contato com água produzem emulsões cujo tamanho dos glóbulos está entre 100 e 300 nm. Segundo o autor, o fator mais importante com relação ao sistema autoemulsionável é o destino no trato gastrointestinal (TGI), e não o tamanho dos glóbulos formados. Os triglicerídeos de cadeia longa, por exemplo, não se dispersam com facilidade, mas são facilmente digeridos no intestino apesar do seu tamanho (CAREY *et al.*, 1983), mostrando que sistema digestivo tem papel crucial na determinação do destino de todos os sistemas lipídicos, sendo então essencial o entendimento da digestão gastrointestinal. São, portanto, de extrema utilidade quaisquer ensaios *in vitro* que possam prever o destino dos sistemas autoemulsionáveis, e do fármaco após administração por via oral.

Diversos estudos foram desenvolvidos na tentativa de aumentar a biodisponibilidade da Ipriflavona. Jeong e colaboradores (1999) avaliaram a Ipriflavona liofilizada e verificaram que o método aumentou seis vezes a biodisponibilidade, em relação à Ipriflavona livre. Kim e Lee (2002) desenvolveram uma dispersão sólida à base de polivinilpirrolidona contendo Ipriflavona, utilizando a técnica de *spray-drier* e obtiveram biodisponibilidade de 25,1% após administração de 50 mg/kg de Ipriflavona por via oral em ratos.

A absorção sistêmica de fármacos consiste de uma sucessão de processos, incluindo a desintegração do produto e liberação do fármaco, seguida pela dissolução do fármaco em um ambiente aquoso e finalmente a absorção do fármaco através da membrana celular dos enterócitos para a circulação sistêmica. Neste processo de desintegração, dissolução e absorção, a velocidade através da qual o fármaco alcança a circulação sistêmica é determinada pelo passo mais lento da seqüência, podendo variar de fármaco para fármaco. Para fármacos com baixa solubilidade aquosa, a velocidade de dissolução é normalmente a etapa mais lenta e exerce, portanto, um efeito limitante na biodisponibilidade do fármaco (AMIDON *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1999; LAWRENCE e REES, 2000).

Apesar do mecanismo de emulsificação espontânea não estar completamente elucidado, diversas hipóteses são encontradas na literatura para explicar a eficácia dos sistemas autoemulsionáveis (LINDSTROM *et al.*, 1981; KOSSENA *et al.*, 2003; POUTON e PORTER, 2007). De acordo com Pouton e Porter (2007), os lipídeos melhoram a biodisponibilidade de fármacos através de alterações no trânsito intestinal, reduzindo a velocidade de absorção e, desta maneira, aumentando o tempo de dissolução. Tang e colaboradores (2007) sugeriram que a presença de lipídeos no TGI estimula o aumento na secreção de sais biliares e de lipídeos biliares endógenos (fosfolipídios e colesterol) levando à formação de micelas que aumentam a capacidade solubilizante no trato gastrointestinal. Porter e Charman (2001) relataram que os lipídeos podem elevar o transporte linfático de fármacos e assim aumentar direta ou indiretamente a biodisponibilidade através da redução do metabolismo de primeira passagem hepático. De acordo com Dahan e Hoffman (2007), os lipídeos e surfactantes podem atenuar a atividade de transportadores de efluxo intestinal, como por exemplo, a glicoproteína P.

A escolha dos excipientes da formulação é afetada por vários fatores, a saber: toxicidade, capacidade solvente, miscibilidade, estado físico à temperatura ambiente, digestibilidade, pureza, estabilidade química e custo (POUTON e PORTER, 2007). Na escolha do surfactante, a toxicidade é o fator mais importante. Todos os surfactantes são potencialmente irritantes ou pouco tolerados pelo organismo. De maneira geral, os surfactantes catiônicos são mais tóxicos do que os surfactantes aniônicos que por sua vez são mais tóxicos que os surfactantes não iônicos (WAKERLY *et al.*, 1986). No desenvolvimento de autoemulsões podem ser empregados diversos compostos com propriedades tensioativas. Os mais recomendados são os surfactantes não iônicos, por serem menos tóxicos e, portanto, considerados aceitáveis para ingestão oral. Os surfactantes normalmente utilizados são derivados de glicerídeos e

derivados poliglicosilados etoxilados. Os surfactantes de natureza anfótera, como a fosfatidilcolina (lecitina, figura 2), apresentam também baixa toxicidade e alta biocompatibilidade (LAWRENCE e REES, 2000).

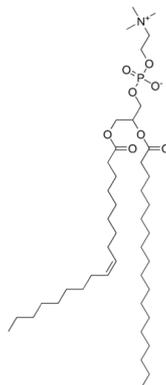


FIGURA 2 – Estrutura química da fosfatidilcolina (LAWRENCE e REES, 2000)

Os surfactantes de natureza não iônica, como os copolímeros de polioxietileno e propileno (poloxâmeros), polissorbatos e polietilenoglicóis (PEG) são também utilizados na preparação de autoemulsões (STRICKLEY, 2004; HAN *et al.*, 2004). Entre os principais representantes deste grupo destaca-se o polissorbato 80, também conhecido como Tween[®]80. A utilização deste emulsificante como co-surfactante é amplamente difundida em função da baixa viscosidade apresentada por ele, o que não alteraria a viscosidade do produto final, e pela formação de uma barreira estérica na interface, impedindo a agregação das gotículas de óleo (BENITA e LEVY, 1993; CUNHA *et al.*, 2003; TAMILVANAN e BENITA, 2004). Trotta e colaboradores (1998) descreveram que o uso de polissorbato 80 associado à lecitina de soja promove maior estabilização e redução do tamanho da gotícula.

Os óleos representam um dos excipientes mais importantes das autoemulsões, não apenas por serem capazes de solubilizar grandes quantidades do fármaco lipofílico, mas também porque podem aumentar a fração de fármaco lipofílico transportado através do sistema linfático intestinal, aumentando desta maneira a absorção pelo trato gastrointestinal (GURSOY e BENITA, 2004). Os óleos são constituídos por triglicerídeos. Estes produtos vegetais modificados ou hidrolisados têm sido amplamente utilizados no preparo de sistemas autoemulsionáveis por serem compatíveis e adequados para administração oral. Dentre as vantagens destes óleos estão os produtos de degradação formados, que se assemelham aos produtos de degradação naturais da digestão intestinal (PORTER e CHARMAN, 2001).

Os óleos comestíveis, que poderiam representar a escolha mais lógica e preferencial para o desenvolvimento de autoemulsões, não são selecionados com tanta frequência devido à sua baixa habilidade de dissolver grandes quantidades de fármacos lipofílicos. No entanto, estes óleos vegetais possuem muitas vantagens já que são comumente ingeridos na alimentação, sendo então completamente digeridos e absorvidos, apresentando assim menor risco de toxicidade. Os óleos vegetais são ésteres glicerídeos provenientes de uma mistura de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, frequentemente denominados triglicerídeos de cadeia longa. Óleos de diferentes fontes vegetais possuem diferentes proporções de cada ácido graxo (STRICKLEY, 2004; GROVE e MULLERTZ, 2007). Os triglicerídeos são altamente lipofílicos e a capacidade solvente dos mesmos é função da concentração de grupos éster. Sendo assim, os triglicerídeos de cadeia média geralmente possuem uma capacidade solvente maior do que os triglicerídeos de cadeia longa. (PORTER *et al.*, 2004) .

De acordo com Strickley (2004), diversas autoemulsões comercializadas contêm co-solventes solúveis. Os co-solventes mais populares são PEG 400, propilenoglicol (PPG), etanol e glicerol apesar de outros co-solventes aprovados já terem sido utilizados em estudos experimentais. O etanol foi utilizado em produtos à base de ciclosporina para auxiliar na solubilização do fármaco. Os co-solventes podem ser incluídos para aumentar a capacidade solvente da formulação, ou para auxiliar na dispersão dos sistemas que contêm uma grande quantidade de excipientes insolúveis em água (LAWRENCE e REES, 2000).

A avaliação da velocidade de dispersão das formulações em água e a determinação do tamanho dos glóbulos formados são dois ensaios frequentemente utilizados para caracterizar os sistemas autoemulsionáveis (CHARMAN *et al.*, 1992). No entanto, não foram descritos ainda na literatura métodos padrões para a caracterização destes sistemas. A velocidade de dispersão, por exemplo, não é quantificada, já que aparentemente não existe vantagem técnica em se quantificar com precisão a dispersão quando a mesma pode ser determinada por simples observação visual como eficaz ou ineficaz (POUTON e PORTER, 2007). Geralmente, sistemas autoemulsionantes bem desenvolvidos dispersam em cerca de segundos sob leve agitação. Desta maneira, a observação visual é suficiente para distinguir a adequabilidade de diferentes formulações. Em relação ao tamanho dos glóbulos formados, a técnica de espalhamento dinâmico da luz é a técnica mais adequada e rápida para esta determinação. Entretanto, a existência de glóbulos maiores que 1 µm deve ser avaliada com microscópios ópticos convencionais (POUTON e PORTER, 2007).

Ensaio *in vitro* podem auxiliar na caracterização dos sistemas autoemulsionáveis, já que é possível prever o efeito da diluição sobre a formulação (PORTER *et al.*, 2007). Sendo assim, os sistemas autoemulsionáveis devem ser submetidos à determinação da cinética de liberação *in vitro* do fármaco. Diferentes métodos podem ser utilizados para o estudo de liberação do fármaco a partir do sistema emulsionado, tais como a diálise, a diálise inversa, a separação baseada na ultracentrifugação, filtração a baixa pressão ou ultrafiltração-centrifugação (PATIL *et al.*, 2007; CHEN, *et al.*, 2007). Os experimentos podem ser realizados em diferentes meios, desde que obedecem às condições *sink* (isto é, em meio de dissolução a concentração do fármaco deve ser equivalente a até 20% da concentração de saturação), conforme a via de administração pretendida (LEGRAND *et al.*, 1999).

A eficácia dos sistemas autoemulsionantes está diretamente relacionada aos excipientes que compõem a formulação (GURSOY e BENITA, 2004). A maioria dos excipientes utilizados para a elaboração destes sistemas está bem descrita na literatura, e disponível comercialmente (POUTON, 1997). É imprescindível avaliar cada excipiente cuidadosamente para que se encontre o equilíbrio entre a toxicidade do surfactante utilizado e a eficácia na obtenção de emulsificação espontânea. Os sistemas autoemulsionantes, pelas propriedades descritas acima, constituem alternativa promissora para a veiculação da Ipriflavona por via oral.

2.3. Isquemia do miocárdio e cardioproteção

Do ponto de vista epidemiológico, as doenças cardiovasculares (DCV) representam um dos maiores problemas de saúde pública, não só nos países do primeiro mundo como também nos países em desenvolvimento (MACKAY e MENSAH, 2004). De acordo com relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008, 16,7 milhões de pessoas morreram devido à algum tipo de doença cardiovascular no mundo em 2002 e, destes, 7,2 milhões morreram devido à doença coronariana. No Brasil, as DCV são de grande impacto social (LESSA, 1998; RYAN *et al.*, 2005), sendo a primeira causa de óbito no país e responsável, em 1996, por 28% do total de óbitos (DATASUS, 2009). De acordo com dados divulgados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) em 2004, 34% dos óbitos no Brasil ocorrem por doença cardiovascular e 1/3 desse montante por doença coronariana, sendo o infarto do miocárdio uma das três doenças que mais matam em nosso país (PIEGAS e TIMERMAN, 2004; FERNANDES, 2008). Estes dados mostram a importância das doenças cardiovasculares no

panorama populacional brasileiro onde se observa elevação da expectativa de vida e conseqüente aumento da população de idosos (LESSA, 2003).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocorre quando há interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região do músculo cardíaco, tendo como conseqüência a necrose, devido à morte dos cardiomiócitos, que são altamente sensíveis à privação de oxigênio (ver GANONG, 1998; ver SUTTON e SHARPE, 2000). A necrose miocárdica é acompanhada por processo inflamatório onde há infiltração de neutrófilos e macrófagos no tecido morto (ver SOUZA, 2005). A isquemia aguda leva a alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais progressivas, que dependem da severidade e duração do episódio de isquemia (GOLDMAN, 1976; HASENFUSS, 1998). A conseqüência bioquímica principal é a glicólise anaeróbica que se inicia em segundos, levando à produção inadequada de substratos de energia e ao acúmulo de produtos de degradação danosos, como o ácido láctico (GUYTON e HALL, 1997; LIU *et al.*, 1997). O infarto agudo do miocárdio com necrose extensa ocorre quando a perfusão do miocárdio é acentuadamente reduzida por um intervalo de algumas horas (3 a 6 horas em modelos experimentais), resultando em perda da função pela morte celular causada pela necrose de coagulação (BROWN e STUBBS, 1983; RHOADES e TANNER, 1996; SABATINE *et al.*, 1998).

De acordo com Oliveti e colaboradores (1991), durante o processo de cicatrização, o músculo cardíaco com necrose apresenta inflamação aguda (mais proeminente em 2 a 3 dias) e os macrófagos começam então a remover os miócitos necróticos (5 a 10 dias). Capilares e fibroblastos povoam o miocárdio danificado, formando então, o tecido de granulação na região afetada (2 a 4 semanas). Os fibroblastos produzidos aumentam a quantidade de colágeno, o ventrículo infartado torna-se remodelado e depois o miocárdio é substituído por tecido fibrótico de baixa celularidade. Este remodelamento ocorre com os miócitos sobreviventes, os quais tentam compensar a função das células perdidas por hipertrofia compensatória (ROBERTSON e ROBERTSON, 1996; SOUZA, 2005). Na maioria dos casos, a cicatriz fibrosa está completa ao final de 6 semanas, e a eficiência do reparo depende do tamanho da lesão original. Uma vez cicatrizada, dificilmente é possível distinguir se a idade da lesão é de 8 semanas ou 10 anos (KAUFMAN *et al.*, 1959; ALEXANDER *et al.*, 1998; DOUGLAS, *et al.*, 2006).

Mesmo quando não são mortais, essas doenças levam, com freqüência, à invalidez parcial ou total do indivíduo (CARVALHO, 1988), com graves repercussões para esse, sua família e a sociedade. Isso mostra que o investimento na prevenção destas doenças é decisivo não só

para garantir a qualidade de vida, mas também evitar gastos com hospitalização, que a cada dia se tornam mais onerosos em razão do alto grau de sofisticação exigidos por tais tratamentos.

Em relação a intervenções terapêuticas em pacientes com infarto do miocárdio, os objetivos são limitar o tamanho do infarto, também aumentando a oferta de oxigênio e diminuindo a demanda, promover a estabilidade elétrica cardíaca, assegurar o conforto do paciente e prevenir complicações (RYAN *et al.*, 2005; PIEGAS, 2004). Basicamente, intervenções terapêuticas agudas são utilizadas para prevenir a perda da função do miocárdio e preservação da função ventricular, e o tratamento crônico da doença coronariana tem por objetivo o alívio de sintomas, como a angina; redução da isquemia, baseada, por exemplo, na redução de alterações visualizadas no eletrocardiograma (ECG), e redução da mortalidade (ROBERTSON e ROBERTSON, 1996; WEAVER *et al.*, 1991). O uso de antiplaquetários, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico (BECKER *et al.*, 2000) e de betabloqueadores, como por exemplo, o propranolol (PINHO, 1997), são exemplos de intervenções com eficácia demonstrada por evidências científicas e que têm sido amplamente divulgadas através de diretrizes práticas por várias sociedades internacionais e, também, pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2004). Outros exemplos de intervenções terapêuticas são o uso de trombolíticos, nitratos (vasodilatadores) e bloqueadores de canais de cálcio, sendo este último sem benefício definido (ALEXANDER *et al.*, 1998; ESCOSTEGUY *et al.*, 2001; FUCHS, 2004).

Inúmeros são os fármacos utilizados em tratamentos de doenças de alta prevalência e que provocam reações adversas ou efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular (ver PORTO, 2005), o que torna necessário o uso de esquemas posológicos mais complexos ou inviabiliza o tratamento. Neste contexto, a OMS e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vem recomendando a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos cardioprotetores, bem como de novas formulações para fármacos já existentes, assim como a avaliação da sua toxicidade.

A cardioproteção inclui todos os mecanismos e meios que contribuem para a preservação do coração pela redução ou mesmo a prevenção de danos cardíacos (KÜBLER e HAASS, 1996). Cardioproteção inclui então, prevenção de doença coronariana e de infarto do miocárdio e suas complicações, podendo envolver mecanismos adaptativos, agudos (por exemplo, a disponibilização de energia) ou crônicos, como por exemplo, o remodelamento estrutural (HEARSE, 2001).

A avaliação da cardioproteção pode ser realizada pela mensuração da força contrátil cardíaca ou contratilidade do miocárdio ou inotropismo cardíaco, sendo um dos principais indicadores do trabalho cardíaco desenvolvido (MCARDLE *et al.*, 2001). Deve ser avaliado também o consumo de oxigênio pelo miocárdio, sendo o duplo produto (pressão arterial sistólica x frequência cardíaca) um índice indireto e não invasivo de consumo de oxigênio utilizado na clínica (MIRANDA *et al.*, 2005). Tal índice exibe uma estreita correlação entre níveis elevados alcançados durante o esforço físico e estresse emocional, e o aparecimento de episódios de isquemia do miocárdio em pacientes com obstrução de coronárias (PREVITALI *et al.*, 1983; MCARDLE *et al.*, 2001).

Um dos exames mais utilizados para o diagnóstico do IAM é o eletrocardiograma (ECG), pois alterações no traçado do ECG podem ser indicativas de disfunções cardíacas ventriculares. De acordo com Goldman e colaboradores (1995), Kléber (2000) e Nicolau e colaboradores (2001), o sinal mais precoce de infarto agudo do miocárdio em humanos é o aplanamento do segmento ST, ou seja, a perda da discreta concavidade que existe normalmente na ascensão do segmento ST com duração transitória. Em animais, o segmento ST é desnivelado, inicialmente, com concavidade para cima, e onda T positiva. Instalada a fase superaguda, é regra habitual a presença do bloqueio de injúria, que se associa ao supradesnivelamento de ST e aumento na amplitude da onda T. Esse momento representa a pior fase da evolução em razão da maior possibilidade de ocorrer fibrilação ventricular.

Modelos experimentais de IAM são importantes para o estudo da fisiopatologia assim como para o desenvolvimento de novas terapêuticas para seu tratamento (YTREHUS *et al.*, 1994). Do ponto de vista experimental, IAM induzido em ratos pela ligadura da coronária tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo dos mecanismos celulares conseqüentes à isquemia e reperfusão (LIU *et al.*, 1997; SJAASTAD *et al.*, 2000) e para o estudo de fármacos a serem utilizadas na terapêutica dessas doenças cardiovasculares (LI, *et al.*, 2001; KOLETTIS, *et al.*, 2007).

De acordo com Johns e Olson (1954), existem dois tipos de ligadura: a ligadura permanente da artéria descendente anterior ou a ligadura temporária que promove isquemia seguida de reperfusão. Apesar do modelo de ligadura mimetizar o que ocorre no IAM natural, o sistema de circulação colateral difere muito entre as diversas espécies e em cada animal. Além disso, em roedores não há uma verdadeira artéria circunflexa como é vista em animais de maior porte físico. Portanto, o tamanho do infarto criado pela ligadura da coronária esquerda resulta em grande variabilidade de resultados. Neste modelo, o sistema

cardiovascular dos animais infartados sofre alterações hemodinâmicas e morfológicas comparáveis à situação clínica de IM em humanos (KOMPA e SUMMERS, 2000; PFEFFER *et al.*, 1979; YTREHUS *et al.*, 1994; MONNET e CHACHQUES, 2005). Seguindo o modelo proposto por Johns e Olson (1954), outros autores como Pfeffer e cols. (1979), Mill e cols. (1990), Ytrehus e cols.(1994), Leor e cols. (1996), Scorsin e cols. (1996), Liu e cols. (1997), Sjaastad e cols.(2000), De Angelis e cols. (2001) e Hayakawa e cols. (2003), realizaram o infarto agudo do miocárdio em ratos fazendo a ligadura da artéria coronária esquerda, com os objetivos de caracterizar o modelo ou utilizá-lo para a avaliação de fármacos potencialmente cardioprotetores. A oclusão da artéria coronária nesses animais tem um grande impacto na disfunção ventricular, podendo variar de alteração mínima à falência ventricular esquerda, sempre dependendo do tamanho do infarto (HAYAKAWA *et al.*, 2003).

Embora a mortalidade desse procedimento cirúrgico seja elevada (50% nas primeiras 48 horas) (MONNET e CHACHQUES, 2005), uma das maiores vantagens deste modelo é a possibilidade de manter os animais vivos por um longo período, até a formação da cicatriz na região miocárdica infartada e o aparecimento dos sinais de remodelamento ventricular (SOUZA, 2005).

Visto que estudos anteriores demonstraram a eficácia da Ipriflavona em situações de deficiência de oxigênio no miocárdio (FEUER *et al.*, 1981), o modelo de ligadura da coronária se mostra adequado para avaliação da potencial atividade cardioprotetora da Ipriflavona.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação autoemulsionável contendo a Ipriflavona e avaliar os efeitos cardiovasculares em modelo de isquemia do miocárdio induzida por ligadura da coronária em ratos fêmeas.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Desenvolver uma formulação autoemulsionável contendo Ipriflavona para a administração por via oral.

3.2.2. Caracterizar a formulação quanto aos aspectos físico-químicos e avaliar a cinética de liberação do fármaco *in vitro*.

3.2.3. Padronizar o modelo de indução de isquemia do miocárdio pela técnica da ligadura da coronária anterior esquerda em ratos *Wistar* fêmeas adultas.

3.2.4. Avaliar a atividade cardioprotetora da Ipriflavona livre e veiculada no sistema autoemulsionável em ratos *Wistar* fêmeas, administrada por via oral, em dose única.

3.2.5. Avaliar a atividade cardioprotetora da Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável em ratos *Wistar* fêmeas, administrada por via oral, em doses repetidas (7 dias).

4. METODOLOGIA

4.1. Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionante

4.1.1. Avaliação da solubilidade

Através de revisão de literatura foram selecionados 7 óleos e 11 surfactantes (listados nas tabelas 2 e 3 dos resultados) nos quais a solubilidade da Ipriflavona foi avaliada, com o objetivo de determinar os excipientes capazes de solubilizar a maior quantidade possível de Ipriflavona e portanto, mais adequados para a formulação, de maneira a obter um teor elevado de fármaco em uma menor massa de excipientes.

O ensaio consistiu na adição de uma quantidade em excesso de Ipriflavona (aproximadamente 500 mg) a diferentes tubos de ensaio contendo exatamente 2 ml dos excipientes (óleos, surfactantes, co-surfactantes e co-solventes) a serem avaliados. Com o auxílio de agitador do tipo vórtex (Quimis, Q228) os tubos contendo a mistura de Ipriflavona e excipiente foram homogeneizados durante 1 min e, em seguida, colocados em banho-maria a 37°C por 48 horas, sob agitação. Após este período, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min para que o excesso de Ipriflavona precipitasse. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 50 µl do sobrenadante e diluída em 1 ml de acetonitrila para quantificação da Ipriflavona em espectrofotômetro (Helios α) a 251 nm.

4.1.2. Obtenção do sistema autoemulsionante

Após a determinação da solubilidade máxima da Ipriflavona nos diferentes excipientes, foram preparadas 60 formulações, combinando os diferentes excipientes com potencial para o desenvolvimento de uma autoemulsão a fim de avaliar a compatibilidade entre os mesmos.

Para o preparo das autoemulsões, inicialmente foi realizada a fusão da mistura lecitina de soja (co-surfactante) e surfactante em banho-maria a 37 °C sob agitação constante (2.000 rpm). Em paralelo, a Ipriflavona foi adicionada ao co-solvente e ao óleo e após completa solubilização esta mistura foi, então, adicionada sobre a mistura de lecitina de soja e surfactante a 25°C. O sistema permaneceu sob agitação até que a mistura estivesse homogênea.

As formulações assim preparadas foram avaliadas macroscopicamente logo após o preparo a fim de se verificar separação de fases, cristalização do fármaco ou algum outro sinal de incompatibilidade entre os excipientes. As combinações de excipientes e Ipriflavona estáveis foram selecionadas para a elaboração de várias formulações contendo os mesmos excipientes, porém em diferentes proporções para avaliação da capacidade de autoemulsificação e construção do diagrama ternário.

4.1.3. Avaliação da emulsificação espontânea (autoemulsificação)

O diagrama ternário foi construído após a escolha do surfactante, co-surfactante e óleo, de tal maneira que cada um destes excipientes representou um dos lados do gráfico triangular.

Foram preparadas 60 misturas homogêneas de surfactantes, co-solventes e óleos em diversas proporções, seguindo os critérios de Pouton (1997), segundo o qual a concentração de surfactante ($EHL < 12$) deve variar entre 20% e 60%, a concentração de óleo deve variar entre 40% e 80% e a concentração de co-surfactante entre 0% e 30% (p/p). Para a elaboração do desenho experimental inicialmente a quantidade de óleo da formulação foi mantida constante (por exemplo, em 40%) e a quantidade de surfactante foi sendo gradualmente reduzida, de 5% em 5% a partir de 60%. A quantidade de co-surfactante utilizada foi tal para completar os 100% em cada formulação.

Para avaliar a autoemulsificação, foi retirada uma alíquota de 50 μ l de cada uma das formulações preparadas e esta alíquota foi diluída em 50 ml de água ultrafiltrada (MiliQ, Milipore[®]), sob leve agitação. A ocorrência ou não de emulsificação espontânea foi determinada através de observação visual.

4.1.4. Determinação do tamanho dos glóbulos

O tamanho médio das gotículas da autoemulsão e o índice de polidispersão foram determinados através de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Nanosizer N5 PLUS (Beckman Coulter). Uma alíquota de 50 μ l foi retirada de cada uma das formulações preparadas e esta alíquota foi diluída com 50 ml de água ultrafiltrada em tubo de ensaio. Em seguida, foi retirada uma nova alíquota de 25 μ l da diluição anterior e colocada em cubeta de quartzo preenchida com água ultrafiltrada. Esta cubeta foi posicionada no

aparelho para determinação do tamanho médio dos glóbulos e o índice de polidispersão em um ângulo de 90°, à temperatura ambiente. Além disso, a mesma técnica foi utilizada para avaliar a estabilidade física das preparações ao longo do tempo.

A espectroscopia de correlação de fótons, também denominada espalhamento dinâmico da luz é um dos métodos mais utilizados para determinar o tamanho e o índice de polidispersão de dispersões coloidais com tamanho entre 3 nm e 3 µm. Além disso, a distribuição de tamanho da população de partículas (índice de polidispersão) é essencial para a determinação da qualidade das dispersões em termos de homogeneidade de tamanho. A técnica baseia-se na análise do movimento browniano dos glóbulos, ou seja, na capacidade de deslocamento constante dos glóbulos presentes num determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada forme um padrão de movimento. Através da dispersão da luz torna-se possível determinar o tamanho médio dos glóbulos. A equação abaixo é utilizada para o cálculo do índice de polidispersão de tamanho de uma amostra, segundo a literatura (ZILI *et al.*, 2005).

$$\text{Polidispersão} = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)}$$

$$D(0.5)$$

$D(0.9)$ = corresponde ao tamanho dos glóbulos imediatamente acima de 90% na amostra.

$D(0.5)$ = corresponde ao tamanho dos glóbulos imediatamente acima de 50% na amostra.

$D(0.1)$ = corresponde ao tamanho dos glóbulos imediatamente acima de 10% na amostra.

4.1.5. Cinética de liberação

Para a avaliação *in vitro* da liberação do fármaco a partir da autoemulsão, o teste de liberação foi realizado utilizando o método de diálise inversa (CHANDRAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007). Uma alíquota de 1 ml de solução salina tamponada (pH 6,8) foi colocada dentro de doze membranas de diálise (12-14000 MWCO) previamente hidratadas. As membranas semipermeáveis foram então colocadas em uma cuba de dissolução contendo 800 ml do mesmo meio, a 37°C, sob agitação constante (50 rpm). No tempo zero, 2 ml da autoemulsão recém preparada, contendo quantidade de fármaco suficiente para atender à condição *sink*, foi adicionada ao meio em uma das cubas. O mesmo procedimento foi realizado com a Ipriflavona livre, em outra cuba. A cada intervalo de tempo (0, 10, 15,

30 min; 1, 2, 3, 4, 6, 18, 20 e 24 horas) foi retirada uma membrana de cada cuba com reposição do volume retirado. A alíquota de 1 ml de dentro da membrana foi diluída em metanol (1:1) e após filtração em membranas de 0,45 µm, a leitura da porcentagem de liberação do fármaco foi determinada por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) a 251 nm. Todos os experimentos de liberação em meio aquoso foram realizados em triplicata.

4.1.6. Estabilidade

O efeito do tempo de estocagem na distribuição de tamanho e no pH das autoemulsões foi avaliado. Para isso, as formulações foram estocadas em frascos de vidro selados a 25°C e protegidos da luz, durante um período de dez meses. As características macroscópicas referentes ao aparecimento de instabilidades como cremagem, formação de sedimento e precipitação do fármaco, foram avaliadas imediatamente após preparação e a cada dois meses.

4.2. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da Ipriflavona *in vivo*

4.2.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas (230 a 270 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno no biotério da Escola de Farmácia de Ouro Preto até a realização dos experimentos. Durante todo o período de adaptação e experimentação foi fornecida alimentação e água à vontade. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da UFOP (11/2009).

4.2.2. Obtenção dos sinais de eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial (PA)

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (60 mg/kg), administrado por via intraperitoneal (i.p.). A cirurgia foi iniciada após a anestesia ter alcançado a profundidade requerida. Os ratos foram traqueostomizados utilizando-se cânula de polietileno, e conectados ao respirador (SAR-840, USA) para permitir ventilação adequada (frequência de 38 bpm -

Breaths per minute). A artéria femoral foi cateterizada utilizando-se cânula confeccionada com tubo de polietileno (PE) para obtenção do sinal da pressão arterial (PA). Para a obtenção do sinal do eletrocardiograma (ECG) foram utilizados como sensores agulhas hipodérmicas de aço inoxidável, posicionadas de modo a possibilitar a medição da diferença de potencial relativa à derivação DII. O transdutor de PA e o cabo do ECG foram conectados a um sistema de condicionadores de sinais (desenvolvido no Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais). Os sinais obtidos desse sistema foram amostrados em tempo real a uma frequência de 1200 Hz por uma placa conversora analógico-digital de 12 bits de resolução (Daqboard 2000, USA), conforme apresentado na figura 3.

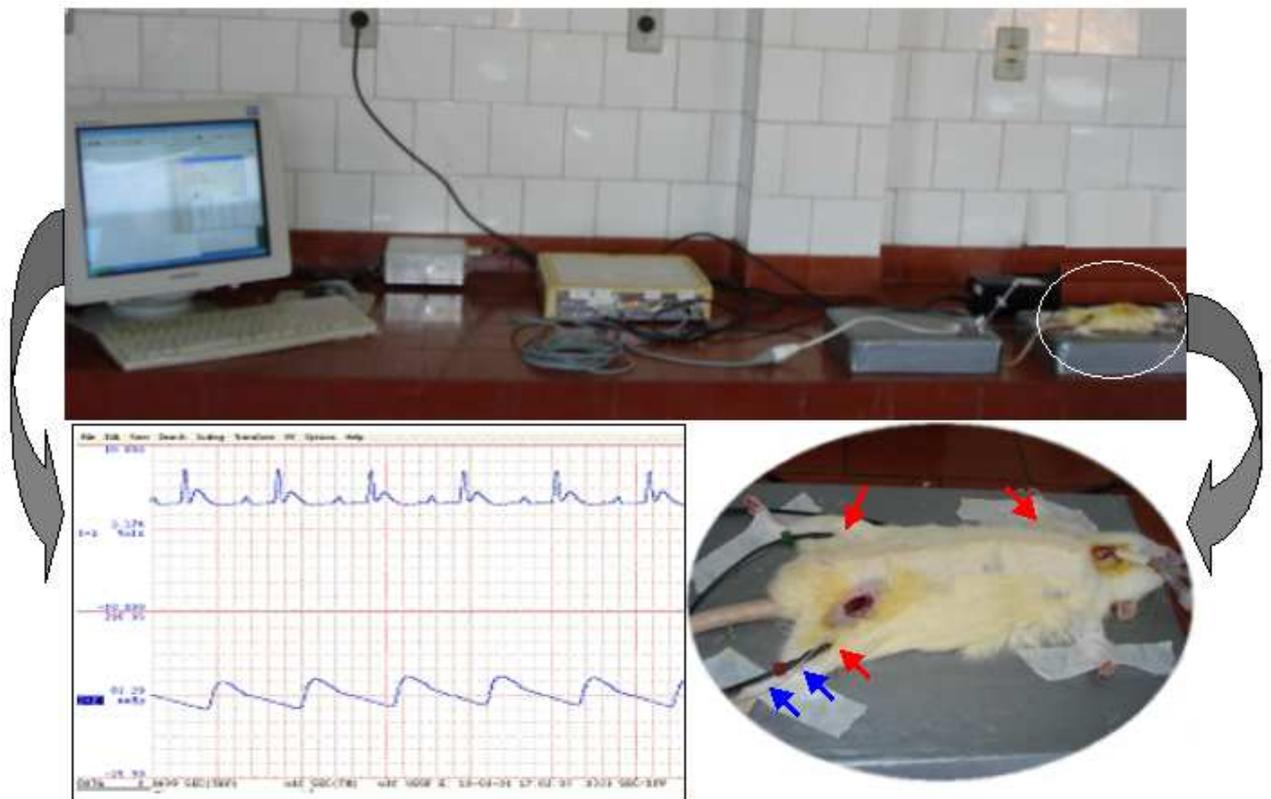


FIGURA 3 - Sistema de aquisição dos sinais de ECG e PA. Em destaque, lado direito da figura: animal anestesiado após cirurgia com agulhas hipodérmicas inseridas subcutaneamente (setas vermelhas) e cateter intra-arterial para aquisição do sinal de pressão (seta azul). No lado esquerdo, em destaque o sinal obtido.

4.2.3. Indução de isquemia do miocárdio

O procedimento para a indução de isquemia do miocárdio por ligadura de coronária em ratos foi executado de acordo com técnica descrita anteriormente (SELYE, 1960; FISHBEIN *et al.*, 1978). Após toracotomia no 4^o espaço intercostal esquerdo, o coração foi eviscerado e foi realizada ligadura na artéria coronária descendente anterior esquerda, entre o cone da artéria pulmonar e o átrio esquerdo, utilizando agulha atraumática e fio de algodão. O coração foi então rapidamente reposicionado à caixa torácica e a sutura previamente preparada foi concluída para fechamento do tórax. Os animais do grupo controle (submetidos à cirurgia fictícia) foram submetidos a todos os passos do procedimento cirúrgico acima descrito, exceto a ligadura da artéria coronária.

4.2.4. Análise do ECG e da PA

Os sinais digitais foram analisados por inspeção visual do registro com o auxílio do *software WinDaq/EX Playback and Analysis* (DATAQ Instruments, USA), utilizando-se diversos fatores de compressão para os sinais. Nesta fase também foi realizada a análise e classificação das alterações da morfologia dos ECGs. Após amostragem de segmentos de 2 segundos, foram obtidos os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos do ECG: QT (intervalo entre o início da onda Q e o término da onda T do ECG), RR (intervalo entre duas ondas R do ECG), PR (intervalo entre a onda P e início da onda R) e complexo QRS (início da onda Q até final da onda S). O intervalo QT foi posteriormente corrigido em função da frequência cardíaca utilizando a fórmula de Fridericia (1920) ($QTc = QT/(RR)^{1/3}$). De acordo com Abernethy e colaboradores (2001), o intervalo QT pode ser corrigido pela fórmula de Fridericia para valores de RR menores que 500 ms ou pela fórmula de Bazett para valores de RR maiores que 500 ms. No presente trabalho somente foram encontrados valores de RR menores que 500 ms sugerindo que a fórmula de Fridericia é a mais adequada.

Outro parâmetro avaliado foi a área sob a curva do segmento ST, utilizando-se o método de estimativa da área por planimetria (FELDMAN, 2004; MANSUR *et al.*, 2006). A área sob a curva do segmento ST foi demarcada em cada conjunto de ondas amostradas (figura 4).

Para a demarcação da área sob a curva, primeiramente, foi criada uma linha vertical partindo do ponto onde se inicia a inclinação da onda S. Em seguida, foi traçado uma linha horizontal, da direita para a esquerda, a partir do ponto em que a onda T atinge o ponto isoeletrico do ECG (MANSUR *et al.*, 2006). A estimativa da área foi então realizada por planimetria, com auxílio do software AUTOCAD[®]. Os dados foram obtidos como valores absolutos nos tempos: antes da ligadura (controle), 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a ligadura. Em seguida, foi realizada análise de variação da área para cada animal em relação ao tempo controle.

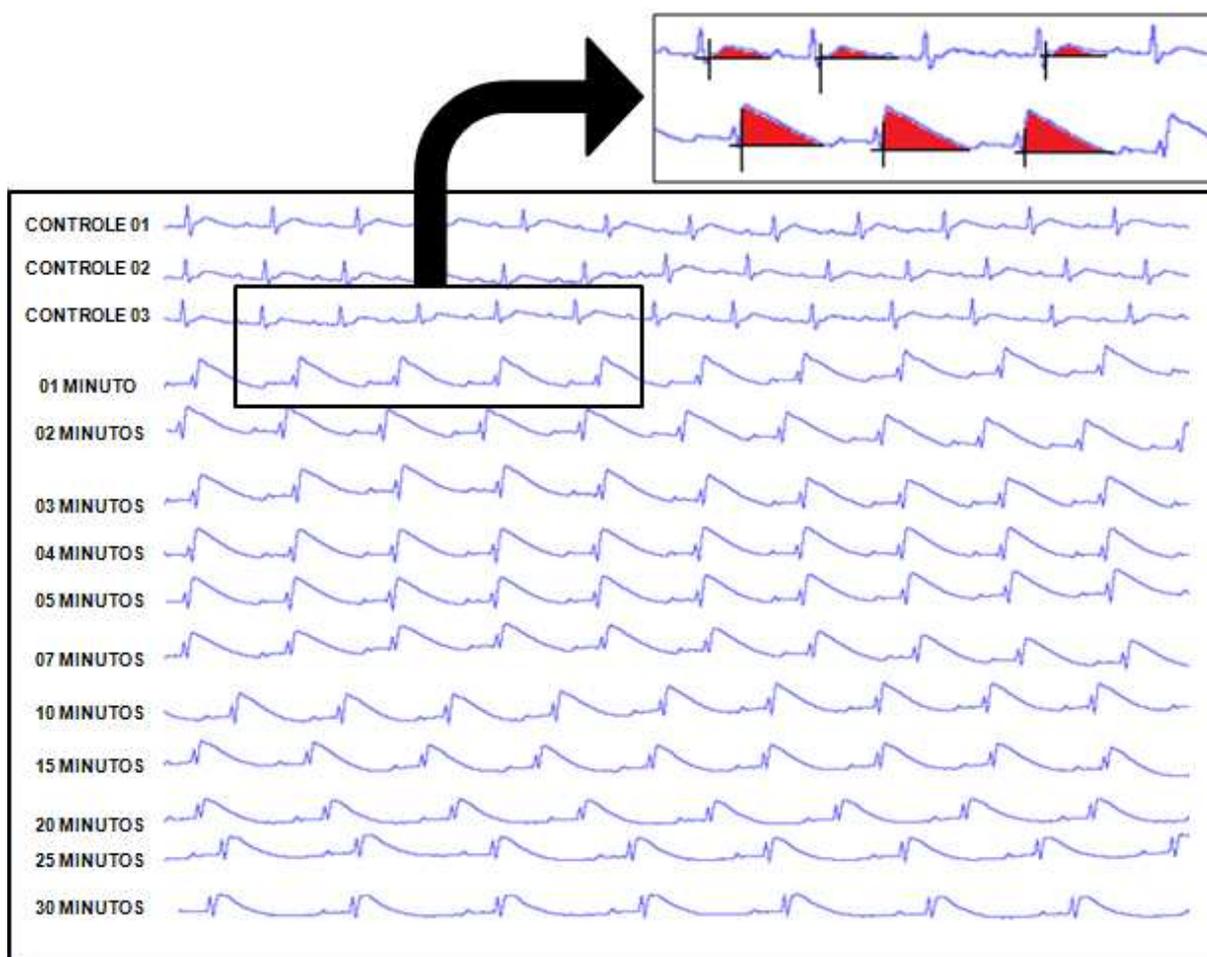


FIGURA 4 – Segmentos de 2 segundos amostrados de animal representativo do grupo não tratado. Em detalhe exemplificação da seleção de área para cálculo por planimetria.

4.2.5. Determinação da concentração plasmática de Ipriflavona

Ao término dos experimentos uma alíquota de 0,5 ml de sangue total heparinizado foi coletada de cada animal para a determinação da concentração plasmática de Ipriflavona através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm e alíquotas de 250 µl de plasma obtidas foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

Para a utilização do método de determinação da concentração plasmática de Ipriflavona utilizando a CLAE, é necessário realizar previamente a validação bioanalítica para garantir a confiabilidade dos resultados. Sendo assim, foram estudados os parâmetros linearidade, precisão e exatidão. As curvas de calibração para a determinação da linearidade foram obtidas através da análise de 8 concentrações da solução de Ipriflavona (Sigma, USA), cada uma em sextuplicata, variando de 40 ng/ml a 1000 ng/ml. A precisão e a exatidão do método foram avaliadas utilizando três concentrações diferentes de Ipriflavona no plasma, em triplicata.

Com o método validado, foi então realizada a determinação da concentração plasmática da Ipriflavona (Galena, Brasil) nos plasmas previamente coletados. As amostras de plasma foram descongeladas 24 horas antes da análise e contaminadas com metformina (padrão interno) na concentração de 3 µg/ml. Em seguida, 500 µl de acetonitrila foi adicionada para precipitar as proteínas presentes no plasma. Após homogeneização em vórtex por 1 min e centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) e evaporado à temperatura ambiente em dessecador a vácuo. Após a completa evaporação da acetonitrila o precipitado foi ressuscitado com a fase móvel (metanol : ácido acético 1% em H₂O, 50: 50 (v/v)) e injetado no cromatógrafo.

A CLAE (Waters[®] 2695) foi realizada a 254 nm em detector PDA, utilizando coluna de fase reversa C18 e fase móvel constituída de metanol e solução de ácido acético a 1 % em água, com eluição gradiente (0-5 min: 55-90 % de metanol; 5-9 min: 90 % de metanol; 9,1-14 min: 55 % de metanol). O fluxo foi 1,0 ml/min, e o volume de injeção foi 75 µl.

4.2.6. Análise histopatológica do coração

Para avaliar as alterações histopatológicas os corações de todos os animais dos grupos experimentais foram coletados e fixados em solução de formol a 10 % tamponado (pH 7,2), com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido até a confecção das lâminas no Laboratório de Imunopatologia, NUPEB, UFOP.

Para a confecção das lâminas, os corações foram submetidos à desidratação em banhos de álcool para remover toda a água presente nos mesmos. Após a desidratação, foi realizada a diafanização a fim de tornar o tecido translúcido. Para isso, os tecidos foram submetidos a dois banhos de xilol. Em seguida, os corações foram incluídos em parafina, utilizando dois banhos de parafina para penetração da mesma nos vasos e espaços intercelulares. Os blocos de parafina contendo os tecidos impregnados foram então submetidos à microtomia, quando foram obtidos dois cortes seriados de 4 µm de espessura cada um, para cada bloco. Os cortes foram colocados em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e colocadas sobre as lâminas de vidro que foram mantidas em estufa a 60°C para secagem.

As lâminas foram submetidas à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para proporcionar uma análise geral das alterações histopatológicas. O processo de coloração consistiu primeiramente da imersão das lâminas em banhos de xilol, para desparafinização, seguida de imersão em banhos de álcool e água, para re-hidratação. As lâminas foram então submetidas ao banho no corante hematoxilina (corante ácido), e em seguida foram lavadas em água corrente. Foi realizada, então, a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente, imersas no corante eosina (corante básico) e lavadas em água corrente. Para finalizar o processo, as lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60°C por alguns min para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

As avaliações foram realizadas utilizando objetivas de 10X e de 40X no microscópio Olympus BX50, localizado no laboratório de imunopatologia, UFOP. A fotodocumentação foi realizada no Laboratório Multiusuário do NUPEB, UFOP, utilizando objetiva de 40X do microscópio Leica, DM5000, acoplado à câmera digital e computador.

4.2.7. Protocolos experimentais

4.2.7.1. Protocolo I: Tratamento Agudo

Os animais foram tratados com a Ipriflavona na forma livre, nas doses de 30 mg/kg e 1 g/kg ou veiculada no sistema autoemulsionável, nas doses 30 mg/kg e 240 mg/kg por via oral 1 hora antes da realização da ligadura da coronária. Para administração da forma livre, foi preparada suspensão de Ipriflavona em carboximetilcelulose, por se tratar de um veículo inerte. Tanto a Ipriflavona livre como a veiculada na autoemulsão foram administradas por gavagem. Os animais foram anestesiados 30 min após a administração e submetidos ao procedimento cirúrgico descrito anteriormente para registro dos parâmetros cardiovasculares. Foi realizado registro controle de 5 min de duração antes da ligadura da coronária. O registro dos parâmetros cardiovasculares foi obtido continuamente durante a ligadura da coronária até 30 min após o término da cirurgia. Ao término dos experimentos, foi coletada alíquota de 0,5 ml de sangue total heparinizado para determinação da concentração plasmática de Ipriflavona. Além disso, o coração, fígado e rins dos animais foram coletados e armazenados em formol tamponado para as análises histopatológicas.

4.2.7.2. Protocolo II: Tratamento Sub-Agudo

Os animais foram tratados com a Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas doses 30 mg/kg e 240 mg/kg por via oral durante 7 dias em dose única diária, sendo a última dose administrada 1 hora antes da cirurgia de ligadura da coronária. Os animais foram anestesiados 30 min após a última dose de Ipriflavona e submetidos ao mesmo procedimento descrito no item anterior (4.2.7.1).

4.2.8. Análise estatística

Os resultados de parâmetros cardiovasculares (PR, QRS, QT, QTc, PAS, PAD e FC) foram expressos em valores absolutos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A análise da área sob a curva do segmento ST foi expressa como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da variação percentual em relação ao período controle. Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados normais foram submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram registradas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$). Para todas as análises foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento e caracterização do sistema autoemulsionante

5.1.1. Solubilidade

A curva de calibração da Ipriflavona em acetonitrila foi construída a partir das medidas de absorbância, realizada pela espectrofotometria no visível (251 nm), apresentadas na tabela 1. Foi observado que o limite de quantificação foi inferior a 1 µg/ml, com coeficientes de variação inferiores a 5%. O coeficiente de correlação (R^2) demonstra que 99,86% dos dados estão inseridos na curva, o que sugere uma correlação linear entre as concentrações de Ipriflavona e as absorbâncias obtidas. Estes resultados possibilitam a utilização da curva acima na determinação da solubilidade da Ipriflavona em diferentes veículos (tabelas 2, 3 e 4).

TABELA 1 - Valores de absorbância utilizados para a construção da curva de calibração da Ipriflavona em acetonitrila.

Ipriflavona (µg/ml)	Absorbância Média (251 nm) ^a	CV (%)
1	0,132 ± 0,004	3,05
2	0,243 ± 0,003	1,55
3	0,350 ± 0,003	1,00
4	0,458 ± 0,008	1,87
5	0,567 ± 0,006	1,17
6	0,684 ± 0,007	1,05
7	0,764 ± 0,026	3,45
8	0,900 ± 0,010	1,20
9	1,019 ± 0,008	0,83
10	1,147 ± 0,009	0,81

^a n = 3; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação, dado por (DP/média)*100; $R^2 = 0,9986$; $y = 0,1112x + 0,0153$.

TABELA 2 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes óleos (*n = 3)

	Absorbância média*	Solubilidade (mg/ml)
Óleo de algodão	0,046 ± 0,003	6,703
Óleo de girassol	0,054 ± 0,001	8,432
Óleo de canola	0,061 ± 0,018	10,018
Óleo de soja	0,091 ± 0,017	16,432
Propilenoglicol dicaprilato	0,127 ± 0,001	24,360
Triglicérides do ácido cáprico	0,137 ± 0,005	26,522
Óleo de milho	0,594 ± 0,003	125,261

TABELA 3 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes surfactantes (*n = 3)

Nome Químico	Nome Comercial	Absorbância média*	Solubilidade (mg/ml)
Propilenoglicol	---	0,025 ± 0,001	2,234
Polietilenoglicol 300	PEG 300	0,084 ± 0,006	14,991
Polyoxyl-35 castor oil	Cremophor EL	0,093 ± 0,006	16,937
Oleoyl polyoxylglycerides	Labrafil® M1944	0,105 ± 0,003	19,459
Linoleoyl polyoxyglycerides	Labrafil® M2125	0,070 ± 0,003	30,270
Polissorato 80	Tween 80	0,189 ± 0,007	37,694
Propilenoglicol monocaprilato	Capryol™ PGMC	0,197 ± 0,004	39,423
Polissorato 20	Tween 20	0,205 ± 0,001	41,081
Caprylocaproyl polyoxylgliceride	Labrasol®	0,212 ± 0,005	42,523
Polietilenoglicol 400	PEG 400	0,214 ± 0,003	43,099
Dietilenoglicol Monoetil Éter	Transcutol®	0,222 ± 0,010	44,757

TABELA 4 – Solubilidade da Ipriflavona em diferentes meios (*n = 3)

	Absorbância média*	Solubilidade (mg/ml)
Água Ultrafiltrada	0,015 ± 0,001	0,036
Tampão pH 1,2	0,021 ± 0,001	1,297
Tampão pH 6,8	0,033 ± 0,001	4,036
Tampão pH 3,0	0,044 ± 0,003	6,414
Alcool Benzílico	0,261 ± 0,002	26,703
Acetonitrila	0,282 ± 0,005	57,874

5.1.2. Obtenção do sistema autoemulsionante

A partir dos estudos de solubilidade, diferentes sistemas autoemulsionantes (tabela 5) foram preparados utilizando o mesmo óleo (óleo de milho) e variando o surfactante, para os estudos de compatibilidade entre os excipientes.

A primeira formulação desenvolvida (F01) consistiu de uma mistura de óleo de milho, Capryol e Tween 80, conforme apresentado na tabela 5. Esta formulação, no entanto, apresentou problemas de compatibilidade entre os constituintes, visto que o Tween 80 é insolúvel em óleos vegetais. As formulações preparadas utilizando Labrasol, Transcutol e Polietilenoglicol 400 (Tabela 5: F02, F03 e F04) não apresentaram problemas de incompatibilidade entre os excipientes logo após o preparo. Porém, durante os ensaios de emulsificação espontânea a emulsão formada não foi estável, ocorrendo quebra das emulsões formadas (figura 5).

A veiculação de fármacos em formulações líquidas pode levar à ocorrência de cristalização do fármaco (DAVEY *et al.*, 1996). De acordo com Furedi-Milhofer e colaboradores (1999), a cristalização é indesejável porque a precipitação do fármaco após administração *in vivo* pode levar à menor biodisponibilidade, comprometendo o potencial da formulação. Após a adição de Ipriflavona na formulação F05 foram observados sinais de cristalização nas primeiras 2 horas de armazenamento. Após 24 horas a cristalização foi intensificada, assumindo a aparência observada na figura 6.

Para solucionar o problema da cristalização, diversas tentativas foram avaliadas neste trabalho. Foram desenvolvidas formulações contendo como co-solvente: ácido oléico (F06), quitosana (F07), glicerina (F08), propilenoglicol (F09), álcool benzílico (F10) e álcool etílico (F11). Apenas as formulações contendo álcool superaram o problema da cristalização. O álcool benzílico é utilizado como solubilizante até a concentração máxima de 5%, já que acima de 10% apresenta propriedades anestésicas locais (MESSIHA, 1991). Desta maneira, o álcool etílico foi selecionado como co-solvente, por apresentar menor toxicidade em relação ao álcool benzílico e ser mais adequado para administração por via oral.

Pesquisas demonstram que a adição de co-surfactantes aumenta a área de formação de microemulsões, em sistemas compostos por lecitinas e triglicerídeos (TROTTA *et al.*, 1998). As lecitinas são uma mistura complexa de fosfatídeos insolúveis em acetona, e que consistem de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol combinados com várias outras substâncias como triglicerídeos, ácidos graxos e carboidratos. Dessa forma, foi desenvolvida uma nova formulação (tabela 5: F05) utilizando a lecitina como co-surfactante. Esta formulação não apresentou os problemas de compatibilidade encontrados anteriormente, e ao entrar em contato com a água foi formada emulsão estável.

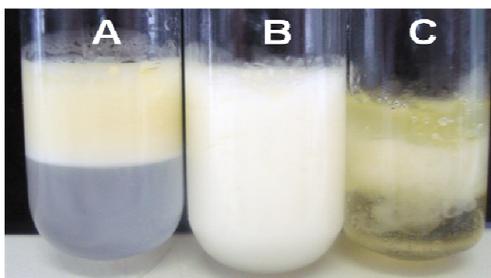


FIGURA 5 – Estabilidade do sistema autoemulsionável após adição de água. (A) Coalescência; (B) Emulsão estável; (C) Quebra da emulsão.

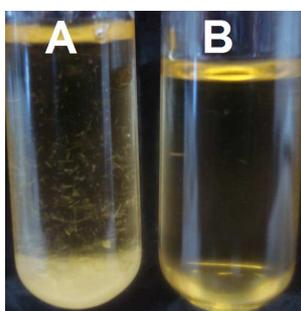


FIGURA 6 – Estabilidade do sistema autoemulsionável após 24 horas de armazenamento. (A) Cristalização da Ipriflavona. (B) Autoemulsão com Ipriflavona, sem cristalização

TABELA 5 – Composição dos sistemas autoemulsionáveis avaliados no estudo de compatibilidade

Composição					
Óleo	Surfactante	Co-surfactante	Co-solvente	Identificação	
Óleo de Milho (60%)	Capryol (25%)	Tween 80 (15%)	---	F01	
		Labrasol (15%)	---	F02	
		Transcutol (15%)	---	F03	
		PEG 400 (15%)	---	F04	
		Lecitina (15%)	---	F05	
			Ácido Oleico (5%)		F06
			Quitosana (5%)		F07
			Glicerina (5%)		F08
		Lecitina (10%)	Propilenoglicol (5%)		F09
			Álcool Benzílico (5%)		F10
			Álcool Etílico (5%)		F11

5.1.3. Avaliação da Emulsificação Espontânea

Após a avaliação da compatibilidade entre os excipientes, foi elaborado o diagrama ternário contendo as 50 formulações desenvolvidas com os mesmos excipientes, porém, em diferentes proporções (figura 7). O objetivo deste diagrama é demarcar a área correspondente às concentrações onde ocorre emulsificação espontânea. As formulações foram diluídas em água e partir de observação visual do tempo necessário para a completa emulsificação do sistema os pontos foram demarcados. Foi verificado a formação de sistemas autoemulsionáveis estáveis com concentração de óleo variando de 45 a 70%, desde que a concentração de surfactantes estivesse entre 20 e 30%. Após análise do diagrama ternário, a formulação contendo 60% de óleo de milho, 25% de capryol e 15% de lecitina de soja foi selecionada como possível candidata aos ensaios *in vivo*.

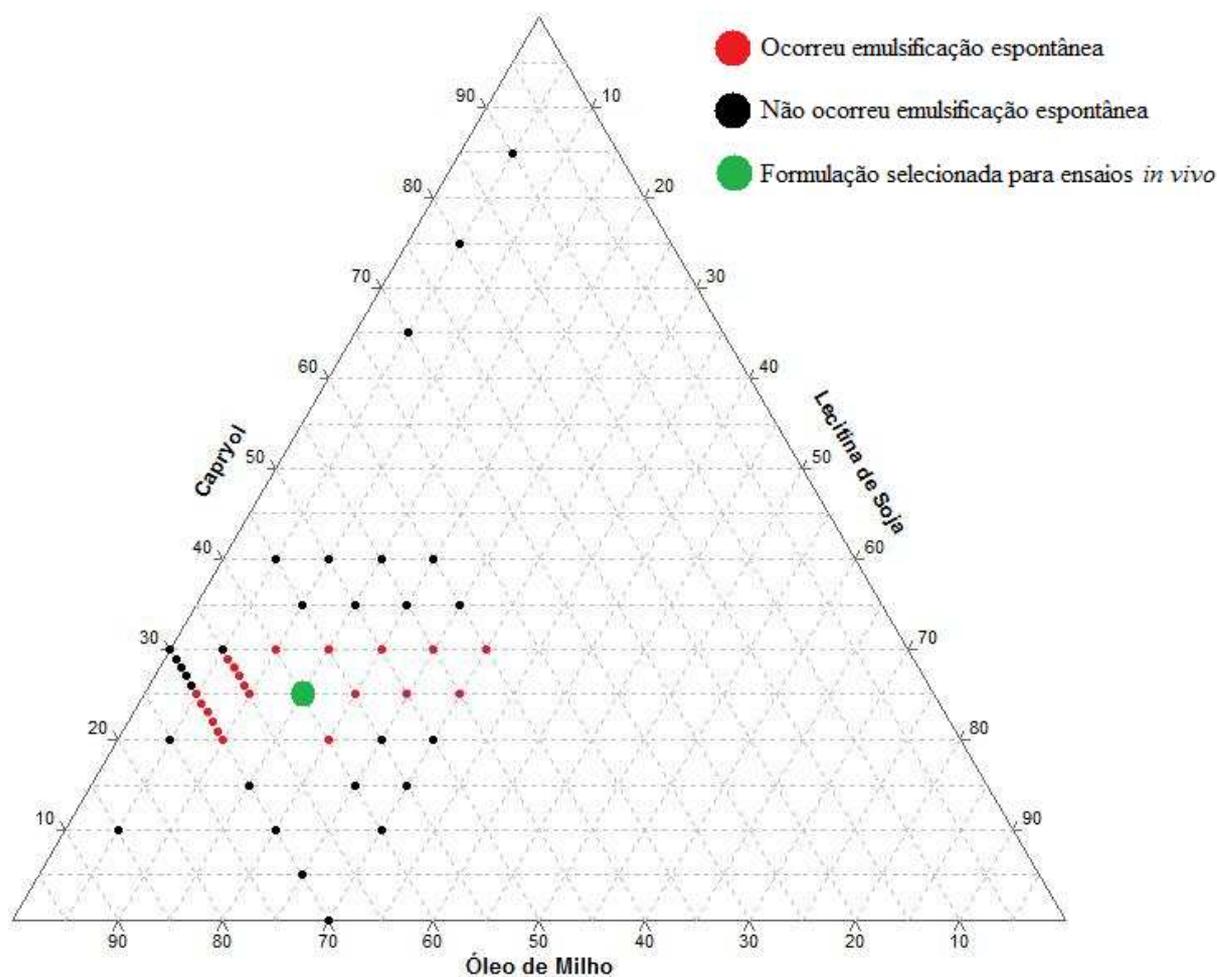


FIGURA 7 – Diagrama ternário das autoemulsões desenvolvidas.

5.1.4. Determinação do tamanho dos glóbulos

De acordo com os dados apresentados na tabela 6, o tamanho dos glóbulos formados pelo sistema autoemulsionável após solubilização em água sofreu pouca variação nas formulações onde ocorreu emulsificação espontânea. A determinação do tamanho dos glóbulos é uma das características físico-químicas mais importantes para a avaliação da estabilidade das formulações e também para prever o curso da formulação *in vivo*, uma vez que a tendência à agregação dos glóbulos pode ser monitorada através de mudanças da distribuição de tamanho (TARR e YALKOWSKY, 1989; CHARMAN *et al.*, 1992). De acordo com Teixeira (2002), a adição de fármacos pode levar ao aumento do tamanho dos glóbulos. Desta forma, foram preparadas duas formulações na mesma concentração (correspondendo à concentração da formulação F18), sendo uma das formulações sem Ipriflavona e a outra com Ipriflavona. Como observado na tabela 7, houve aumento do tamanho dos glóbulos com a incorporação do fármaco. O aumento de tamanho, no entanto, não está relacionado com instabilidade da formulação já que a formulação contendo Ipriflavona foi estável por 10 meses e, portanto adequada para a administração por via oral.

TABELA 6 – Tamanho médio dos glóbulos de diferentes formulações de Ipriflavona (15 mg/ml)

Óleo	Composição		Tamanho Médio dos Glóbulos (nm)* ± DP ^a	Índice de Polidispersão ± DP	Identificação
	Surfactante	Co-surfactante			
70%	30%	--	337,0 ± 11,57	0,454 ± 0,034	F12
	25%	5%	341,9 ± 11,01	0,425 ± 0,029	F13
	20%	10%	245,1 ± 5,01	0,312 ± 0,093	F14
65%	30%	5%	422,5 ± 40,48	0,624 ± 0,063	F15
	25%	10%	335,0 ± 10,55	0,449 ± 0,027	F16
	30%	10%	351,6 ± 5,91	0,418 ± 0,075	F17
60%	25%	15%	533,3 ± 16,12	0,917 ± 0,031	F18
	20%	20%	520,2 ± 10,12	0,427 ± 0,039	F19

^aDP = Desvio Padrão (*n=3)

TABELA 7 – Tamanho médio dos glóbulos da autoemulsão vazia e contendo Ipriflavona (15 mg/ml)

	Tamanho Médio dos Glóbulos (nm)* ± DP	Índice de Polidispersão ± DP
Autoemulsão Vazia	232,7 ± 6,97	0,298 ± 0,083
Autoemulsão com Ipriflavona (15 mg/ml)	533,3 ± 16,12	0,917 ± 0,031

*DP = Desvio Padrão (*n=3)

5.1.5. Cinética de Liberação

A cinética de liberação *in vitro* da Ipriflavona veiculada na formulação F18 (60 % de óleo de milho, 25 % de capryol e 15 % de lecitina de soja) foi avaliada através da CLAE. Para isto, foi construída a curva de calibração da Ipriflavona em metanol, apresentada na figura 8. O coeficiente de correlação (R^2) obtido por esta técnica demonstrou que 99,8 % dos dados estão inseridos na curva, o que sugere uma correlação linear entre as concentrações de Ipriflavona e as áreas obtidas, permitindo a utilização desta curva na determinação da Ipriflavona liberada.

Os estudos de liberação *in vitro* de fármacos determinam a fração de fármaco liberada em função do tempo em meios artificiais ou fisiológicos. A caracterização do perfil de liberação em função do tempo pode fornecer informações quanto ao mecanismo envolvido no processo de liberação e fornecer indicações sobre o efeito das formulações sobre a disponibilidade do fármaco no TGI. No presente trabalho, o estudo da cinética de liberação foi realizado em solução salina tamponada (pH 6,8) para simular o fluido intestinal. A figura 9 mostra o perfil de liberação da Ipriflavona livre e veiculada no sistema autoemulsionável. A porcentagem de liberação *in vitro* da Ipriflavona veiculada na autoemulsão foi maior do que a porcentagem de liberação da Ipriflavona livre em todos os tempos, podendo a diferença ser observada já nos primeiros dez min. Após 24 h, a porcentagem liberada pelo sistema autoemulsionável atingiu 85% enquanto a Ipriflavona livre atingiu somente 59% de liberação. Através da determinação da área sob a curva para os resultados apresentados na figura 9 foi possível demonstrar que a veiculação da Ipriflavona no sistema autoemulsionável aumentou quase três vezes sua dissolução, em relação à Ipriflavona livre (tabela 8). Os resultados confirmam que a veiculação da Ipriflavona na autoemulsão aumenta a liberação deste fármaco em pH similar ao intestinal provavelmente devido ao aumento da área de contato entre as gotículas da emulsão e o meio externo o que aumenta a velocidade de dissolução.

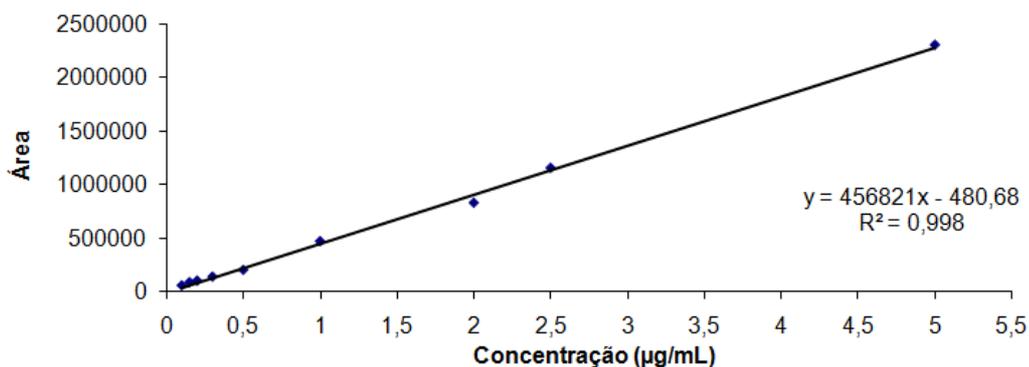


FIGURA 8 – Curva de calibração da Ipriflavona em metanol a 251nm. (R^2 = coeficiente de correlação; $n=3$)

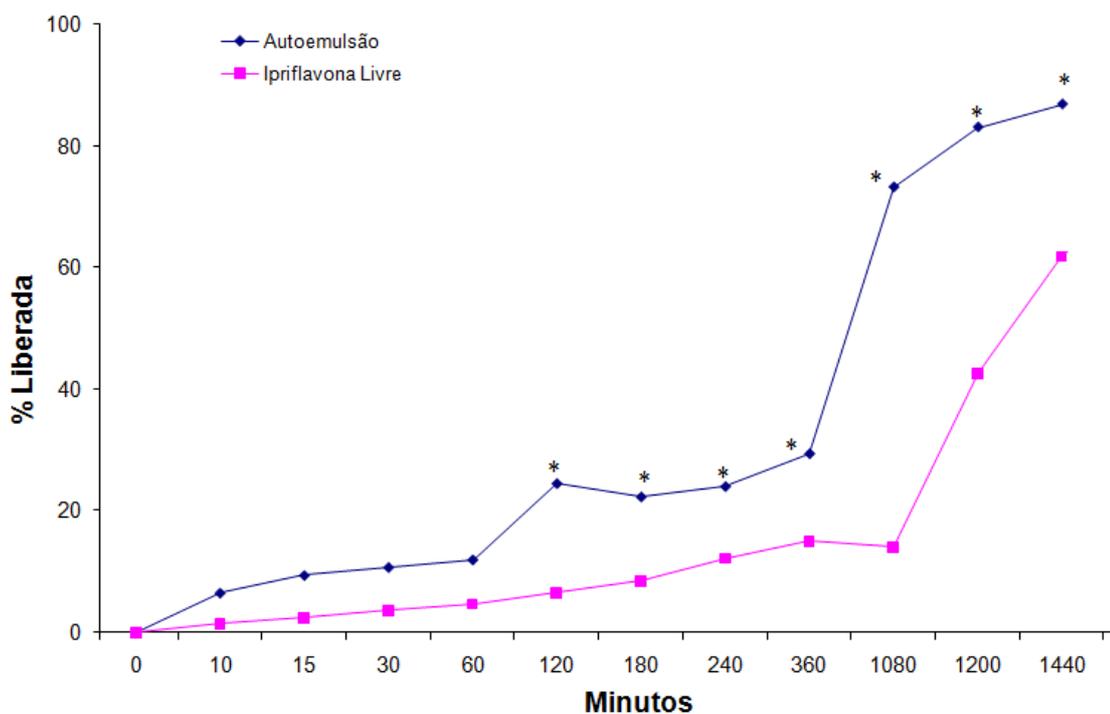


FIGURA 9 – Cinética de liberação in vitro da Ipriflavona livre e veiculada no sistema autoemulsionável a 37°C, em solução salina tamponada pH 6,8 ($n = 3$); $*p < 0,05$ – ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni; concentração da Ipriflavona no meio: 50 µg/ml.

TABELA 8 – Determinação da área sob a curva de liberação da Ipriflavona livre e veiculada no sistema autoemulsionável

	Área sob a curva (cm ²)	Varição (%)
Ipriflavona livre	76,98	--
Autoemulsão com Ipriflavona	230,77	299,78

5.1.6. Avaliação da Estabilidade

Durante a etapa de seleção da formulação foi observado que após 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente ocorreu precipitação de fármaco nas formulações desenvolvidas sem co-solvente, conforme demonstrado na figura 6, item 5.1.2. A formação de cristais não foi observada com a utilização de co-solventes (álcool benzílico e etílico), demonstrando que a presença do mesmo é essencial para a estabilidade da formulação. Sendo assim, a formulação F18 foi modificada e passou a ser constituída por: 60% de óleo de milho, 20% de capryol, 10% de lecitina de soja e 10% de álcool etílico.

Outro parâmetro avaliado foi o tamanho dos glóbulos formados a partir da diluição do sistema autoemulsionável em água (figura 10). Esta avaliação foi realizada a cada dois meses durante o período de dez meses para verificação da estabilidade da formulação, armazenada a temperatura ambiente. Como pode ser observado na figura 10, não houve variação significativa de tamanho durante o período avaliado. O pH da formulação também foi avaliado ao longo dos dez meses de armazenamento (figura 11). Foi observado que a formulação se manteve estável dentro do período de armazenamento, mostrando assim que não houve degradação do sistema.

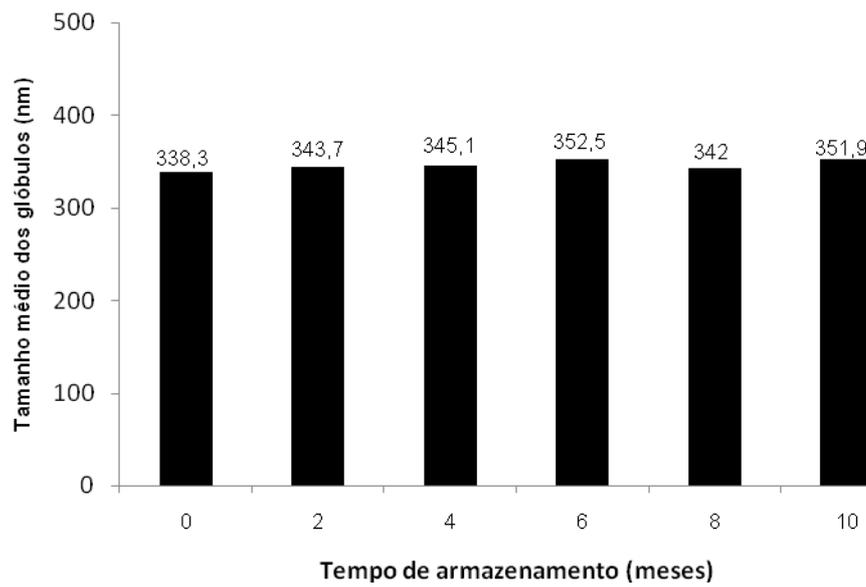


FIGURA 10 – *Tamanho médio dos glóbulos formados após armazenamento (n=3).*

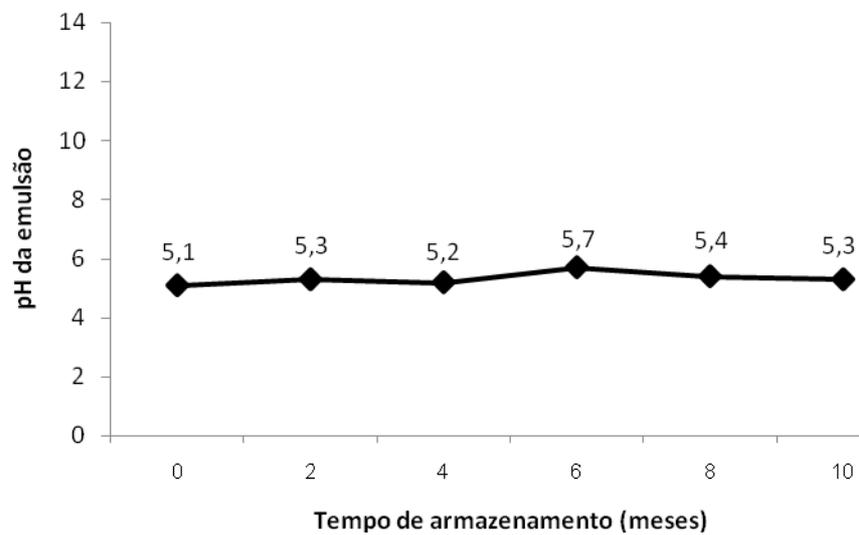


FIGURA 11 – *Avaliação do pH da formulação durante a estocagem (n=3).*

5.2. Avaliação dos efeitos cardiovasculares *in vivo* da Ipriflavona

5.2.1. Mortalidade

No presente trabalho, 190 animais foram submetidos ao procedimento de ligadura da coronária esquerda e deste total, 68 evoluíram para o óbito (35,8%). A mortalidade foi avaliada até que 12 animais de cada grupo resistissem por pelo menos 25 min após a ligadura da coronária. A mortalidade por grupo experimental está apresentada na tabela 9.

Os dados apresentados mostram que, apesar do modelo de ligadura da coronária ser o mais indicado para os estudos de isquemia do miocárdio, a mortalidade neste procedimento é elevada e não deve ser considerada como resultado do tratamento e sim da técnica propriamente dita.

TABELA 9 – Mortalidade por grupo experimental nos primeiros 25 min após oclusão da coronária (*Absoluto = n° de animais mortos/total de animais).

	Mortalidade	
	Absoluto*	%
Controle (Sham)	5/17	29,41
Sem Tratamento	7/19	36,84
Livre 30 mg/kg	7/14	50,00
Livre 1 g/kg	9/20	45,00
Agudo 30 mg/kg	8/20	40,00
Agudo 240 mg/kg	11/23	47,83
Sub-agudo 30 mg/kg	11/23	47,83
Sub-agudo 240 mg/kg	3/15	20,00

5.2.2. Análise do ECG

No presente trabalho, os parâmetros do ECG foram avaliados *in vivo* após a ligadura da coronária, caracterizando, pela primeira vez, este modelo especificamente em ratos fêmeas.

Os parâmetros: intervalo PR (figura 12), complexo QRS (figura 13), intervalo QT (figura 14) e o parâmetro QTc (figura 15) foram analisados no período controle e nos tempos 25 ou 30 min após a ligadura da coronária para cada grupo tratado ou não tratado com Ipriflavona, permitindo a análise da influência do tratamento sobre esses parâmetros. As

tabelas 15 a 18 (anexo) mostram os valores absolutos apresentados nas figuras 12 a 15. A análise nos primeiros minutos após a ligadura não foi realizada devido a alterações de morfologia que não permitiram a definição exata destes parâmetros. A análise de PAS, PAD e FC, assim como a análise da área sob a curva do segmento ST foram realizados em todos os tempos experimentais (controle, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a ligadura).

Para o intervalo PR do ECG (figura 12), que corresponde à despolarização inicial dos átrios e à condução do impulso através do nódulo atrioventricular, foi observado que os tratamentos com as diferentes doses e formulações de Ipriflavona não foram capazes de alterar os valores basais (período controle) em relação aos grupos não tratados. Após a ligadura, foi observado aumento significativo do intervalo PR no grupo submetido à oclusão da coronária, sem tratamento comparado ao grupo controle (cirurgia fictícia) e comparado ao período controle (antes da ligadura). Em relação aos animais tratados com Ipriflavona, o aumento no intervalo PR foi menor que o observado no grupo com ligadura e sem tratamento, mostrando que a Ipriflavona protegeu os animais deste aumento. Este menor aumento, no entanto, foi significativa apenas no grupo tratado com Ipriflavona na dose de 240 mg/kg por 7 dias, como observado na figura 12. Em relação ao período controle apenas o tratamento com dose única de 240 mg/kg de Ipriflavona apresentou aumento significativo do intervalo PR após a ligadura de coronária, indicando a influência da Ipriflavona neste parâmetro, em impedir o aumento, para a maioria das formulações e doses avaliadas.

Em relação ao complexo QRS do ECG (figura 13), que corresponde à despolarização dos ventrículos, os tratamentos com as diferentes doses e formulações de Ipriflavona também não foram capazes de alterar os valores basais em relação aos grupos não tratados. Após a ligadura, não foi observada diferença significativa entre o grupo controle (cirurgia fictícia) e os grupos submetidos à ligadura, tratados ou não com a Ipriflavona. Foi observado redução significativa deste parâmetro após a ligadura no grupo sem tratamento, em relação ao período controle do mesmo grupo, e no grupo tratado com 1 g/kg de Ipriflavona livre.

Para o intervalo QT (figura 14) do ECG, que representa o tempo necessário para a despolarização e repolarização dos ventrículos, não foram observadas diferenças no período controle entre os animais não tratados (controle e ligadura) e os animais tratados com as diferentes doses e formulações de Ipriflavona. A ligadura de coronária induziu ao aumento significativo do intervalo QT em relação ao período controle (24,7 %) nos animais não tratados com Ipriflavona. O aumento do intervalo QT induzido pela ligadura da coronária foi de 23,9 % em ratos fêmeas em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia) no tempo de

30 min, e esse aumento não foi observado para o tratamento com a maior dose de Ipriflavona na forma livre e de autoemulsão administrados em dose única e nem para os tratamentos subagudos com a autoemulsão nas duas doses avaliadas. O tratamento agudo com Ipriflavona livre na dose de 1 g/kg e com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável na dose de 240 mg/kg, assim como o tratamento subagudo na dose de 30 mg/kg foram capazes de inibir o prolongamento do intervalo QT. Ainda em relação ao período controle, foi observado aumento significativo do intervalo QT após a ligadura apenas para o grupo tratado com dose única de 30 mg/kg de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável.

O parâmetro QTc (figura 15), intervalo QT do ECG corrigido pela frequência cardíaca foi obtido segundo a fórmula de Fridericia (1920). O cálculo do QTc permite a comparação de grupos com frequência cardíaca diferentes. Assim como observado para o intervalo QT, não foi observada diferença nos valores basais (antes da ligadura) do QTc em relação aos grupos não tratados. Foi observado discreto aumento deste parâmetro nos animais submetidos à ligadura e sem tratamento, porém este aumento não foi significativo, devido à grande influência da bradicardia. Em relação ao período controle foi observado aumento significativo do QTc apenas para o grupo tratado com dose única de 30 mg/kg de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, mantendo o observado para o intervalo QT. Os animais tratados com Ipriflavona na dose única de 240 mg/kg e o tratamento subagudo na dose de 30 mg/kg apresentaram redução significativa do QTc, indicando sua potencial ação protetora.

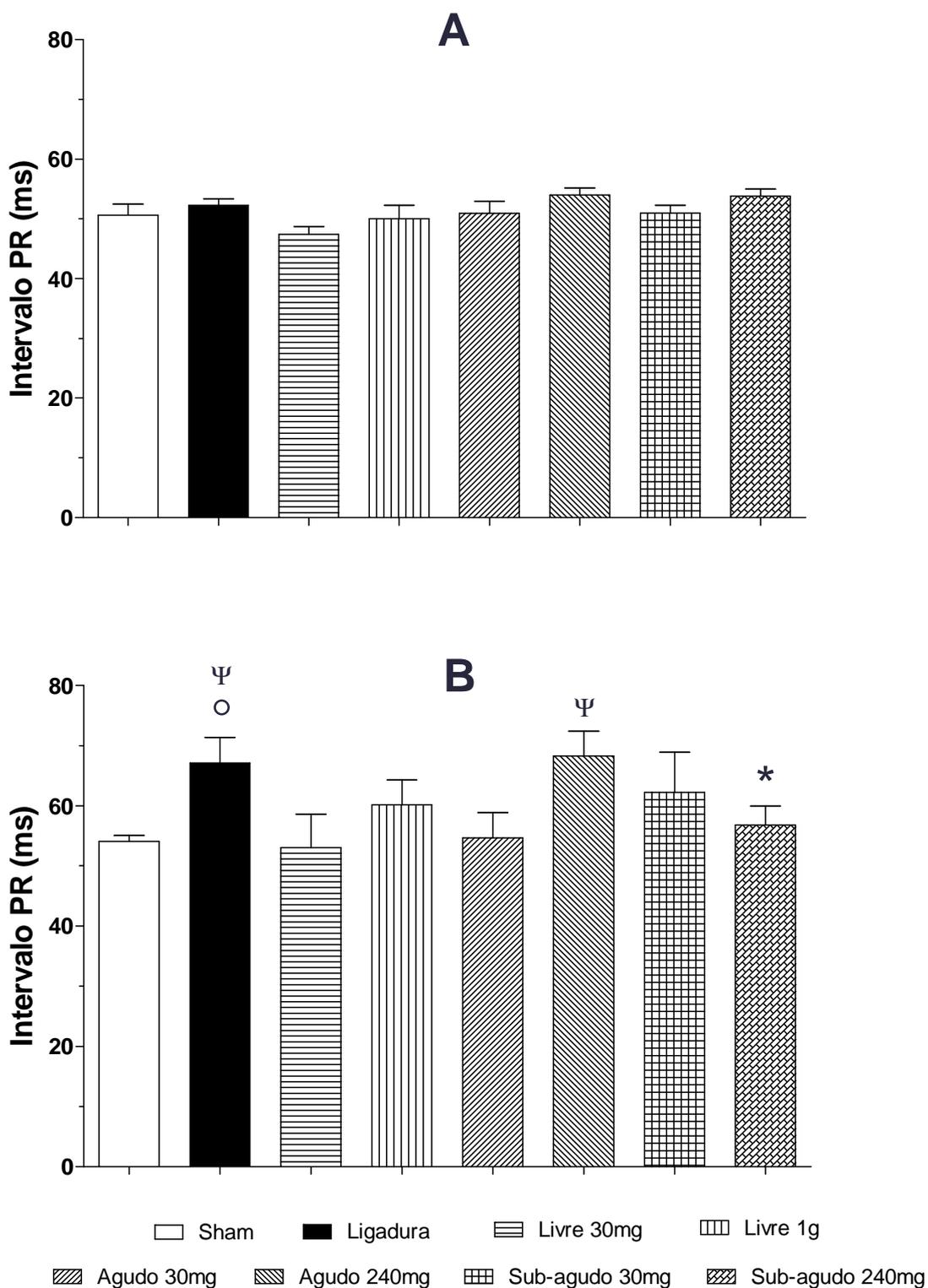


FIGURA 12 – Valores absolutos (média ± e.p.m.) do intervalo PR do ECG avaliado no período controle (A) e 30 min após a ligadura (B) para todos os grupos. Teste Mann-Whitney. $p < 0,05$: * = Em relação ao grupo submetido a ligadura sem tratamento no tempo 30 min; O = Em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia) no tempo 30 min; Ψ = Em relação ao período controle do mesmo grupo.

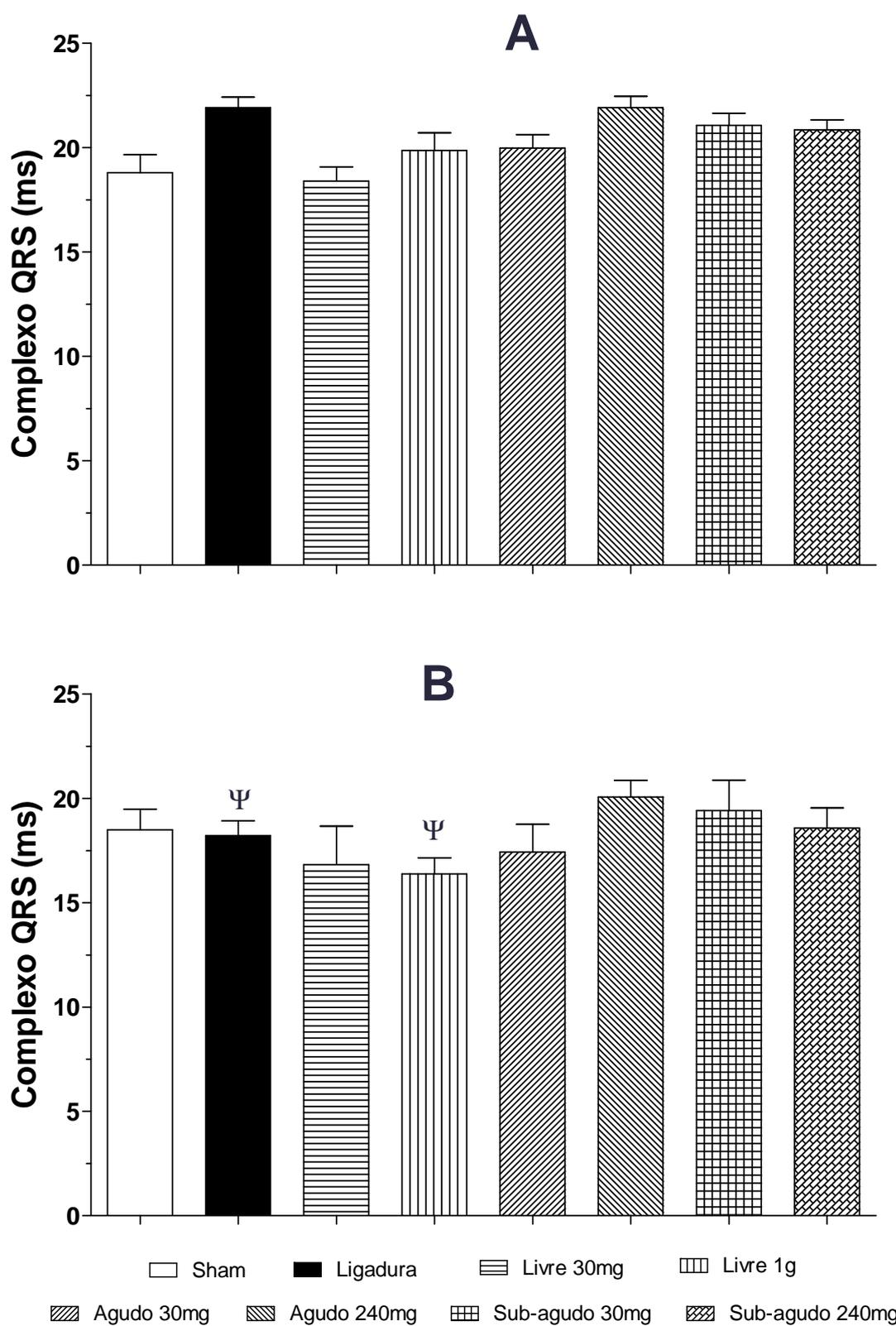


FIGURA 13 – Valores absolutos (média ± e.p.m.) do complexo QRS do ECG avaliado no período controle (A) e 30 min após a ligadura (B) para todos os grupos. Teste Mann-Whitney.: Ψ $p < 0,05$ em relação ao período controle do mesmo grupo.

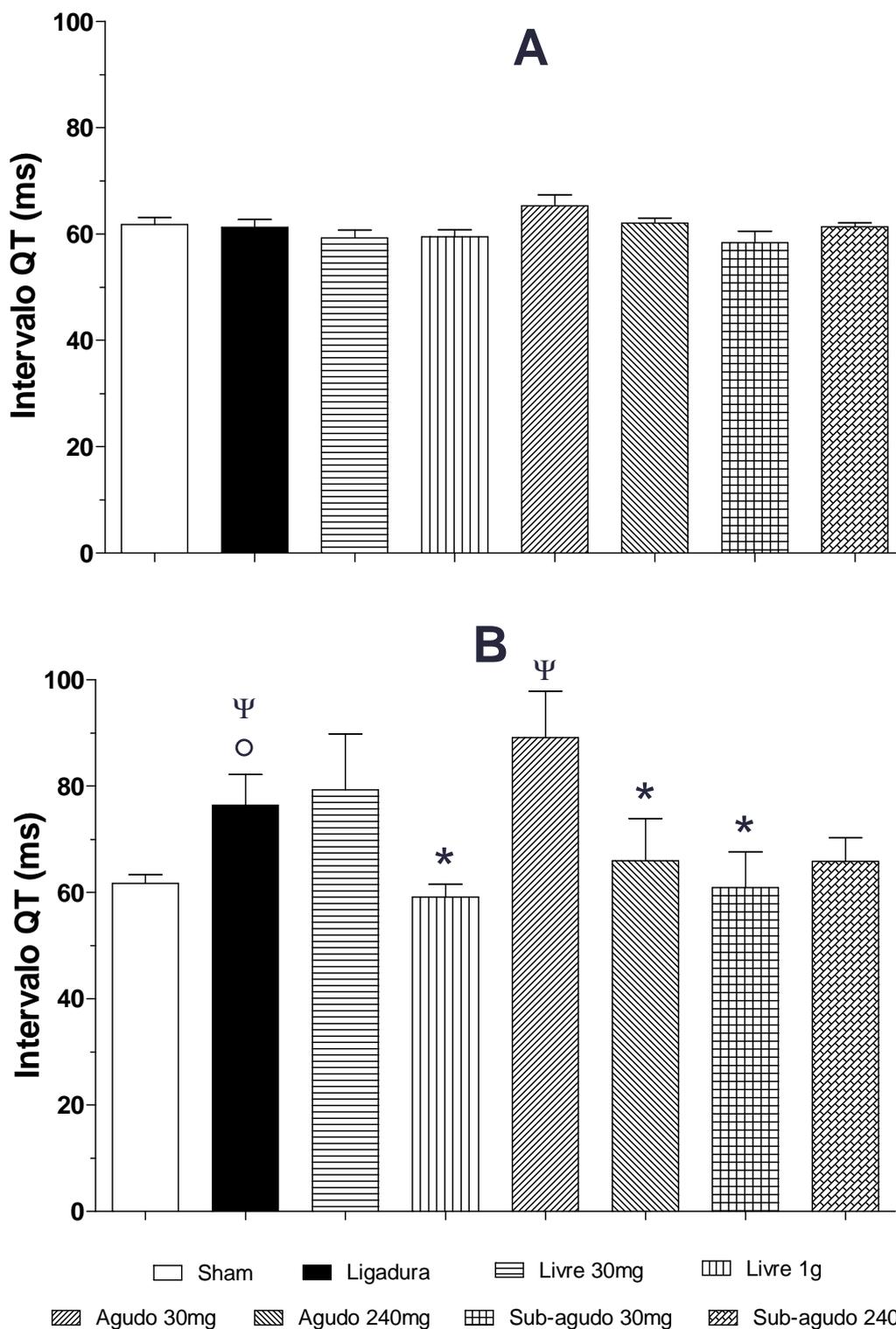


FIGURA 14 – Valores absolutos (média ± e.p.m.) do intervalo QT do ECG avaliado no período controle (A) e 30 min após a ligadura (B) para todos os grupos. Teste Mann-Whitney. $p < 0,05$: * = Em relação ao grupo submetido à ligadura sem tratamento no tempo 30 min; O = Em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia) no tempo 30 min; Ψ = Em relação ao período controle do mesmo grupo.

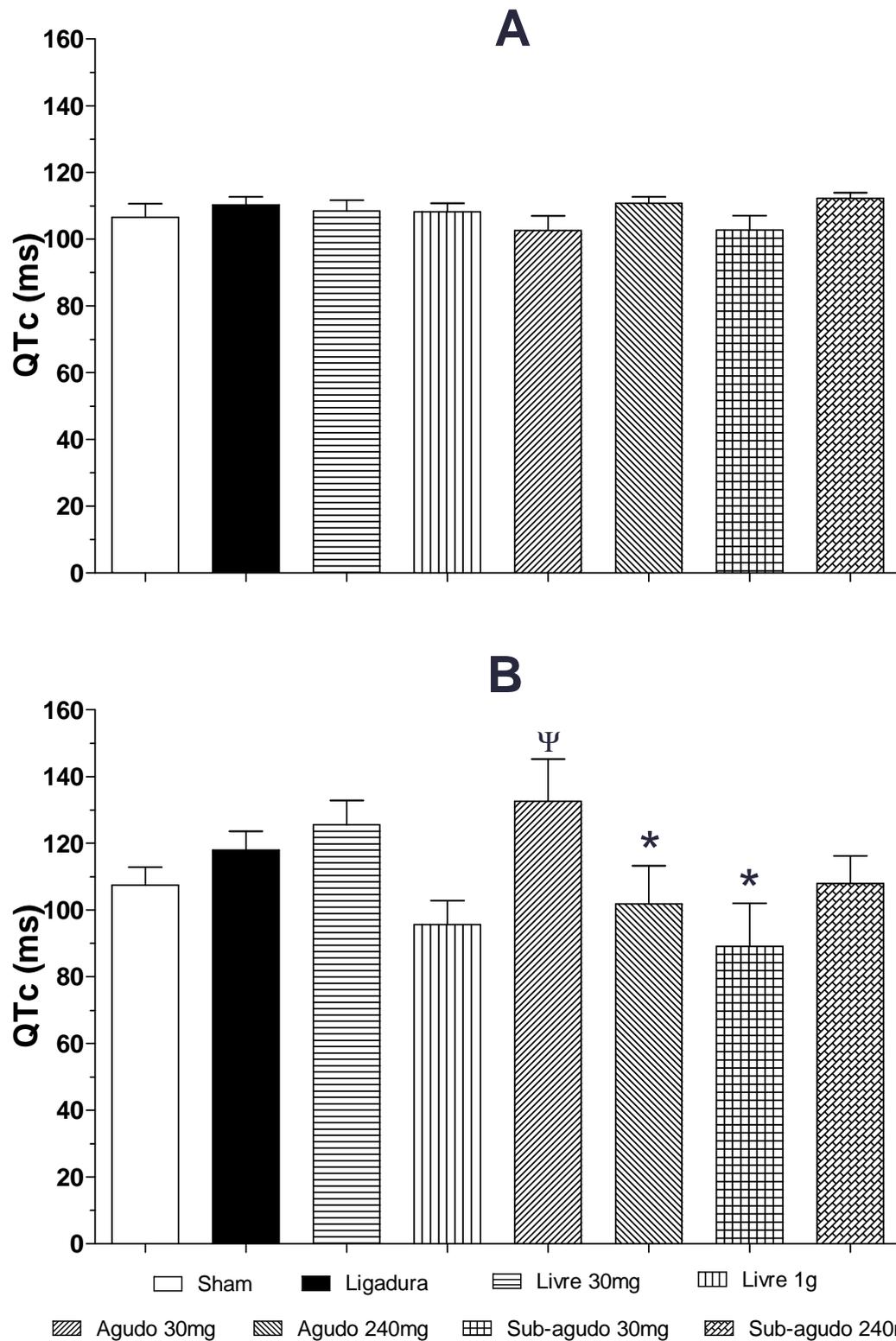


FIGURA 15 – Valores absolutos (média ± e.p.m.) do parâmetro QTc avaliado no período controle (A) e 30 min após a ligadura (B) para todos os grupos. Teste Mann-Whitney. $p < 0,05$: * = Em relação ao grupo submetido à ligadura sem tratamento no tempo 30 min; Ψ = Em relação ao período controle do mesmo grupo.

5.2.3. Avaliação da PA e FC

Os valores absolutos de PAS, PAD e FC estão apresentados nas figuras 16 a 18. O procedimento da ligadura da coronária induziu à redução significativa da PA, reduzindo de 14 % a 37 % para a PAS, e de 22 % a 43 % para a PAD acompanhada de bradicardia intensa (redução da ordem de 21 a 28 %) nos animais sem tratamento. Nos animais controle (submetidos à cirurgia fictícia) também foi observado redução da PA e FC, porém de menor intensidade, sugerindo que a redução na PA está relacionada também com a abertura da caixa torácica. Para o tratamento com as diferentes doses e formulações de Ipriflavona não foi observado, após a ligadura, diferenças significativas para a PA em relação aos grupos sem tratamento (ligadura e controle). Em relação à FC foi observado bradicardia intensa em relação ao grupo controle e tempo controle (antes da ligadura) em todo o tempo experimental, sendo significativo para o grupo tratado com dose única de 30 mg/kg de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável. Os valores mínimos alcançados para PAS e PAD em todos os grupos não atingiram níveis incompatíveis com a vida nos animais que resistiram aos 30 min de experimento. No entanto, a redução da PA provavelmente contribuiu para a mortalidade dos animais que não sobreviveram ao tempo experimental total.

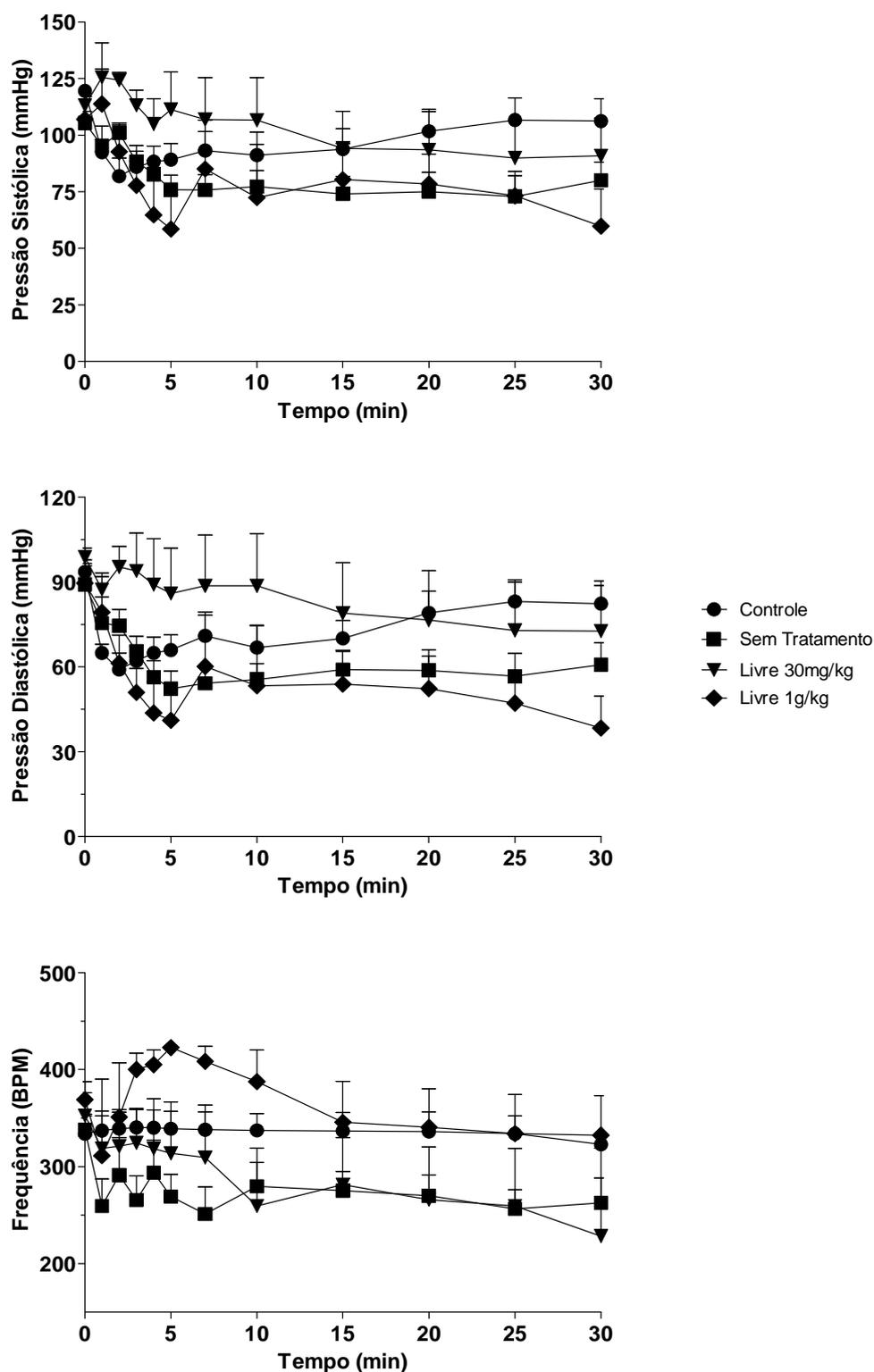


FIGURA 16 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) para PAS, PAD e FC dos animais tratados com dose única de Ipriflavona livre e submetidos à ligadura da coronária. ANOVA seguido do teste Bonferroni.

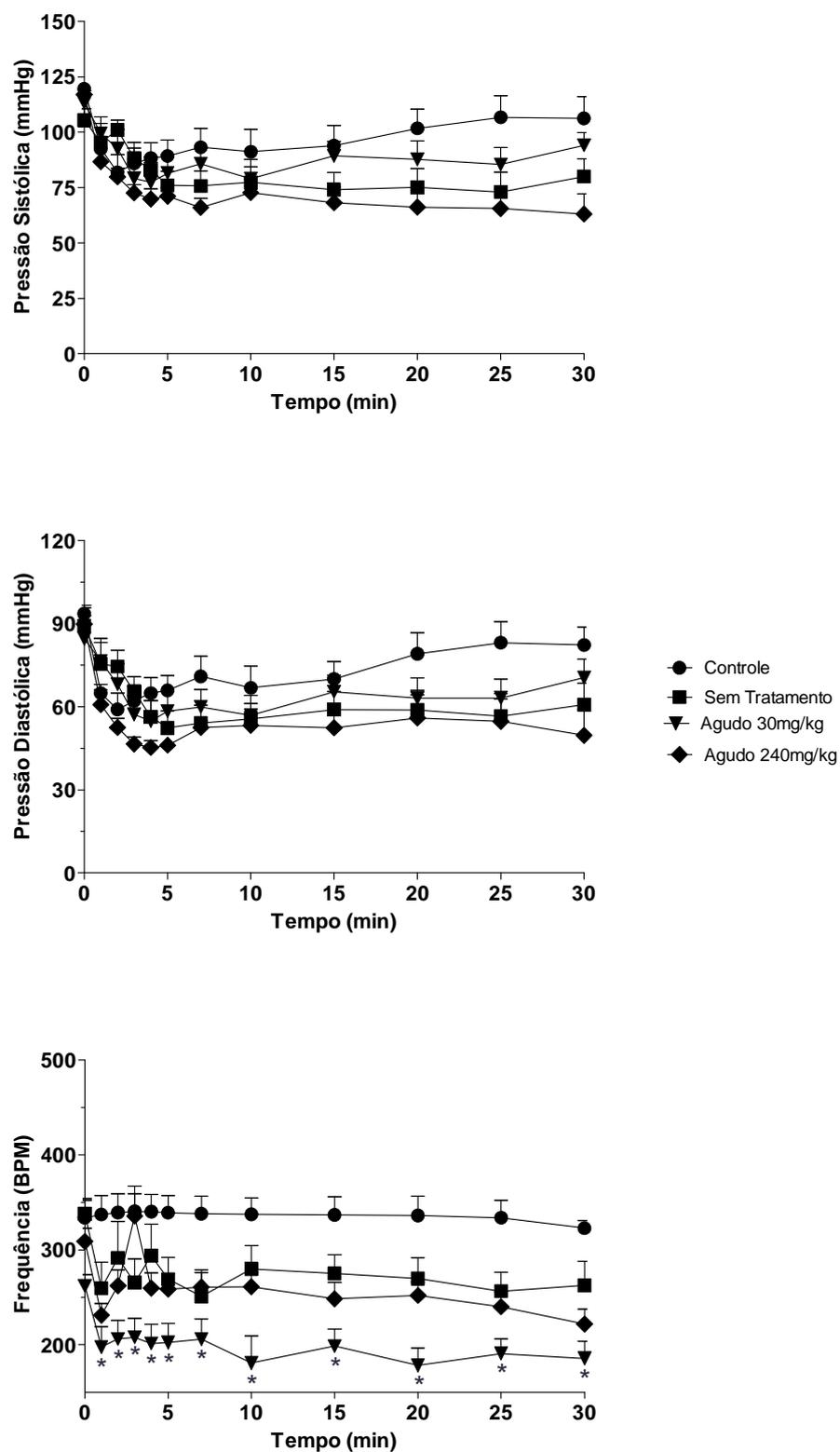


FIGURA 17 – Valores absolutos de PAS, PAD e FC dos animais tratados com dose única de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável e submetidos à ligadura da coronária. ANOVA seguido do teste Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

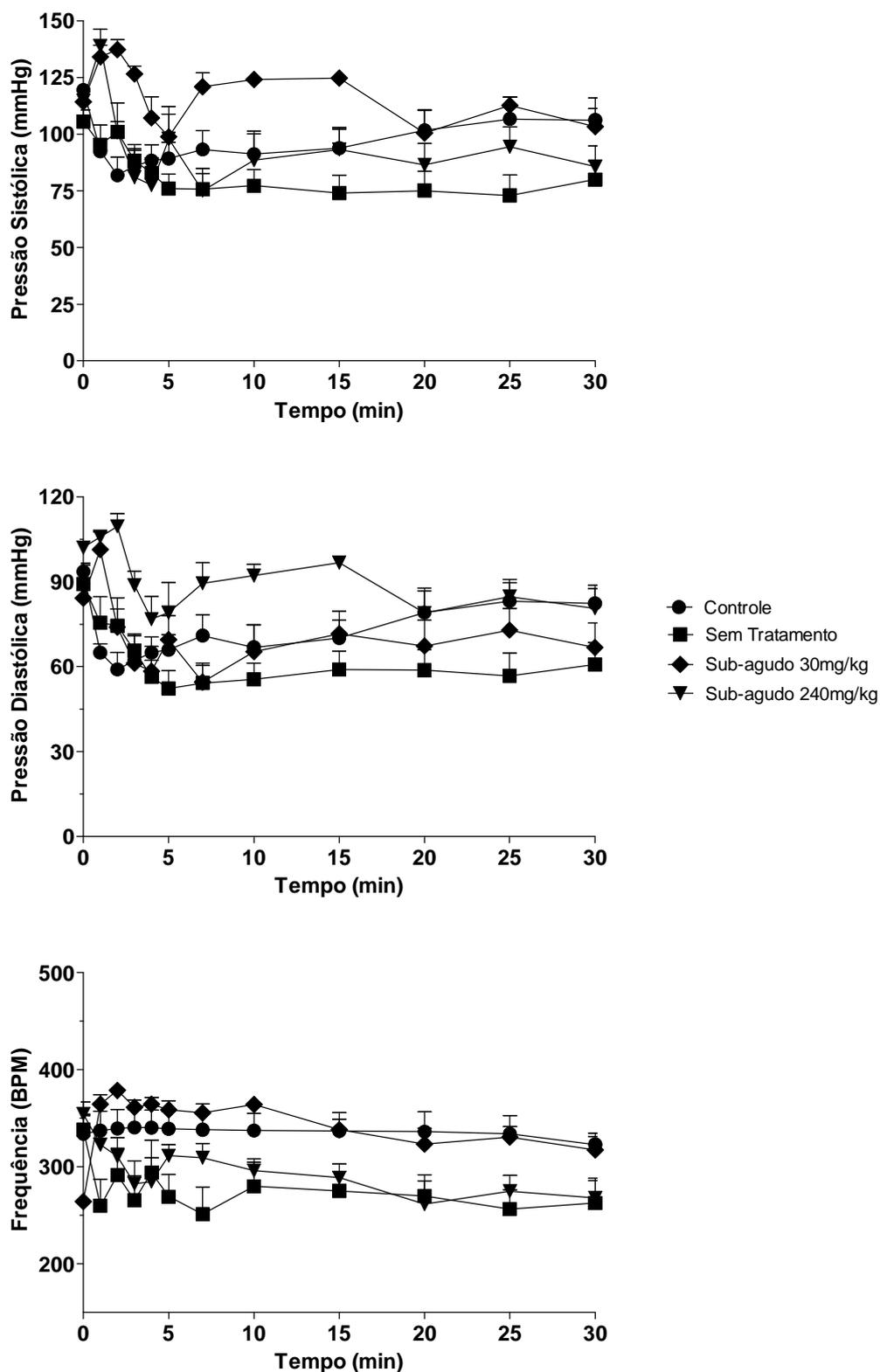


FIGURA 18 – Valores absolutos de PAS, PAD e FC dos animais tratados com doses repetidas de Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável e submetidos à ligadura da coronária. ANOVA seguido do teste Bonferroni.

5.2.4. Área sob a curva do segmento ST

A ligadura da coronária induziu ao aumento significativo da área sob o segmento ST do ECG nos animais sem tratamento, como observado na figura 19. O tratamento com a Ipriflavona independente da dose, tempo de tratamento e formulação foi capaz de impedir o aumento do segmento ST quando comparados aos animais submetidos à ligadura da coronária e sem tratamento, embora não tenham impedido completamente esta alteração. Não foi observada relação de dose-dependência para as formulações de Ipriflavona estudadas.

A redução máxima obtida com a Ipriflavona livre (1 g/kg) foi de 79,01 % em relação ao grupo submetido à ligadura sem tratamento, observada 7 min após a ligadura da coronária. Na dose 30 mg/kg (Ipriflavona livre) a redução máxima foi de 69,67 % observada 15 min após a ligadura da coronária. Para a Ipriflavona veiculada na autoemulsão administrada na dose de 30 mg/kg por 7 dias (sub-agudo), foi observada redução máxima (73,4 %) 7 min após a ligadura da coronária em relação ao grupo submetido à ligadura sem tratamento e, na dose de 240 mg/kg a redução máxima foi de 78,77 % observada também 7 min após a ligadura da coronária. É importante observar que para a Ipriflavona livre a redução foi significativa a partir de 15 min, para a dose de 30 mg/kg e a partir de 7 min, para a dose de 1 g/kg enquanto no sistema autoemulsionável pôde ser observada redução significativa já a partir dos primeiros min após a ligadura da coronária. No tempo 30 min após a ligadura da coronária (figura 20), o tratamento agudo com Ipriflavona livre na dose de 1 g/kg e Ipriflavona autoemulsionável nas doses 30 mg/kg e 240 mg/kg, assim como o tratamento subagudo com Ipriflavona autoemulsionável nas doses 30 mg/kg e 240mg/kg foram capazes de proteger os animais da elevação do segmento ST de maneira significativa.

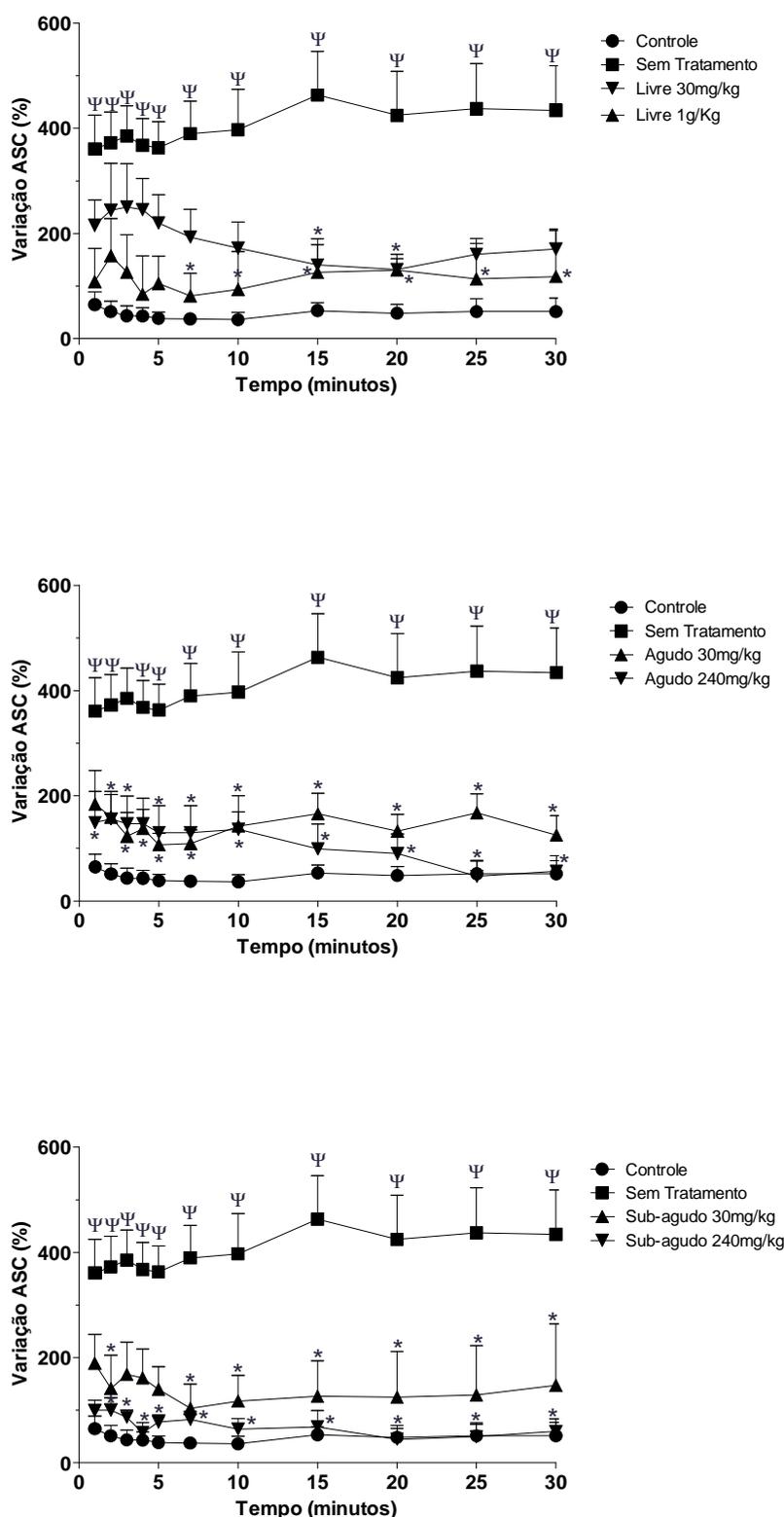


FIGURA 19 – Variação percentual da área sob a curva do segmento ST após administração de Ipriflavona nas diferentes doses e formulações. ANOVA seguido do teste Bonferroni. $p < 0,05$: * = Em relação ao grupo submetido à ligadura, sem tratamento. Ψ = Em relação ao grupo controle (cirurgia fictícia).

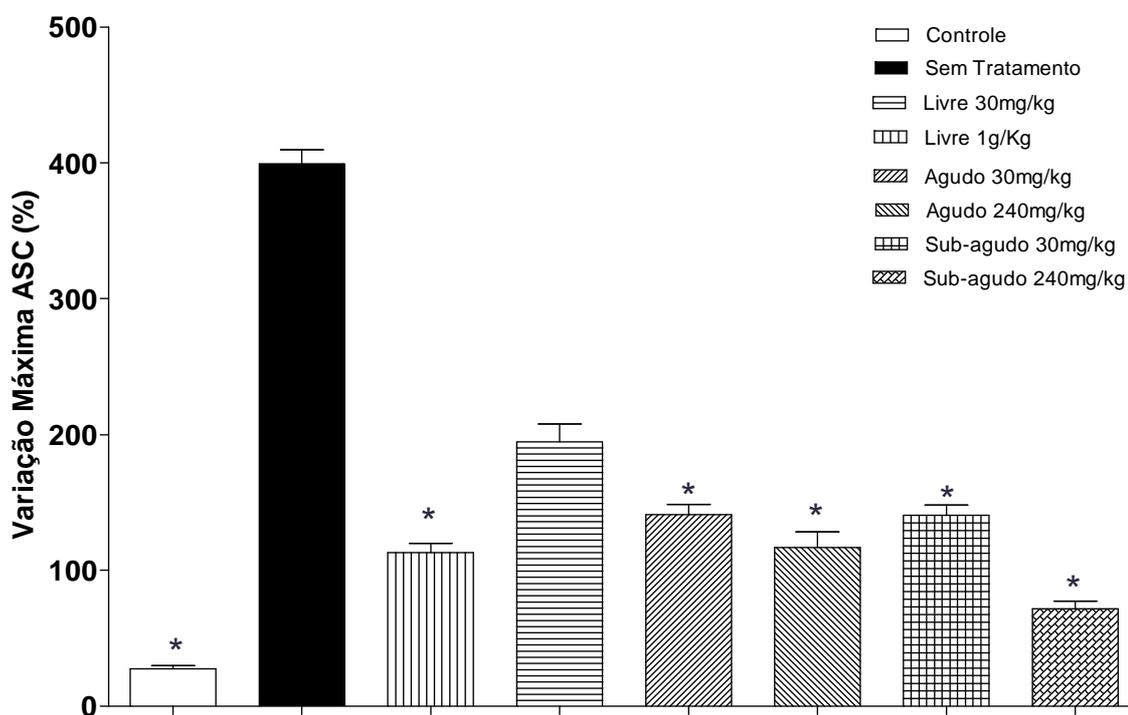


FIGURA 20 – Variação percentual da área sob a curva do segmento ST aos 30 min após a ligadura nos animais submetidos a diferentes tratamentos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo ligadura sem tratamento – ANOVA seguido do teste Bonferroni.

5.2.5. Morfologia do ECG

Em relação à análise da morfologia do ECG foram observadas alterações em todos os animais submetidos à ligadura da coronária sem tratamento. As figuras 21 a 23 apresentam segmentos de registros de ECG representativos de todos os grupos experimentais, antes e após a ligadura de coronária. As alterações observadas foram: inversão ou supradesnivelamento da onda T, onda Q patológica, taquicardia ventricular, fibrilação atrial, ondas P anormais e bradicardia. Estas alterações foram observadas com grande variabilidade em relação à frequência de ocorrência e tipo de alteração, ou seja, alguns animais apresentaram apenas um tipo de alteração em apenas alguns intervalos de tempo enquanto outros animais apresentaram dois ou mais tipos de alterações em praticamente todo o tempo de experimentação. A alteração do segmento ST e onda T (tabela 10) foi observada em 10 dos 12 animais submetidos à ligadura sem tratamento e, para a maioria em todo o tempo experimental. Para

os animais submetidos à cirurgia fictícia também foi observado alteração da onda T, porém de baixa intensidade, somente em 1 de 7 animais, sem ser acompanhado de outras alterações como para o grupo submetido à ligadura.

Após a ligadura foi observado com grande frequência nos animais não tratados a ocorrência de taquicardia ventricular, definida como quatro ou mais contrações ventriculares prematuras de acordo com as convenções de Lambeth (ver WALKER *et al.*, 1988) para a determinação de arritmias experimentais. No entanto, os episódios de taquicardia ventricular observados foram reversíveis, não levando ao óbito, nos animais que tiveram o tempo experimental de 30 min completados.

Nos animais tratados com Ipriflavona somente foram observados episódios de arritmias durante a execução da ligadura. No tempo decorrido entre o término do procedimento de ligadura até o final de 30 min não foi observado ocorrência de arritmias. A presença de onda Q patológica, indicativa de isquemia do miocárdio, foi observada tanto nos animais sem tratamento como nos animais tratados com Ipriflavona. Já nos animais controle (submetidos à cirurgia fictícia) não foi observada presença de onda Q patológica.

Tabela 10 – Incidência das alterações morfológicas observadas no segmento ST para cada grupo experimental

Grupos	TOTAL	
	Supradesnivelamento	Infra-desnivelamento
Controle	1/7	
Ligadura sem tratamento	8/12	2/12
Livre 30mg/kg	5/7	
Livre 1g/kg	6/7	
Agudo 30mg/kg	5/12	4/12
Agudo 240mg/kg	5/12	2/12
Subagudo 30mg/kg	5/11	3/11
Subagudo 240mg/kg	3/12	3/12

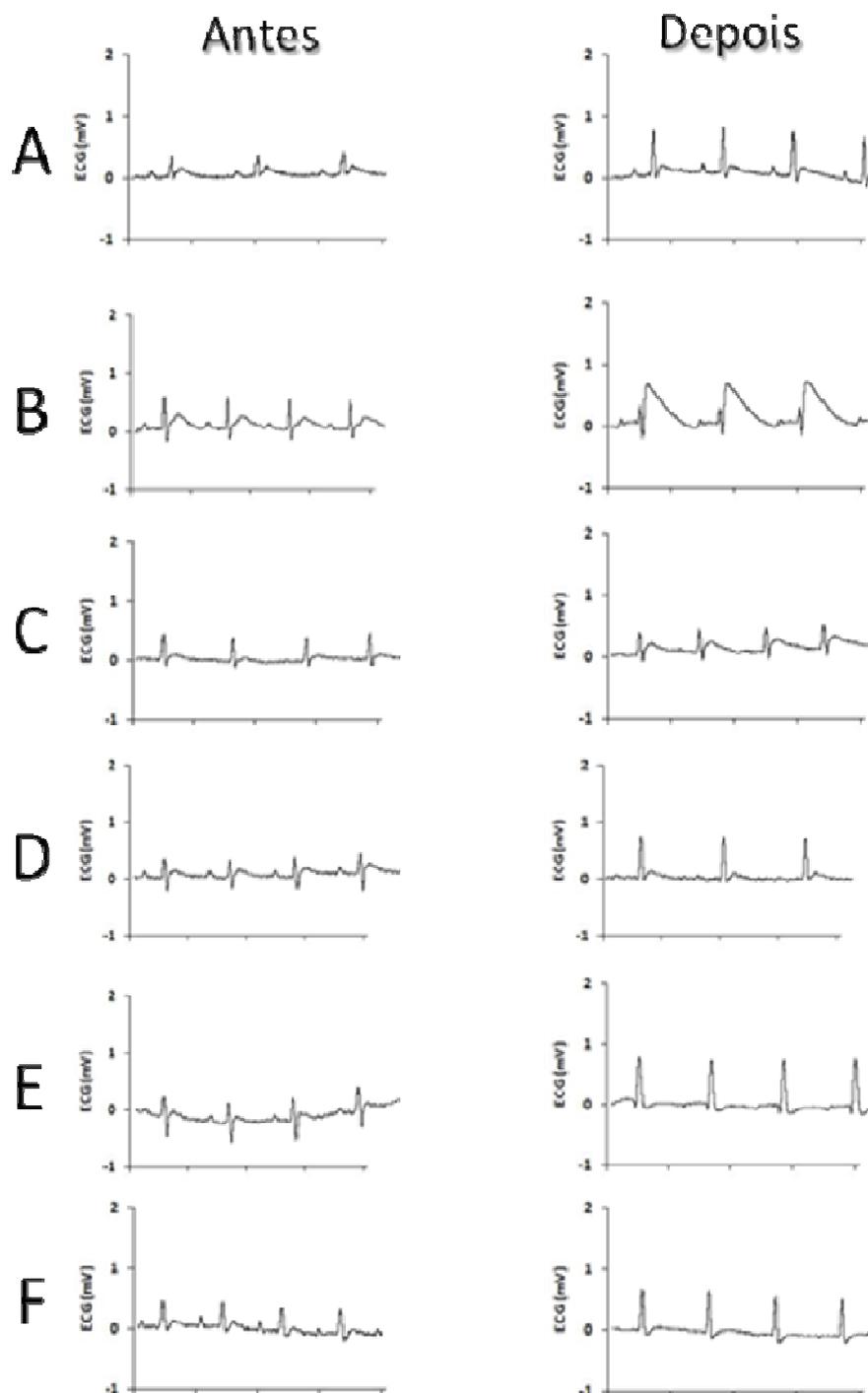


FIGURA 21 – Registro representativo dos ECGs obtidos antes e 5 min após a ligadura da coronária. (A) Animal controle (submetido à cirurgia fictícia); (B) Animal sem tratamento; Tratados com Ipriflavona: (C) Agudo 30 mg/kg, (D) Agudo 240 mg/kg, (E) Sub-agudo 30 mg/kg, (F) Sub-agudo 240 mg/kg.

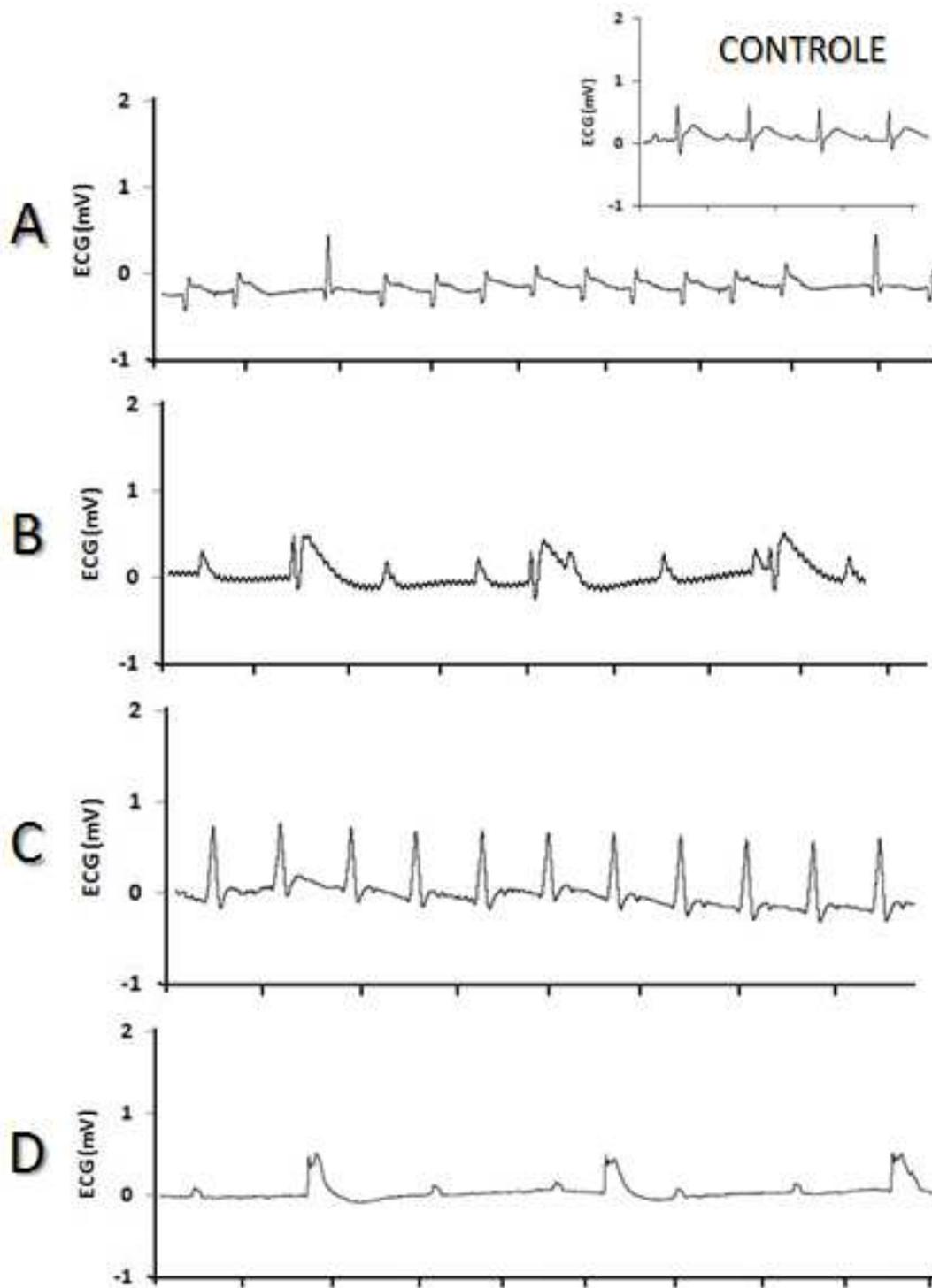


FIGURA 22 – Exemplos de arritmias observadas nos animais sem tratamento, após a ligadura da coronária: (A) e (B) Fibrilação atrial, (C) Taquicardia ventricular, (D) Bradicardia com ondas P anormais. Canto superior direito: ECG normal, sem arritmias.

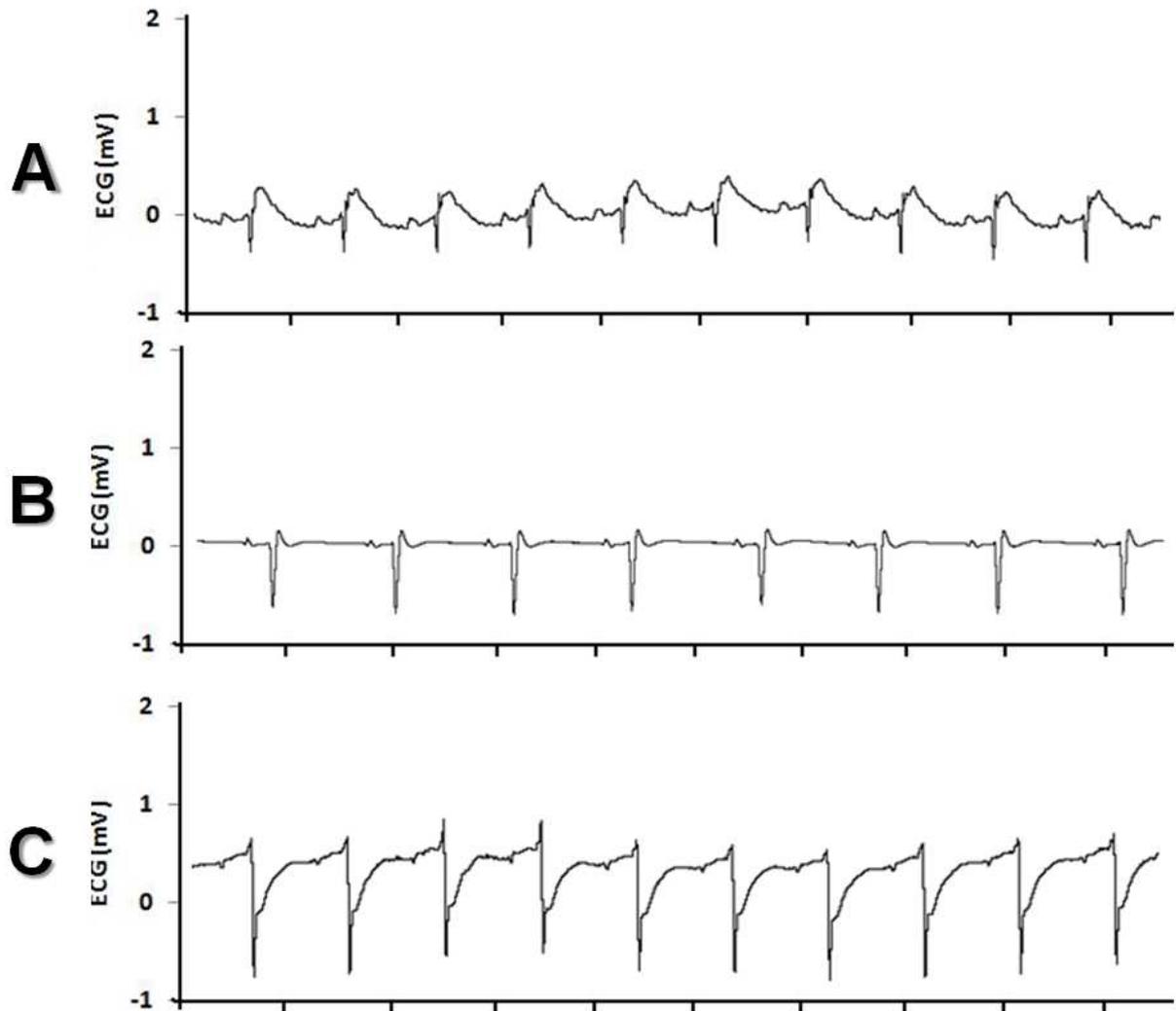


FIGURA 23 – Exemplos de arritmias observadas nos animais sem tratamento e tratados com Ipriflavona: (A) Supradesnivelamento de onda T; (B) Onda Q patológica (C) Infra-desnivelamento do segmento ST.

5.2.6. Determinação da concentração plasmática de Ipriflavona

Para agregar confiabilidade aos resultados de quantificação da Ipriflavona em amostras plasmáticas é necessário realizar a validação do método bioanalítico. Para a avaliação da linearidade, foi necessária a construção da curva de calibração a partir da análise de 8 concentrações conhecidas de padrão de Ipriflavona (SIGMA, USA) adicionadas na mesma matriz biológica (plasma) para a qual o método foi desenvolvido e aplicado. O coeficiente de correlação (R^2) apresentado na figura 24 demonstra que 99,79% dos dados estão inseridos na curva, o que sugere uma correlação linear entre as concentrações de Ipriflavona e as áreas obtidas.

Os critérios para aceitação da curva de calibração seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais. De acordo com as normas atualmente em vigor (US-FDA (2001), ANVISA (2003)) é aceitável coeficiente de variação menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações. Além disso, o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98. Conforme apresentado na tabela 11, não foram encontrados coeficientes de variação maiores que 20%. Estes resultados possibilitam a utilização desta curva de calibração na determinação da concentração plasmática da Ipriflavona por esta metodologia.

A pureza da matéria-prima utilizada nos experimentos *in vivo* (Ipriflavona GALENA, BRASIL) foi determinada em CLAE após a validação do método acima. Conforme apresentado na tabela 12, a pureza da Ipriflavona foi de 75,47%. Desta maneira, as doses teóricas de Ipriflavona 30 mg/kg, 240 mg/kg e 1 g/kg administradas para os animais em todos os experimentos *in vivo* foram de fato iguais a 22,7 mg/kg, 181,13 mg/kg e 754,7 mg/kg, respectivamente.

De acordo com a tabela 13 foi observado diferença significativa na concentração plasmática de Ipriflavona livre em relação à Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável. Apesar de terem sido veiculadas diferentes doses de Ipriflavona no sistema autoemulsionável em diferentes protocolos (agudo e subagudo) não foi observada diferença significativa na concentração plasmática da Ipriflavona neste sistema.

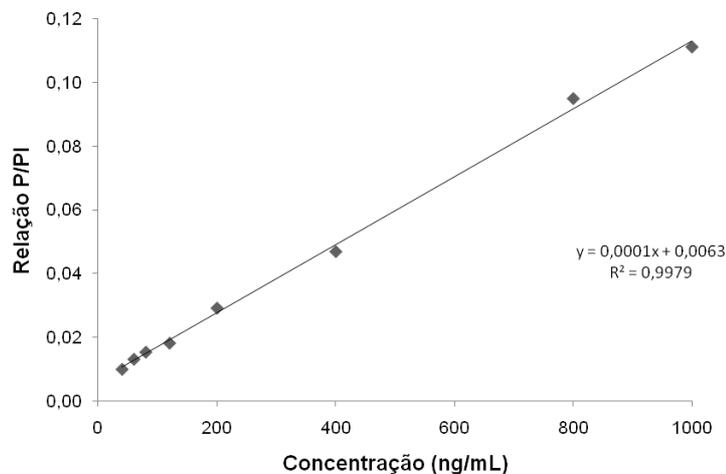


FIGURA 24 – Curva de Calibração obtida a partir da relação P/PI

TABELA 11 – Valores médios de área obtidos a partir dos cromatogramas para avaliação da linearidade da Ipriflavona em plasma de ratos ($n = 6$; P = Padrão; PI = Padrão Interno)

Concentração (ng/ml)	Área P	Área PI	P/PI	Conc. Real (ng/ml)	Exatidão	Precisão
40	116960	11718009	0,0100	36,81	92,02	-7,97
60	148519	11292421	0,0132	68,52	114,20	14,20
80	170249	11073544	0,0154	90,74	113,42	13,42
120	198142	10885397	0,0182	119,02	99,18	-0,81
200	330146	11298852	0,0292	229,19	114,59	14,59
400	511561	10889502	0,0470	406,77	101,69	1,69
800	983609	10346086	0,0951	887,70	110,96	10,96
1000	1341633	12057147	0,1113	1049,72	104,97	4,97

TABELA 12 – Determinação da pureza da Ipriflavona (matéria-prima) em relação ao padrão de Ipriflavona (SIGMA, USA)

Ipriflavona	Área Cromatograma	Pureza (%)
Padrão Sigma, USA	194.457	97,00*
Matéria-prima Galena, Brasil	151.291	75,47

* Pureza informada pelo fabricante

TABELA 13 – Determinação da concentração plasmática da Ipriflavona em diferentes grupos (n = 7)

	Área P	Área PI	P/PI	Concentração plasmática (ng/ml)
Livre 30mg/kg	137565	14066856	0,009779	39,566
Agudo 30mg/kg	349465	13955409	0,025042	188,688
Sub-agudo 30mg/kg	222208	8133585	0,02732	204,061
Agudo 240mg/kg	362879	11709933	0,030989	246,385
Sub-agudo 240mg/kg	79445	2314026	0,034332	290,064

5.2.7. Avaliação histopatológica cardíaca

As alterações histopatológicas observadas nos corações submetidos à ligadura de coronária independente do tratamento utilizado foram: degeneração hialina, edema, sinais de inflamação e congestão (figura 26). Estas alterações não são suficientes para caracterizar a ocorrência de infarto, porém, as mesmas poderiam evoluir para necrose e assim caracterizar o quadro histológico de infarto agudo do miocárdio. Supõe-se que as observações histológicas não foram conclusivas devido ao curto período de oclusão da coronária. Foram observadas alterações em diferentes graus de intensidade tanto nos corações dos animais submetidos à ligadura da coronária, sem tratamento, como nos animais tratados com Ipriflavona, seja na forma livre, seja veiculada no sistema autoemulsionável. Para fins de agrupamento o grau de alterações foi classificado em discreto, moderado ou intenso, de acordo com a intensidade das mesmas (tabela 14). A administração de dose única de Ipriflavona (240 mg/kg) promoveu discreta diminuição nas alterações observadas indicando que a Ipriflavona possui ação cardioprotetora (figura 25).

Além do coração, foram também analisados o fígado e os rins dos animais a fim de se verificar sinais de toxicidade da formulação ou da Ipriflavona nos diferentes esquemas de tratamento. Nos animais sem tratamento não foram observadas alterações histopatológicas hepáticas ou renais, enquanto nos animais tratados com Ipriflavona foram observados: sinais de inflamação, congestão hepática e renal e degeneração, sendo que a intensidade destas alterações foi diretamente proporcional à dose de fármaco administrada, principalmente no fígado, sugerindo que uma dose maior de Ipriflavona pode levar a alterações hepáticas mais acentuadas. Em um dos animais tratados com 240 mg/kg de Ipriflavona foram observados sinais de esteatose hepática (acúmulo anormal de lipídeos nos hepatócitos). Este tipo de alteração poderia estar relacionado com a formulação propriamente dita, por se tratar de um veículo oleoso. Para descartar esta hipótese foi realizada a avaliação histopatológica do fígado e rins de animais tratados com a formulação vazia. No entanto, não foram observadas alterações hepáticas ou renais nos animais tratados com a formulação sem Ipriflavona. A intensidade das alterações para as doses avaliadas foi considerada reversível e portanto, não é um impedimento para a utilização da Ipriflavona.

TABELA 14 – Percentual de animais que apresentaram as alterações histopatológicas cardíacas classificadas de acordo com a intensidade.

	Alterações cardíacas (%)			
	Normal	Discreto	Moderado	Intenso
Controle	100,00	0,00	0,00	0,00
Sem tratamento	0,00	25,00	37,50	37,50
Ipriflavona livre 30mg/kg	25,00	25,00	25,00	25,00
Autoemulsão agudo 30mg/kg	12,50	12,50	37,50	37,50
Autoemulsão crônico 30mg/kg	0,00	37,50	25,00	37,50
Autoemulsão agudo 240mg/kg	50,00	25,00	0,00	25,00
Autoemulsão crônico 240mg/kg	0,00	40,00	20,00	40,00
Formulação vazia	0,00	42,86	42,86	14,29

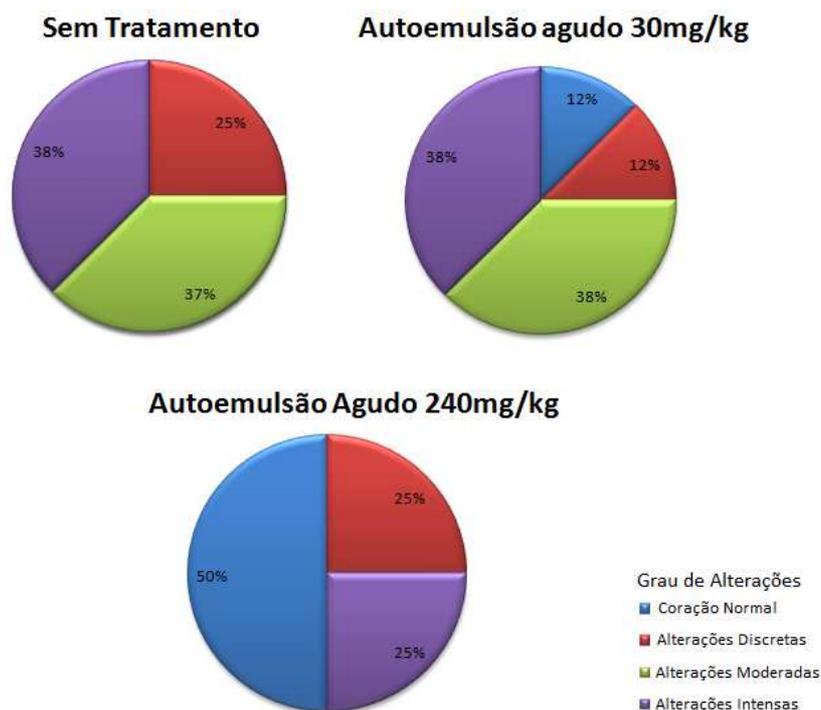


FIGURA 25 – Percentual de alterações cardíacas observadas, em diferentes graus nos animais sem tratamento e nos animais submetidos ao tratamento agudo.

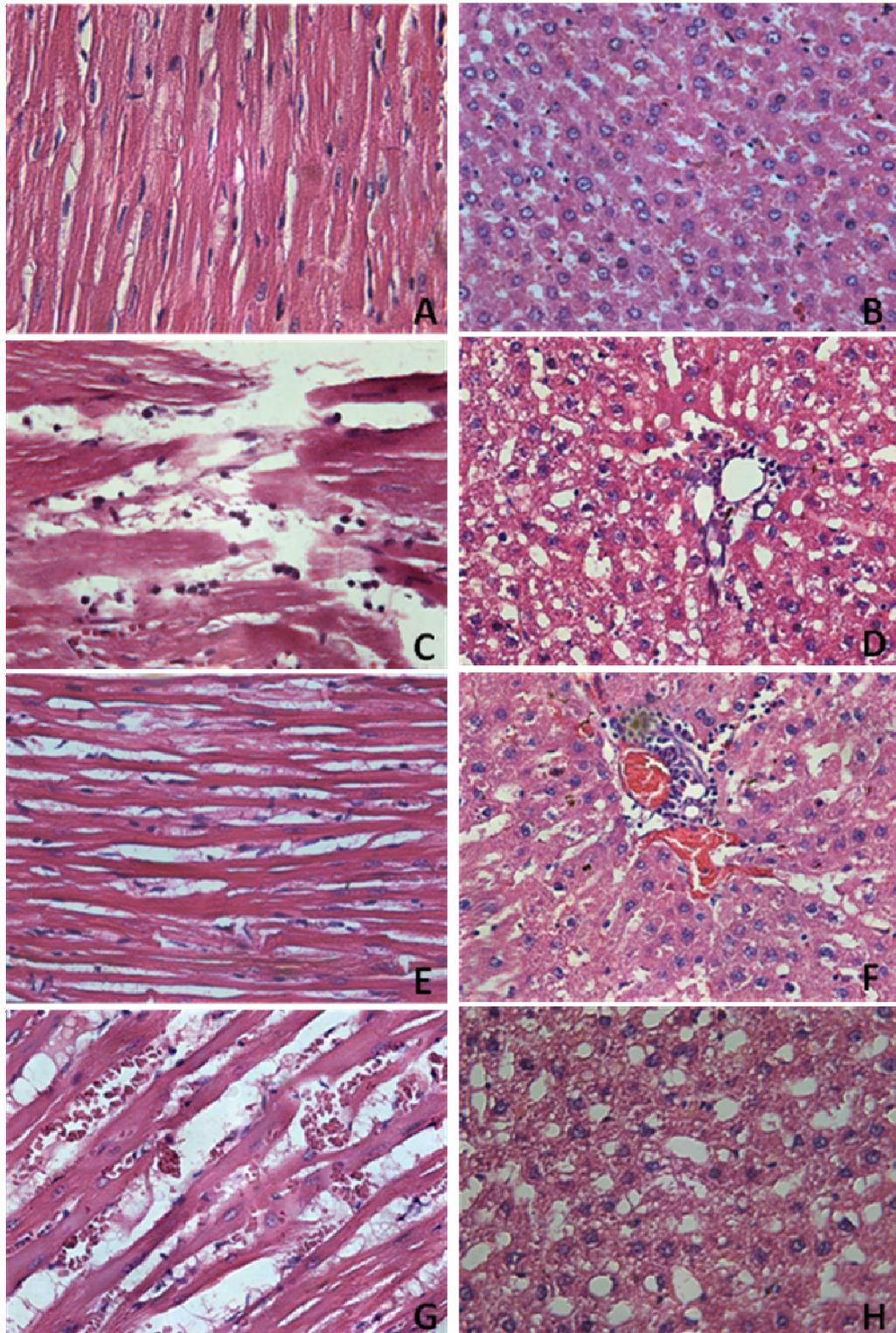


FIGURA 26 – *Aspecto histológico de (A) coração e (B) fígado de animal representativo do grupo controle. (C) coração e (D) fígado de animal representativo do grupo submetido a ligadura de coronária e sem tratamento. (E e G) corações e (F e H) fígados de animais submetidos a ligadura de coronária tratados com Ipriflavona. Hematoxilina-Eosina, 600X.*

6. DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do sistema autoemulsionável

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema autoemulsionável contendo os excipientes mais propícios para aumentar a solubilidade da Ipriflavona e dessa forma, contornar o inconveniente da baixa solubilidade deste fármaco. A solubilidade de fármacos envolve ligações de hidrogênio e interações do tipo dipolo entre as moléculas do fármaco e da água (FLORENCE e ATWOOD, 2003). De acordo com Narang e colaboradores (2007), os fármacos hidrofóbicos possuem baixa solubilidade porque as interações do tipo dipolo são fracas. As interações soluto-solvente podem ser modificadas para aumentar a solubilidade do fármaco. O pH, por exemplo, pode ser ajustado com tampões para aumentar a ionização de um fármaco com características de ácido fraco ou de base fraca, aumentando assim a interação íon-dipolo entre soluto e solvente. Outra modificação possível é a adição de co-solventes, a qual promove redução da constante dielétrica da água e facilita as interações hidrofóbicas entre moléculas do fármaco e do solvente, além de evitar a cristalização do fármaco (ARAMAKI *et al* , 2001). No desenvolvimento do sistema autoemulsionável a modificação do pH pela adição de tampões não seria adequada já que envolveria a adição de fase aquosa na formulação, o que descaracterizaria a autoemulsão, já que a mesma é, por definição, uma mistura de óleo e surfactante, sem água. Sendo assim, neste trabalho foi utilizada a técnica de adição de co-solventes na tentativa de melhorar a solubilidade da Ipriflavona no sistema autoemulsionável, o que foi possível com a adição de álcool etílico na formulação.

Os benefícios associados ao emprego de surfactantes e óleos adequados para a veiculação de fármacos por via oral é reconhecido por diversos estudos (AUNGST, 1993; BENITA *et al*, 1994; CHARMAN *et al*, 1992). A escolha dos excipientes pode ser afetada por vários fatores, como por exemplo, toxicidade, estabilidade química e o custo de cada substância (POUTON e PORTER, 2007). De acordo com Benita e colaboradores (1994), diversos óleos podem ser utilizados para compor o sistema autoemulsionável, sejam eles naturais ou sintéticos e a escolha depende da solubilidade do fármaco em cada óleo. Dentre os óleos avaliados, o óleo de milho foi o que melhor solubilizou a Ipriflavona e, portanto, foi escolhido para compor a formulação.

Os surfactantes utilizados nos sistemas autoemulsionáveis são reconhecidos por aumentar a biodisponibilidade dos fármacos veiculados (KOMMURU, 2001). Helenius e Simons (1975) propuseram que os surfactantes atuam permeabilizando as membranas

biológicas, facilitando assim a penetração do fármaco. É importante mencionar que deve ser utilizada a menor concentração possível de surfactante visto que grandes quantidades podem causar irritação intestinal. Os surfactantes não iônicos são os mais recomendados para compor os sistemas autoemulsionáveis, sendo que os de origem natural são preferíveis aos de origem sintética por serem menos tóxicos (POUTON e PORTER, 2007). Neste trabalho, foram observados valores semelhantes de solubilidade para a Ipriflavona utilizando Tween 80, Capryol, Labrasol, PEG 400 e Transcutol (37 a 44 mg/ml). Desta forma, foram desenvolvidas formulações contendo todos estes surfactantes para avaliação da capacidade de emulsificação espontânea, sendo observados melhores resultados na formulação contendo capryol. Sendo assim, a formulação contendo 60% de óleo de milho, 20% de capryol, 10% de lecitina de soja e 10% de álcool etílico foi escolhida para os ensaios de estabilidade e avaliação da atividade cardioprotetora *in vivo*. O emprego de surfactantes, co-surfactantes e óleos compatíveis é essencial para o desenvolvimento de sistemas autoemulsionáveis adequados (GARCIA-CELMA, 1997).

Benita e Levy (1993) relataram que para a formação de sistemas autoemulsionantes estáveis, a concentração do óleo deve estar entre 40% e 60%. A concentração de surfactantes deve estar entre 30% e 60%, e a concentração de co-surfactantes deve ser no máximo 30%. Além das formulações com as proporções descritas por Benita e Levi (1993), neste trabalho foram avaliadas três formulações com baixas concentrações de óleo (10%, 20% e 30%) e uma formulação com alta concentração de óleo (85%). Conforme esperado, foi observada emulsificação espontânea dentro da faixa de concentrações descritas pelos autores enquanto que nas 3 formulações contendo quantidades extremas de excipientes não ocorreu emulsificação espontânea.

Através do estudo de liberação *in vitro* foi demonstrado que a Ipriflavona foi liberada a partir do sistema autoemulsionável quatro vezes mais rapidamente em relação à Ipriflavona livre já nos primeiros 10 min. Além disso, após 24 horas houve liberação de 85% da Ipriflavona presente no sistema autoemulsionável enquanto na Ipriflavona livre a liberação foi de apenas 59%. Analisando a área sob a curva de liberação foi possível observar que a veiculação da Ipriflavona no sistema autoemulsionável aumentou a dissolução em quase 3 vezes em relação à Ipriflavona livre. Estes resultados estão de acordo com os de Chen e colaboradores (2007), que avaliaram a liberação de Vinpocetina através da mesma técnica de diálise inversa utilizada neste trabalho. De acordo com Patil e colaboradores (2007), os ensaios de dissolução convencionais possuem limitação na avaliação de sistemas

autoemulsionáveis já que através deles só é possível avaliar a dispersibilidade da autoemulsão no meio aquoso. Por outro lado, os estudos de difusão do fármaco pela técnica de diálise, mais adequada para este tipo de formulação, estão bem documentados (KANG *et al*, 2005; KIM *et al*, 2000). A principal consequência do aumento da dissolução da Ipriflavona é o aumento da biodisponibilidade, já que foi possível contornar o fator limitante da absorção do fármaco (AMIDON *et al.*, 1995).

Em relação à estabilidade da formulação, a avaliação do diâmetro dos glóbulos formados após adição de água ao sistema autoemulsionante é um parâmetro importante. Dentre os fatores que influenciam o diâmetro das gotículas de óleo estão as técnicas de preparação e a composição da formulação. De acordo com Teixeira (2002), a incorporação de fármacos pode influenciar o diâmetro e a distribuição de gotículas. Esta afirmação está de acordo com o resultado encontrado neste trabalho, já que após a adição de Ipriflavona ao sistema autoemulsionável o tamanho médio dos glóbulos passou de 232 nm para 533 nm. O sistema autoemulsionável deve ser estável por pelo menos dois anos em condições ideais de armazenamento, enquanto que as emulsões formadas devem ser física e quimicamente estáveis pelo tempo necessário à absorção (NARANG, 2007). A formulação desenvolvida neste trabalho permaneceu estável durante todo o período de estudo, conforme demonstrado através da avaliação do pH e do tamanho dos glóbulos formados ao longo do tempo. O sistema autoemulsionante ideal deve ter pH entre 5 e 7, o que mantém a integridade física do sistema, diminuindo a hidrólise dos ésteres de ácidos graxos dos óleos e fosfolipídios, quando estes são utilizados (BENITA e LEVY, 1993), e tornando o sistema compatível fisiologicamente. Esta faixa de pH também permite a ionização dos grupamentos fosfato na superfície do filme de lecitina, estabilizando melhor a interface. Valores de pH abaixo de 5 devem ser evitados pois resultam no decréscimo da repulsão eletrostática da gotícula, promovendo o aumento do tamanho da gotícula e a coalescência (POUTON, 2006). O sistema autoemulsionável desenvolvido apresentou valores de pH de aproximadamente 5,5 durante os 10 meses de estudo, o que está de acordo com as recomendações acima citadas.

6.2. Avaliação da atividade cardioprotetora *in vivo*

Existem diversos modelos experimentais para indução da insuficiência cardíaca em diferentes espécies, como por exemplo: sobrecarga de volume, hipertensão arterial, frequência cardíaca elevada induzida pós marcapasso endocavitário, infarto agudo do miocárdio e uso de drogas cardiotoxícas (MONET E CHACQUES, 2005). Neste estudo foi utilizado o modelo de lesão miocárdica (IAM) através da ligadura da coronária por ser o modelo mais utilizado para a descoberta de novos tratamentos para o IAM. O modelo experimental de IAM através da ligadura da coronária esquerda em ratos possui grande similaridade à evolução clínica demonstrada em humanos (FISHBEIN *et al*, 1978), resultando em grandes áreas de necrose, lesão tecidual e disfunção ventricular, conforme descrito por Pfeffer e colaboradores (1991). Este modelo, no entanto, possui como desvantagem a alta taxa de mortalidade, oscilando entre 10% e 67%. (LIU *et al*, 1997; DE ANGELIS *et al*, 2001; JOHNS e OLSON, 1954). A taxa de mortalidade encontrada neste trabalho foi similar à taxa encontrada por Johns e Olson em 1954 (33,3%) e por De Angelis e colaboradores em 2001 (30%), demonstrando que apesar do modelo de ligadura da coronária ser o mais indicado para os estudos de isquemia do miocárdio, a mortalidade neste procedimento é elevada e não deve ser considerada como resultado do tratamento e sim do procedimento propriamente dito. Utilizando o mesmo modelo deste trabalho, Végh e Parratt (2002) demonstraram que a infusão de noradrenalina reduz a ocorrência de arritmias após a ligadura, contribuindo para a redução da mortalidade. Por outro lado, Vidal (2009) demonstrou que a noradrenalina por si só induz a alterações significativas do ECG e que o aumento da atividade colinérgica conferida por um inibidor da acetilcolinesterase, confere cardioproteção.

Dentre as ferramentas descritas para avaliação da atividade cardioprotetora pelo modelo de ligadura da coronária, o eletrocardiograma é considerado um dos exames mais precisos para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (MANSUR *et al*, 2006). Diversos trabalhos utilizaram o ECG para avaliar a presença de arritmias e a elevação do segmento ST (GONZALEZ *et al*, 2004; HUNG *et al*, 2000). No entanto, não foram encontrados trabalhos relacionando o modelo de ligadura da coronária com os intervalos do ECG. Sendo assim, este trabalho apresenta, pela primeira vez, a análise dos parâmetros do ECG em ratos fêmeas.

Jayasinghe e Kovoor (2002) relataram que diversos fatores podem influenciar o intervalo QT, tais como sexo, idade, frequência cardíaca, atividade simpática e a derivação do eletrocardiograma avaliada. A fim de minimizar tais interferências, em todos os experimentos

foram utilizados ratos fêmeas, com idade entre 16 a 20 semanas, peso médio 250 a 270g e o sinal de ECG foi obtido apenas na derivação periférica DII. Além disso, foi realizada correção do efeito da frequência cardíaca sobre o intervalo QT (QTc) utilizando o índice de Fridericia, possibilitando a comparação deste parâmetro entre ciclos cardíacos com valores de RR diferentes.

Inicialmente, foi observado que os valores dos intervalos PR e QT e complexo QRS em ratos fêmeas é menor ao descrito para ratos machos nas mesmas condições (LEITE et al., 2007). Outro aspecto observado foi a ausência de interferência da Ipriflavona sobre o ECG e a pressão arterial basais, independente da dose e formulação utilizada, indicando a segurança terapêutica da Ipriflavona e da formulação autoemulsionável desenvolvida pela primeira vez no presente trabalho.

A ligadura em ratos fêmeas realizada no presente trabalho induziu a alterações relevantes indicativas de isquemia do miocárdio como o aumento dos intervalos PR e QT, arritmias cardíacas e aumento bastante relevante da ASC do segmento ST. Adicionalmente, foi observado que a Ipriflavona, na formulação autoemulsionável, que confere maior biodisponibilidade, por si só impediu o prolongamento do intervalo QT do ECG e foi capaz de conferir proteção quanto à ocorrência de arritmias e de outras alterações importantes induzidas pela ligadura em ratos fêmeas. Em coronariopatias, o prolongamento do intervalo QT é um fator preditor de arritmias (Zuanneti *et al.*, 1987; London *et al.*, 1998) e morte súbita (Schwartz e Wolf, 1978; Ahnve, 1991).

Em síndromes cardíacas agudas podem aparecer diversos tipos de alterações no ECG. Uma dessas alterações é a onda Q anormal (quando a onda Q é maior que um terço do complexo QRS), indicando que há uma área miocárdica que está eletricamente inativa, ou seja, infartada. Outra alteração é a onda T invertida e uma terceira é a elevação do segmento ST, também chamada de supradesnivelamento do ST (MARQUES, 2004). Neste trabalho, os resultados encontrados no grupo submetido à ligadura da coronária sem tratamento estão de acordo com a descrição de Normann e colaboradores (1961) e Birnbaum e colaboradores (1996). Estes autores relataram que após ligadura da coronária foi observada presença de onda Q patológica em animais não submetidos a nenhum tipo de tratamento, o que também foi observado neste trabalho. No entanto, os autores afirmaram que a elevação do segmento ST não estaria relacionada à presença de infarto.

A idéia de correlacionar as variações do segmento ST ao infarto agudo do miocárdio data da década de 70 (MADIAS, 1978). De acordo com Maroko e colaboradores (1972) e

Ross (1976) a elevação do segmento ST é um reflexo do grau de isquemia do miocárdio e é determinada pelo tamanho da área isquêmica, presença de circulação colateral e pelas demandas metabólicas do miocárdio. Sendo assim, este parâmetro pode ser utilizado como marcador de isquemia desde que seja avaliado com cautela, já que diferentes variáveis contribuem para esta elevação. Diferentes autores analisaram o eletrocardiograma de ratos após a ligadura da coronária (KLÉBER, 2000; GOLDMAN *et al.*, 1995; MANSUR *et al.*, 1995) e ao contrário de Normann e colaboradores (1961) relataram a existência de relação entre infarto agudo do miocárdio e elevação do segmento ST. Neste trabalho a hipótese destes últimos autores foi confirmada já que a análise da área sob a curva do segmento ST demonstrou haver diferença significativa entre animais submetidos à ligadura e animais controle (submetidos à cirurgia fictícia).

Além das alterações supracitadas, diversos tipos de arritmias podem ocorrer após a ligadura da coronária, conforme foi observado neste trabalho. A fibrilação ventricular, por exemplo, é uma importante consequência da isquemia aguda do miocárdio, a qual pode levar ao óbito (HUNG *et al.*, 2000). De acordo com Vaillant e colaboradores (2008), a isquemia aguda não provoca dano nas células miocárdicas, mas pode, entretanto, induzir a mudanças no metabolismo cardíaco intracelular devido à diminuição no fornecimento de oxigênio para o músculo cardíaco. Assim, como foi observado neste trabalho, Frans e colaboradores (2001) também observaram a ocorrência de taquicardia e fibrilação ventricular após a ligadura da coronária em ratos. A presença de ondas P anormais no eletrocardiograma, relacionada com estímulos atriais prematuros, foi descrita por Janse e colaboradores (1997) e denominada “salto” na curva de condução. Hung e colaboradores (2000) avaliaram a atividade cardioprotetora do resveratrol em ratos utilizando o modelo de ligadura da coronária e verificaram que esta substância não foi capaz de impedir a ocorrência de arritmias. Ao contrário destes autores, neste trabalho foi observado que o tratamento com Ipriflavona nas diferentes doses e formulações reduziu o aparecimento de arritmias após a ligadura da coronária.

De acordo com Kostapanos e colaboradores (2007), as arritmias ventriculares ocasionadas pela isquemia aguda do miocárdio podem levar à morte súbita. Algumas condições eletrofisiológicas podem favorecer o surgimento destas arritmias, como por exemplo, a diminuição da frequência cardíaca associada à diminuição do tônus parassimpático (QUINTANA *et al.*, 1997; VRTOVEC *et al.*, 2003). Segundo Janse e colaboradores (1997), os fármacos antiarrítmicos modulam a velocidade da condução ou a

duração do período refratário, sendo que a velocidade de condução depende, por um lado das propriedades elétricas do tecido cardíaco e, por outro lado, das características dos canais de sódio e cálcio. Pouco se sabe a respeito das diferenças de densidade e cinética dos canais de sódio e cálcio nas diferentes espécies e desta forma, a relação destes canais com a ocorrência de arritmias também foi pouco explorada (PRESSLER, 1990). Após a inspeção visual dos sinais de ECG de todos os animais e classificação das arritmias foi possível caracterizar o perfil do ECG para o modelo de ligadura da coronária. Conforme mencionado anteriormente, não houve registro de arritmias em nenhum dos animais tratados com as diferentes doses de Ipriflavona. Arjmandi e colaboradores (2000) verificaram que a Ipriflavona aumenta a absorção de cálcio no intestino; desta forma, pode-se supor que a Ipriflavona exerça ação cardioprotetora, possivelmente envolvendo canais de cálcio, através de mecanismo ainda não elucidado.

A redução nos níveis pressóricos observada por outros autores (DE ANGELIS *et al*, 2001; KOLETTIS *et al*, 2007; SILVA, 2005) também foi observada neste trabalho, tanto nos animais submetidos à ligadura sem tratamento, como nos animais tratados com a Ipriflavona nas diferentes doses e diferentes formulações. Kolettis e colaboradores (2007) relacionaram a alta mortalidade após a ligadura (30,7%) com a ocorrência de bradiaritmias e redução nos valores absolutos de PAS e PAD. Gonzalez e colaboradores (2004) utilizaram o modelo de isquemia em coelhos para avaliação da atividade cardioprotetora do losartan e verificaram redução nos valores absolutos de PAS (de 120 mmHg para 80 mmHg) e PAD (de 90 mmHg para 60 mmHg) tanto nos animais com ligadura, sem tratamento como nos animais tratados. A redução na PA observada não atingiu níveis incompatíveis com a vida nos animais que resistiram aos 30 min de experimentação, no entanto, esta redução parece estar relacionada com a alta taxa de mortalidade já que todos os animais que evoluíram ao óbito apresentaram redução brusca de PA logo nos primeiros min após a ligadura da coronária.

Através da análise histopatológica cardíaca foi demonstrado presença de degeneração hialina, edema, inflamação e congestão, os quais podem evoluir para necrose e caracterizar o quadro de infarto. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Pitts e colaboradores (2007), que observaram as mesmas alterações apresentadas neste trabalho. Além disso, os autores relataram que nas primeiras 24 horas após o IAM a caracterização histológica é mais complicada devido à presença de proteínas que mascaram o infarto. De acordo com Minicucci e colaboradores (2007), as alterações dinâmicas evoluem durante 21 dias e dentro deste tempo o tecido necrótico é substituído por tecido fibroso de cicatrização.

Desta forma, neste trabalho a histopatologia não foi a ferramenta mais adequada para avaliar a cardioproteção já que o tempo de experimentação foi insuficiente para promover alterações teciduais características de IAM. Ainda assim, foi possível observar que os animais tratados com Ipriflavona nas diferentes doses e formulações apresentaram discreta melhora em relação aos animais submetidos à ligadura sem tratamento, sugerindo que após um tempo maior de isquemia seria possível obter resultados satisfatórios.

A ligadura da coronária induziu a alterações discretas em nível tecidual, alterações relevantes do ECG, além de promover a redução significativa da PA. Dentre as ferramentas utilizadas para caracterizar o IAM e avaliar o potencial cardioprotetor da Ipriflavona a elevação do segmento ST foi a mais adequada para o modelo descrito neste trabalho. Através desta análise foi possível confirmar o potencial cardioprotetor da Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, sendo que a melhor dose foi a de 240 mg/kg administrada por via oral durante 7 dias antes da ligadura da coronária. Além disso, foi possível observar que o sistema autoemulsionável aumentou a capacidade de dissolução da Ipriflavona contribuindo para a observação de melhores resultados.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos foi possível concluir que:

O sistema autoemulsionável desenvolvido melhorou a dissolução da Ipriflavona *in vitro* e apresentou características físico-químicas adequadas para a administração por via oral.

O tratamento com Ipriflavona nas diferentes doses e formulações reduziu a elevação do segmento ST observada nos ratos submetidos à ligadura sem tratamento, sendo a redução mais evidente quando a Ipriflavona foi veiculada no sistema autoemulsionável e administrado por 7 dias.

As alterações histopatológicas cardíacas foram menos evidentes nos animais tratados com a Ipriflavona em relação aos animais não tratados.

Neste trabalho foi possível demonstrar o potencial cardioprotetor da Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável através da redução das arritmias provocadas pela isquemia aguda do miocárdio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNETHY, D. R.; WESCHE, D. L.; BARBEY, J. T.; OHRT, C.; MOHANTY, S.; PEZZULLO, J. C.; SCHUSTER, B. G. Stereoselective halofantrine disposition and effect: concentration-related QTc prolongations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 3, 231-237, 2001.
- AGNUSDEI, D.; BUFALINO, L. Efficacy of ipriflavone in established osteoporosis and long-term safety. *Calcified Tissue International*, 61, 23–27, 1997.
- AHA. Heart disease and stroke statistics – 2005 update dallas, texas: *American heart association*, 2005.
- ALBERT A, A. C.; BARÓ, F.; BUENDÍA, E.; CABERO, A.; CANCELO, M. J. Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from *Glycine max* (L.) Merr in climacteric symptomatology: a multicentric, open, prospective, non-randomized trial. *Phytomedicine*. 9(2):85-92, 2002.
- ALEXANDER, R. W.; PRATT, C. M.; ROBERTS, R. Diagnosis and management of patients with acute myocardial infarction. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V. *Hurst's the Heart: Arteries and Veins*. 9a ed. New York: McGraw-Hill; 1345-433, 1998.
- ALEXANDERSEN, P.; TOUSSAINT, A.; CHRISTIANSEN, C. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 285, 1482–1488, 2001.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12, 413 – 420, 1995.
- AMIN, D.; KAMATH, S. K.; ARJMANDI, B. H.; ANDERSON, M. D. Cancer-induced hypocholesterolemia: effects of ipriflavone and genistin. *Journal of The American Dietetic Association*, 2006.
- ARAMAKI, K.; HAYASHI, T.; KATSURAGI, T.; ISHITOBI, M.; KUNIEDA, H. Effect of adding an amphiphilic solubilization improver, sucrose distearate, on the solubilization capacity of nonionic microemulsions. *Journal of Colloid Interface Science*, 236, 14–19, 2001.
- ARJMANDI, B. H.; KHALIL, D. A.; HOLLIS, B. W. Ipriflavone, a Synthetic Phytoestrogen, Enhances Intestinal Calcium Transport *In Vitro*. *Calcified Tissue International* 67:225–229, 2000.

- AUNGST, B. J. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *Journal of Pharmaceutical Science*, 82, 979 – 986, 1993.
- BECKER, R. C.; BURNS, M.; GORE, J. M.; LAMBREW, C.; FRENCH, W.; ROGERS, W. J. Early and predischage aspirin administration among patients with acute myocardial infarction: current clinical practice and trends in the United States. *Journal of Thrombolysis* 9: 207-15, 2000.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical Science*, 82, 1069 – 1079, 1993.
- BENVENUTI, S.; PETILLI, M.; FREDIANI, U.; TANINI, A. Binding and Bioeffects of ipriflavone on a human preosteoclastic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 1084 – 1089, 1994.
- BIRNBAUM, Y.; HERZ, I.; SCLAROVSKY, S. Prognostic significance of the admission electrocardiogram in acute myocardial infarction. *Journal of American College of Cardiology*, 27, 1128 – 1133, 1996.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE n^o 899 de 29/05/2003. *Diário Oficial da União*, 2003.
- BRAVO, L. *Nutrition Reviews*, 56, 317, 1998.
- BROWN, A. M.; STUBBS, D. W. *Medical Physiology*. Editor John Wiley & Sons, Inc, New York, 1983.
- BURCHAM, D. L.; MAURIN, M. B.; HAUSNER, E. A.; HUANG, S. M. Improved oral bioavailability of the hypocholesterolemic DMP 565 in dogs following oral dosing in oil and glycol solutions. *Biopharmaceutics Drug Disposition*, 18, 737 – 742, 1997.
- BYYNY, R. L.; SPEROFF, L. A. *Clinical Guide for the Care of Older Women* 2^a. Ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 1996.
- CAREY, M. C.; SMALL, D. M.; BLISS, C. M. Lipid digestion and absorption. *Annual Review Physiology*, 45, 651-677, 1983.
- CARVALHO, J.J.M. Aspectos preventivos em cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 50, 1, 59-67, 1988.

- CHANDRAN, S.; RAVI, P.; RANENDRA, N. S. Development and *in vitro* evaluation of oral controlled release formulations of celocoxib using optimization techniques. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 126, 505 – 514, 2006.
- CHARMAN, S. A.; CHARMAN, W. N.; ROGGE, M. C.; WILSON, T. D.; DUTKO, F. J.; POUTON, C. W. Self-emulsifying drug delivery system: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharmaceutical Research*. 9, 87– 93, 1992.
- CHEN, Y.; LI, G.; WU, X.; CHEN, Z.; HANG, J.; QIN, B.; CHEN, S.; WANG, R. Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of Vinpocetine: Formulation Development and *in Vivo* Assessment. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 31(1) 118—125, 2007.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. *Free Radical Biological Medicine*, 20, 35, 1996.
- CRAIG, D. Q. M.; LIEVENS, H. S. R.; PITT, K. G.; STOREY, D. E. An investigation into the physicochemical properties of self-emulsifying systems using low frequency dielectric spectroscopy, surface tension measurements and particle size analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 96, 147-155, 1993.
- CUNHA, A. S. J.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 66, 3, 385-391, 2003.
- DAHAN, A.; HOFFMAN, A. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67, 96–105, 2007.
- DAVEY, R.; HILTON, A.; GARSIDE, J.; DE LA FUENTE, M.; EDMONDSON, M.; RAINSFORD, P. Crystallisation of oil-in-water emulsions. Amphiphile directed nucleation in aqueous emulsions of *m*-chloronitrobenzene. *Journal of Chemistry Society* 92, 1927–1933, 1996.
- DE ANGELIS, K.; LEIRNER, A. A.; IRIGOYEN, M. C.; CESTARI, I. A. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artificial Organs*, 25, 939 – 943, 2001.

- DICKSON, R. B.; STANCEL, G. M. Chapter 8: Estrogen Receptor-Mediated Processes in Normal and Cancer Cells. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27, 1999.
- DOUGLAS, G.; ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; LAWSON, J. R.; MANN, G. E.; POSTON, L. Cardiovascular consequences of life-long exposure to dietary isoflavones in the rat. *Journal of Physiology Online*, 571, 477-487, 2006.
- ESCOSTEGUY, C. C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M. T. L. Pharmacological management of acute myocardial infarction in the municipal district of Rio de Janeiro. *Revista Paulista de Medicina*, 119, 193-199, 2001.
- FELDMAN, J.; GOLDWASSER, P. Eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação. *Revista SOCERJ*, 4(17), 251-6, 2004.
- FERNANDES, C. E.; MACHADO, R. B.; WEHBA, S.; FERREIRA, J. A. S. Como diagnosticar e tratar - climatério. *Revista Brasileira Médica*, 57(9), 953 – 972, 2000.
- FERNANDES, C. E. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 91(1 supl.1), 1-23, 2008.
- FERTE, J.; KUHNEL, J. M.; CHAPUIS, G.; ROLAND, Y.; LEWIN, G.; SCHWALLER, M. *American Journal of Medical Chemistry*, 42, 478, 1999.
- FEUER, L.; BARATH, P.; STRAUSS, I.; KEKES, E. Experimental studies on the cardiological effects of ipriflavone on the isolated rabbit heart and in rat and dog. *Arzneimittelforschung*, 1981.
- FISHBEIN, M. C.; MACLEAN, D.; MAROKO, P. R. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *American Journal of Pathology*, 90(1), 57–70, 1978.
- FLORENCE, A. T.; ATWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia, EdUSP, São Paulo, 2003.
- FRANS, H. H.; LEENEN, B.; BAOXUE, Y. Mortality After Coronary Artery Occlusion in Different Models of Cardiac Hypertrophy in Rats. *Hypertension*, 37, 209-215, 2001.
- FRIDERICIA, L. S. Die Systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. *Acta Medica Scandinavica*, 53, 489-490, 1920.
- FUCHS, W. F. Farmacologia Clínica. 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p 644-733, 2004.

- FUREDI-MILHOFER, H.; GARTI, N.; KAMYSHNY, A. Crystallization from Microemulsions - a novel method for the preparation of new crystal forms of aspartame. *Journal of Crystal Growth* 198/199, 1365–1370, 1999.
- GANONG, W. F. *Fisiologia Médica*. 17. Ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1998.
- GARCIA-CELMA, M. J. Solubilization of drugs in microemulsions, *Indust. Appl. Microemulsions*, 66, 123– 145, 1997.
- GOLDMAN, M. J. *Princípios de electrocardiografia clínica*. Tradução brasileira 8ª edição. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1976.
- GOLDMAN, S.; THOMAS E.; RAYA, M. D. Rat Infarct Model of Myocardial Infarction and Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*, 1, 2, 1995.
- GONZALEZ, G. E.; MANGAS, F.; PALLEIRO, J.; RODRIGUEZ, M.; CHAUVIN, A. D.; GELPI, R. J.; MORALES, C. Efectos de la administración temprana de losartan sobre el remodelamiento ventricular en conejos con infarto de miocardio experimental. *Medicina*, 64: 25-29, 2004.
- GUSSAK, I.; BRUGADA, P.; BRUGADA, J.; WRIGHT, R. S.; KOPECKY S. L.; CHAITMAN, B. R.; BJERREGAARD, P. Idiopathic short QT interval: A new clinical syndrome? *Cardiology*, 94, 99-102, 2000.
- GRABE-GUIMARÃES, A. Alterações cardiovasculares induzidas pela ativação neuronal do sistema nervoso central pelo glutamato em ratos: aplicações na investigação de drogas cardioprotetoras. Tese de doutorado, 275 p., FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.
- GROVE, M.; MULLERTZ, A. Liquid self-microemulsifying drug delivery systems, in: Hauss D. J. (Ed.), *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs*, Informa Healthcare, Inc., New York, pp. 107–127, 2007.
- GROVES, M.J. Spontaneous emulsification. *Chemical Industry*, 417-419, 1978.
- GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEEDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 173 – 182, 2004.
- GUS, I. Perfis de saúde – Brasil, 2006 – modificações e suas causas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88, 4, São Paulo, 2006.
- GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor: A new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology* 163:379–83, 1999.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.

- HAN, J.; DAVIS, S. S.; PAPANDREOU, C.; MELIA, C. D.; WASHINGTON, C. Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel I. Physicochemical Properties and plasma Stability. *Pharmaceutical Research*, 21, 9, 2004.
- HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hyperthrophy. *Cardiovascular Research* 39, 60 – 76, 1998.
- HAYAKAWA, K.; TAKEMURA, G.; KANO, M.; LI, Y.; KODA, M.; KAWASE, Y. Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation*, 108(1), 104-9, 2003.
- HEARSE, D. J. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: successes and failures in the journey from molecule to man. *European Heart Journal Supplements*. 3, 2000.
- HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochemical Biophysical Acta*, 415, 29–79, 1975.
- HUNG, L.; CHEN, J.; HUANG, S.; LEE, R.; SU, M. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 47, 549–555, 2000.
- JANSE, M. J.; OPTHOF, T.; KLÉBER, A. G. Animal models of cardiac arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 39, 165–177, 1998.
- JEONG, J. K.; KHANG, G.; RHEE, J. M.; SHIN, H. C.; LEE, H. B. Comparative bioavailability of ipriflavone by pharmaceutical preparation types. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, 30, 1, 21-26, 2000.
- JOHNS, T. N.; OLSON B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Annual Surgery*, 140(5), 675-82, 1954.
- KANG, B. K.; LEE, J. S.; CHON, S. K.; JEONG, S. Y.; YUK, S. H.; KHANG, G.; LEE, G.; CHO, S. H. Development of self-microemulsifying drug delivery system for oral availability enhancement of simvastatin in beagle dogs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 65–73, 2005.
- KARARLI, T. T.; NEEDHAM, T. E.; GRIFFIN, M.; SCHOENHARD, G.; FERRO, L. J.; ALCORN, L. Oral delivery of a renin inhibitor compound using emulsion formulations. *Pharmaceutical Research*, 9, 888 – 893, 1992.
- KAUFMAN, N.; GAVAN, T. L.; HILL, R. W. Experimental myocardial infarction in the rat. *AMA Archives of Pathology*, 67(5), 482–488, 1959.
- KENKYU, I. *Study of Medical Supplies*, 20, 228-229, 1989.

- KIM, H. J.; YOON, M.; HAHN, E. S. PARK; CHI, S. C. Preparation and *in vitro* evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems containing idebenone, *Drug Development Industrial Pharmacy*, 26, 523–529, 2000.
- KIM, S. H.; LEE, M. G. Pharmacokinetics of ipriflavone, an isoflavone derivative, after IV and oral administration to rats. *Life Sciences*, 70, 1299 – 1315, 2002.
- KLEBER, A. ST-segment elevation in the electrocardiogram: a sign of myocardial Ischemia. *Cardiovascular Reserach*, 45, 111–118, 2000.
- KOLETTIS, T. M; AGELAKI, M. G.; BALTOGIANNIS, B. G.; VLAHOS, A. P. MOUROUZIS, I.; FOTOPOULOS, A.; PANTOS, C. Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. *Europace*, 9, 1099–1104, 2007.
- KOMPA, A. R.; SUMMERS, R. J. Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 43, 199-203, 2000.
- KOMMURU, T. R.; GURLEY, B.; KHAN, M. A.; REDDY, I. K. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment, *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 233–246, 2001.
- KOSSENA, G. A.; BOYD, B. J.; PORTER, C.J.; CHARMAN, W. N. Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 634–648, 2003.
- KOSTAPANOS, M. S.; LIBEROPOULOS, E. N.; GOUDEVENOS, J. A.; MIKHAILIDIS, D. P.; ELISAF, M. S. Do statins have an antiarrhythmic activity? *Cardiovascular Research*, 2007.
- KÜBLER, W.; HAASS, M. Cardioprotection: Definition, Classification, and Fundamental Principles. *Heart*, 75(4), 330-333, 1996.
- KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology*, 139, 4252–4263, 1998.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 89-121, 2000.

- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sci.*, 9, 411-418, 1999.
- LEITE, E. A. Nanocápsulas de Poli- ϵ -caprolactona contendo Halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo de cardiotoxicidade. Ouro Preto. (Dissertação de Mestrado) Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – NUPEB, 2006.
- LESSA, I. Doenças crônicas não transmissíveis: Bases epidemiológicas. In: Rouquayrol, M. Z.; Filho, N. A. (ed). 5a ed., *Epidemiologia & Saúde*. Rio de Janeiro: Medsi., 285-299, 1998.
- LESSA, I. Medical care and deaths due to coronary artery disease in Brazil, 1980-1999. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 81 (4), 336-342, 2003.
- LEOR, J.; PATTERSON, M.; QUINONES, M. J.; KEDES, L. H.; KLONER, R. S. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?. *Circulation*, 94, 332-336, 1996.
- LINDSTROM, M.; LJUSBERG-WAHREN, H.; LARSSON, K.; BORGSTROM, B. Aqueous lipid phases of relevance to intestinal fat digestion and absorption. *Lipids*, 16, 749-754, 1981.
- LI, R. K.; MICKLE, D. A.; WEISEL, R. D.; RAO, V.; JIA, Z. Q. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Annals of Thoracic Surgery*, 72(6), 1957-1963, 2001.
- LI, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, X. Pharmacokinetics of intragastric ipriflavone solid dispersions in rats. *Acta Pharmacol Sínica*, 20, 1035 – 1038, 1999.
- LIU, Y. H.; YANG, X. P.; NASS, O.; SABBAH, H. N.; PETERSON, E.; CARRETERO, O. A. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *American Journal of Physiology*, 272, 722-727, 1997.
- LISSIN, L. W.; COOKE, J. P. Phytoestrogens and cardiovascular health *Journal of American College of Cardiology*, 35, 1403-1410, 2000.
- MACKAY, J.; MENSAH, G. The Atlas of Heart Disease and Stroke. World Health Organization Nonserial Publication, 2004 Disponível em:
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/index.html Acesso em: 25/04/2009.
- MADIAS, J. E. Use of pre-cordial ST-segment mapping. *American Heart Journal*, 1(95), 96-101, 1978.

- MANSUR, P. H. G.; CURY, L. K. P.; DESTRO-FILHO, J. B.; RESENDE, E. S.; DESTRO, J. P. B.; OLIVEIRA, L. M.; MORAES, D. C. G.; FREITAS, G. R. R.; ROCHA, L. S. S. Análise de registros eletrocardiográficos associados ao infarto agudo do miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87 (2), 2006.
- MAROKO, P. R.; LIBBY, P.; COVELL, J. W.; SOBEL, B. E.; ROSS, J. J.; BRAUNWALD, E.; Precordial S-T segment elevation mapping: an atraumatic method for assessing alternations in the extent of myocardial ischemic injury. *American Journal of Cardiology* 29, 223–230, 1972.
- MCARDLE, W.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fundamentos de Fisiologia do Exercício. *Guanabara Koogan*, 2ª Edição, 2001.
- MESSIHA, F. S. Benzyl alcohol adverse effects in the rat: implication for toxicity as a preservative in parenteral injectable solutions. *Biochemical Physiology* 99, 445-449, 1991.
- MILL, J. G.; STEFANON, I.; LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research*, 24(9), 748-53, 1990.
- MINICUCCI, M. F.; AZEVEDO, P. S.; DUARTE, D. R.; MATSUBARA, L. S.; CAMPANA, A. O. PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Comparação de Diferentes Métodos para Medida do Tamanho do Infarto Experimental Crônico em Ratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 89(2), 93-98, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. DATASUS. Informações de Saúde. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>, acesso em 23/03/2009.
- MIRANDA, H.; SIMÃO, R.; LEMOS, A.; DANTAS, B. H. A.; BAPTISTA, L. A.; NOVAES, J. Análise da frequência cardíaca, pressão arterial e duplo-produto em diferentes posições corporais nos exercícios resistidos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 11, 5, 2005.
- MONNET, E.; CHACHQUES, J. C. Animal models of heart failure: what is new? *Annals of Thoracic Surgery*. 79, 1445-1453, 2005.
- MONOSTORY, K.; VERECZKEY, L. Interaction of theophylline and ipriflavone at the cytochrome P450 level. *European Journal Drug Metabolics and Pharmacokinetics*, 20, 43–47, 1995.
- MONOSTORY, K.; VERECZKEY, L.; LEVAI, F. Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 123, 605–610, 1998.

- MORITO, K.; AOMORI, T.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HASEGAWA, J.; OGAWA, S.; Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 25(1), 48-52, 2002.
- NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. Soy product intake and hot flushes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *American Journal of Epidemiology*, 153(8), 790-793, 2001.
- NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAOC, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345, 9–25, 2007.
- NELSON, H.D.; VESCO, K. K.; HANEY, E.; FU, R.; NEDROW, A.; MILLER, J. Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 295(17), 2057-2071, 2006.
- NICOLAU, J.C.; TIMERMAN, A.; PIEGAS, L. S.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Guidelines for Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction of the Brazilian Society of Cardiology (II Edition, 2007). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 89 (4), 2001.
- NORMANN, S. J.; PRIEST, R. E.; BENDITT, E. P. Electrocardiogram in the Normal Rat and Its Alteration with Experimental Coronary Occlusion. *Circulation Research*, 9, 282-287, 1961.
- OLIVETTI, G.; CAPASSO, J. M.; MEGGS, L. G.; SONNENBLICK, E. H.; ANVESA, P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling in the first year after acute myocardial infarction in rats. *Circulation Research*, 68(3), 856-869, 1991.
- PALIN, K. J.; PHILLIPS, A. J.; NING, A. The oral absorption of cefoxitin from oil and emulsion vehicles in rats. *International Journal of Pharmacy*, 33, 99 - 104, 1986.
- PATIL, P.; PATIL, V.; PARADKAR, A. Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: *In vitro* and *in vivo* evaluation *Acta Pharm.* 57, 111–122, 2007.
- PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FISHBEIN, M. C.; FLETCHER, P. J.; SPADARO, J.; KLONER, R. A.; BRAUNWALD, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*, 44(4), 503-512, 1979.
- PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; FLETCHER, P. J.; BRAUNWALD, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *American Journal of Physiology*, 260, 1406-1414, 1991.
- PIEGAS, L. S.; TIMERMAN, A. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 83, 2004.

- PINHO, M. R. X. Utilização de betabloqueadores em pacientes idosos na fase aguda do infarto do miocárdio - análise do período de 1990 a 1994. São Paulo. (Dissertação de Mestrado) Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, 1997.
- PITTS, K. R.; STIKO, A.; BUETOW, B.; LOTT, F.; GUO, P.; VIRCA, D.; TOOMBS, C. F. Washout of heme-containing proteins dramatically improves tetrazolium-based infarct staining *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55, 201–208, 2007.
- PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug Delivery*, 50, 127 – 147, 2001.
- PORTER, C. J. H.; KAUKONEN, A. M.; BOYD, B. J.; EDWARDS, G. A.; CHARMAN, W. N. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after oral administration as a medium-chain lipid based microemulsion formulation. *Pharmaceutical Research*, 21, 1405–1412, 2004.
- PORTO, C. C. *Doenças do coração*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- POUTON, C. W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25, 47 – 58, 1997.
- POUTON, C.W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006.
- POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 625 – 637, 2007.
- PRESSLER, M. L. Passive electrical properties of cardiac tissue. In: Zipes, D. P.; Jalife, J. *Cardiac Electrophysiology: From cell do bedside*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990: 108 – 122.
- PREVITALI, M.; KLERSY, C.; SALERNO, J. A.; CHIMIANTI, M.; PANCIROLI, C.; MARANGONI, E.; SPECCHIA, G.; COMOLLI, M.; BOBBA, P. Ventricular tachyarrhythmias in Prinzmetal's variant angina: clinical significance and relation to the degree and time course of S-T segment elevation. *The American journal of cardiology*. 52(1), 19-25, 1983.
- QUINTANA, M.; STORCK, N.; LINDBLAD, LE.; LINDVALL, K.; ERICSON, M. Heart rate variability as a means of assessing prognosis after acute myocardial infarction. A 3-year follow-up study. *European Heart Journal*, 18, 789–797, 1997.

- RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. *Fisiologia Médica*. Tradução espanhola. Editora MASSON-little, Brown, S.A., Barcelona, 1996.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Quim. Nova*, 27, 771, 2004.
- ROBERTSON, R. M.; ROBERTSON, D. Drugs used for the treatment of myocardial ischemia, McGraw Hill, 9, 32, 760-765, 1996.
- ROSS, J. JR. Electrocardiographic ST-segment analysis in the characterization of myocardial ischemia and infarction. *Circulation*, 53, 73-81, 1976.
- ROSSOUW, J. E.; ANDERSON, G. L.; PRENTICE, R. L.; LACROIX, A. Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M. L. Risks and benefits of estrogen plus progestin in health postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 288(3), 321-33, 2002.
- SABATINE, M. S.; O'GARA, P. T.; LILLY L. S. Pathophysiology of Heart Disease, A Collaborative Project of Medical Students and Faculty. *Williams & Wilkins*, 2nd Ed., 6, 119-142, 1998.
- SCHWENDENER, R. A.; SCHOTT, H. Lipophilic 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomal formulations for oral and parenteral antileukemic therapy in the murine L1210 leukemia model. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*, 122, 723 - 726, 1996.
- SCORSIN, M.; MAROTTE, F.; SABRI, A.; LE, D. O.; DEMIRAG, M.; SAMUEL, J. L. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation*, 94, 337-340, 1996.
- SELYE, E. A. Simple Techniques for the Surgical Occlusion of Coronary Vessels in the Rat *Angiology*, 11, 398-407, 1960.
- SERAJUDDIN, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 1058 – 1066, 1999.
- SJAASTAD, I.; SEJERSTED, O. M.; ILEBEKK, A.; BJORNERHEIM, R. Echocardiographic criteria for detection of posinfarction congestive heart failure in rats. *Journal Applied Physiology*, 89(4), 1445-54, 2000.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Consenso Brasileiro sobre Trombólise. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre cuidados ao paciente infartado. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*; 63 (supl.II), 1-8, 1994.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). O Eletrocardiograma no infarto agudo do miocárdio. Grupo de Estudos de Eletrocardiografia, 2004, disponível em <http://departamentos.cardiol.br/eletoc/publicacoes/curso/007.asp>, acesso em 25/03/2009.
- SOUZA, J. A. M. Avaliação de dois métodos experimentais de indução de infarto agudo do miocárdio, Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, (Dissertação de Mestrado), 2005.
- STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical Research*, 21, 2, 2004.
- SUTTON, M. G.; SHARPE, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 27, 2981-2988, 2000.
- TAMILVANAN, S.; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 2, 357-368, 2004.
- TANG, J. L.; SUN, J.; HE, Z. G. Self-emulsifying drug delivery systems: Strategy for improving oral delivery of poorly soluble drugs. *Current Drug Therapy*, 2, 85-93, 2007.
- TANI, S.; MATSUDA, K.; TANAKA, T. Induction of apoptosis in cultured rat gastric epithelial cells by ipriflavone: Comparison with indomethacin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 647-651, 2004.
- TARR, B. D.; YALKOWSKY, S. H. Enhanced intestinal absorption of cyclosporine in rats through the reduction of emulsion droplet size. *Pharmaceutical Research*, 6, 40-43, 1989.
- TOKIWA, T. A one-year oral toxicity study of Ipriflavone on beagle dogs. *Applied Pharmacology*, 31, 113-136, 1986.
- TROTTA, M.; PATTARINO, F.; GROSA, G. Formation of lecithin-based microemulsions containing n-alkanol phosphocholines, *International Journal of Pharmaceutics* 174, 253-259, 1998.
- UNFER, V; CASINI, M. L.; COSTABILE, L.; MIGNOSA, M.; GERLI, S.; DI RENZO, G. C. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Sterility*, 82(1), 145-148, 2004.
- UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.

- VAILLANT, F.; TSIBIRIBI, P.; BRICCA, G.; BUI-XUAN, B.; BERCOND-JACQUET, A. Trimetazidine Protective Effect Against Ischemia-Induced Susceptibility to Ventricular Fibrillation in Pigs. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 22, 29–36, 2008.
- VEGH, A; PARRATT, J. R. Noradrenaline, infused locally, reduces arrhythmia severity during coronary artery occlusion in anaesthetised dogs. *Cardiovascular Research*, 55, 53–63, 2002.
- VIDAL, A. T. Avaliação da atividade cardioprotetora da piridostigmina veiculada em lipossomas. Ouro Preto. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Escola de Farmácia (Dissertação de mestrado), 2009.
- VRTOVEC, B.; DELGADO, R.; ZEWAIL, A.; THOMAS, C. D.; RICHARTZ, B. M.; RADOVANCEVIC, B. Prolonged QTc interval and high B-type natriuretic peptide levels together predict mortality in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 107, 1764–1769, 2003.
- WAKERLY, M. G.; POUTON, C. W.; MEAKIN, B. J.; MORTON, F. S. Self-emulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixture: a proposed mechanism of action, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 311, 242–255, 1986.
- WALKER, M. J.; CURTIS, M. J.; HEARSE, D. J.; CAMPBELL, R. W.; JANSE, M. J.; YELLON, D. M.; COBBE, S. M.; COKER, S. J.; HARNESS, J. B.; HARRON, D. W. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovascular Research*, 22(7), 447-455, 1988.
- WEAVER, W. D.; LITWIN, P. E.; MARTIN, J. S. Effects of age on use of thrombolytic therapy and mortality in acute myocardial infarction. *Journal of American College of Cardiology*;18, 657-662, 1991.
- WEHBA, S.; FERNANDES, C. E.; FERREIRA, J. A. S.; FARIA, J. R. D.; MELO, N. R.; LEAL, J. W. B. Terapêutica de Reposição Hormonal. In: Fernandes CE, Melo NR Wehba S (eds). *Climatério Feminino - Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento*. São Paulo, Lemos Editorial, 1999. P.265 – 282
- YTREHUS, K.; LIU, Y.; TSUCHIDA, A.; MIURA, T.; LIU, G. S.; YANG, X. M. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *American Journal of Physiology*, 267, 2383-2390, 1994.
- ZHURNAL, K. F. *Chemical Pharmaceutical Journal*, 24(9), 38, 1990.

ZILI, Z.; SOUAD, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, 294, 261-267, 2005.

9. ANEXOS

TABELA 15 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) do intervalo PR para todos os grupos.
(A = período controle; B = 30 min após a ligadura)

Grupos	Intervalo PR (ms)	
	Média	e.p.m.
Sham	A 50,57 \pm 1,92	
	B 54,06 \pm 1,01	
Ligadura	A 53,68 \pm 0,98	
	B 67,10 \pm 4,27	
Livre 30mg/kg	A 47,81 \pm 1,62	
	B 53,04 \pm 5,54	
Livre 1g/kg	A 50,77 \pm 2,55	
	B 60,20 \pm 4,11	
Agudo 30mg/kg	A 50,35 \pm 2,44	
	B 54,70 \pm 4,21	
Agudo 240mg/kg	A 54,91 \pm 1,41	
	B 68,29 \pm 4,07	
Sub-agudo 30mg/kg	A 51,71 \pm 1,19	
	B 62,23 \pm 6,65	
Sub-agudo 240mg/kg	A 54,15 \pm 1,34	
	B 56,82 \pm 3,16	

TABELA 16 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) do complexo QRS para todos os grupos
(A = período controle; B = 30 min após a ligadura)

Complexo QRS (ms)		
Grupos	Média	e.p.m.
Sham	A 18,80	\pm 0,85
	B 18,49	\pm 0,99
Ligadura	A 21,92	\pm 0,49
	B 18,20	\pm 0,71
Livre 30mg/kg	A 18,39	\pm 0,68
	B 16,81	\pm 1,85
Livre 1g/kg	A 19,87	\pm 0,84
	B 16,37	\pm 0,76
Agudo 30mg/kg	A 19,71	\pm 0,76
	B 17,42	\pm 1,34
Agudo 240mg/kg	A 21,69	\pm 0,56
	B 20,05	\pm 0,81
Sub-agudo 30mg/kg	A 20,82	\pm 0,77
	B 19,41	\pm 1,45
Sub-agudo 240mg/kg	A 20,97	\pm 0,51
	B 18,59	\pm 0,96

TABELA 17 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) do intervalo QT para todos os grupos.
(A = período controle; B = 30 min após a ligadura)

Grupos	Intervalo QT (ms)		
		Média	e.p.m.
Sham	A	61,77	\pm 1,34
	B	61,69	\pm 1,62
Ligadura	A	61,27	\pm 1,45
	B	76,42	\pm 5,78
Livre 30mg/kg	A	59,29	\pm 1,43
	B	79,26	\pm 10,54
Livre 1g/kg	A	59,47	\pm 1,33
	B	69,37	\pm 10,41
Agudo 30mg/kg	A	64,56	\pm 2,32
	B	89,09	\pm 8,74
Agudo 240mg/kg	A	61,91	\pm 0,99
	B	65,93	\pm 7,95
Sub-agudo 30mg/kg	A	58,00	\pm 2,89
	B	60,91	\pm 6,75
Sub-agudo 240mg/kg	A	61,46	\pm 0,78
	B	65,82	\pm 4,47

TABELA 18 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) do parâmetro QTc para todos os grupos.
(A = período controle; B = 30 min após a ligadura)

Grupos	QTc (ms)		
	Média	e.p.m.	
Sham	A	106,5 \pm 4,01	
	B	107,5 \pm 5,31	
Ligadura	A	110,3 \pm 2,35	
	B	117,9 \pm 5,71	
Livre 30mg/kg	A	108,5 \pm 3,24	
	B	125,6 \pm 7,32	
Livre 1g/kg	A	108,3 \pm 2,54	
	B	107,7 \pm 13,51	
Agudo 30mg/kg	A	100,0 \pm 4,84	
	B	132,6 \pm 12,55	
Agudo 240mg/kg	A	110,3 \pm 1,89	
	B	101,8 \pm 11,41	
Sub-agudo 30mg/kg	A	103,3 \pm 5,96	
	B	89,12 \pm 12,91	
Sub-agudo 240mg/kg	A	112,3 \pm 1,82	
	B	108,0 \pm 8,28	

TABELA 19 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de PAS para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.

Tempo (min)	PAS (mmHg)			
	Controle	Sem Tratamento	Ipriflavona Livre 30mg/kg	Ipriflavona Livre 1g/kg
0	116,27 \pm 1,41	116,77 \pm 2,67	132,96 \pm 11,64	117,02 \pm 13,63
1	93,61 \pm 3,40	91,53 \pm 7,80	123,50 \pm 10,81	113,81 \pm 15,32
2	85,80 \pm 5,48	99,90 \pm 4,11	115,86 \pm 6,55	92,59 \pm 11,83
3	87,34 \pm 4,28	87,29 \pm 6,76	110,32 \pm 5,96	77,76 \pm 10,68
4	88,09 \pm 3,89	82,37 \pm 5,91	107,78 \pm 9,31	64,74 \pm 15,04
5	92,09 \pm 4,39	75,92 \pm 6,38	106,01 \pm 8,97	58,48 \pm 15,17
7	94,43 \pm 5,08	75,69 \pm 6,90	103,89 \pm 10,28	84,97 \pm 21,70
10	92,10 \pm 6,13	77,26 \pm 7,04	99,10 \pm 10,68	72,44 \pm 23,46
15	93,70 \pm 5,16	73,99 \pm 7,81	89,95 \pm 8,44	80,36 \pm 15,82
20	100,62 \pm 5,08	79,68 \pm 7,42	86,94 \pm 8,82	78,39 \pm 13,29
25	101,13 \pm 4,71	78,77 \pm 7,20	84,06 \pm 8,13	73,20 \pm 10,76
30	95,72 \pm 3,94	79,97 \pm 7,71	83,72 \pm 8,49	59,77 \pm 16,38

TABELA 20 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de PAS para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.

Tempo (min)	PAS (mmHg)							
	Agudo 30mg/kg		Agudo 240mg/kg		Sub-agudo 30mg/kg		Sub-agudo 240mg/kg	
0	113,76	\pm 5,35	116,43	\pm 3,27	126,75	\pm 2,95	116,95	\pm 1,71
1	92,43	\pm 7,10	82,49	\pm 6,90	111,22	\pm 2,30	107,59	\pm 0,61
2	84,70	\pm 6,39	77,68	\pm 4,75	84,10	\pm 6,74	99,95	\pm 2,34
3	76,51	\pm 7,65	70,68	\pm 4,15	74,53	\pm 8,53	93,19	\pm 4,79
4	74,82	\pm 7,66	68,21	\pm 4,96	74,56	\pm 8,41	91,93	\pm 5,69
5	79,80	\pm 7,74	69,28	\pm 4,35	89,89	\pm 8,85	93,64	\pm 5,81
7	85,72	\pm 7,03	67,63	\pm 4,82	75,83	\pm 8,43	95,32	\pm 5,34
10	78,72	\pm 8,60	77,54	\pm 7,79	84,84	\pm 8,22	94,46	\pm 5,24
15	87,51	\pm 5,98	75,96	\pm 8,62	87,24	\pm 6,59	93,46	\pm 6,93
20	85,14	\pm 7,82	71,13	\pm 8,73	81,93	\pm 6,13	90,41	\pm 7,62
25	88,28	\pm 5,18	70,46	\pm 9,04	87,23	\pm 5,27	90,02	\pm 7,69
30	91,51	\pm 5,27	70,60	\pm 10,52	84,30	\pm 6,15	94,27	\pm 7,20

TABELA 21 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de PAD para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.

Tempo (min)	PAD (mmHg)			
	Controle	Sem Tratamento	Ipriflavona Livre 30mg/kg	Ipriflavona Livre 1g/kg
0	95,71 \pm 1,68	91,27 \pm 3,97	106,94 \pm 9,24	89,67 \pm 8,21
1	64,96 \pm 2,38	68,70 \pm 7,29	88,84 \pm 10,00	79,32 \pm 13,85
2	61,67 \pm 5,09	71,47 \pm 5,08	84,28 \pm 5,93	61,29 \pm 9,90
3	64,91 \pm 4,45	64,86 \pm 5,08	79,90 \pm 7,00	50,92 \pm 8,59
4	65,71 \pm 4,06	56,38 \pm 5,80	78,84 \pm 9,28	43,69 \pm 11,03
5	68,53 \pm 4,44	52,30 \pm 6,22	78,81 \pm 8,88	41,08 \pm 10,90
7	70,42 \pm 5,56	53,05 \pm 5,80	76,67 \pm 9,32	60,15 \pm 19,20
10	67,92 \pm 6,18	55,54 \pm 5,64	73,83 \pm 9,98	53,27 \pm 21,33
15	69,83 \pm 4,90	59,00 \pm 6,45	64,47 \pm 7,64	53,91 \pm 11,94
20	76,19 \pm 5,61	61,20 \pm 6,43	67,85 \pm 8,05	52,35 \pm 11,43
25	78,16 \pm 4,90	60,29 \pm 7,06	60,53 \pm 6,81	47,17 \pm 8,99
30	73,40 \pm 3,04	59,75 \pm 7,13	58,68 \pm 6,61	38,32 \pm 11,33

TABELA 22 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de PAD para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.

Tempo (min)	PAD (mmHg)									
	Agudo 30mg/kg		Agudo 240mg/kg		Sub-agudo 30mg/kg		Sub-agudo 240mg/kg			
0	85,00	\pm 4,72	84,58	\pm 3,39	93,50	\pm 2,77	95,17	\pm 1,81		
1	71,58	\pm 6,80	56,08	\pm 5,27	77,48	\pm 2,68	79,53	\pm 1,60		
2	62,80	\pm 5,88	49,52	\pm 3,40	57,53	\pm 5,90	74,74	\pm 2,55		
3	54,67	\pm 5,82	44,90	\pm 2,71	51,84	\pm 7,45	70,56	\pm 3,54		
4	52,35	\pm 6,09	44,17	\pm 2,87	53,09	\pm 6,76	65,69	\pm 3,91		
5	56,47	\pm 6,27	45,76	\pm 2,44	65,48	\pm 7,21	66,39	\pm 4,11		
7	59,99	\pm 6,18	52,49	\pm 2,34	53,20	\pm 6,20	67,16	\pm 3,84		
10	56,25	\pm 7,15	54,74	\pm 5,38	59,05	\pm 5,90	70,46	\pm 4,25		
15	61,92	\pm 5,24	54,80	\pm 6,96	64,26	\pm 4,45	67,59	\pm 4,98		
20	64,01	\pm 5,84	53,55	\pm 7,06	61,26	\pm 6,13	63,77	\pm 5,81		
25	64,91	\pm 5,20	51,89	\pm 6,86	66,71	\pm 4,49	66,09	\pm 6,37		
30	65,49	\pm 5,16	51,47	\pm 7,58	60,16	\pm 6,26	72,22	\pm 5,85		

TABELA 23 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de FC para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona livre, nas diferentes doses.

Tempo (min)	FC (bpm)			
	Controle	Sem Tratamento	Livre 30mg/kg	Livre 1g/kg
0	376,528 \pm 13,37	348,04 \pm 16,73	368,90 \pm 10,78	352,56 \pm 23,46
1	323,168 \pm 11,21	254,88 \pm 25,26	317,29 \pm 14,68	318,77 \pm 33,62
2	330,817 \pm 12,31	263,45 \pm 23,77	330,19 \pm 15,47	321,16 \pm 35,05
3	327,396 \pm 12,84	265,62 \pm 24,93	321,10 \pm 21,42	324,56 \pm 35,35
4	336,062 \pm 12,96	268,81 \pm 22,21	323,32 \pm 20,72	318,69 \pm 44,40
5	334,166 \pm 12,94	269,00 \pm 22,89	316,00 \pm 21,89	313,60 \pm 45,99
7	330,377 \pm 11,53	262,56 \pm 23,37	310,58 \pm 23,56	309,47 \pm 46,84
10	324,35 \pm 11,39	279,67 \pm 24,90	304,58 \pm 26,77	259,52 \pm 59,41
15	325,243 \pm 10,59	275,21 \pm 19,71	333,14 \pm 15,59	281,37 \pm 48,51
20	319,059 \pm 9,42	269,90 \pm 21,66	335,69 \pm 16,49	265,82 \pm 54,40
25	320,954 \pm 10,18	259,38 \pm 20,67	331,20 \pm 16,61	259,55 \pm 59,19
30	316,505 \pm 9,02	262,60 \pm 24,43	328,23 \pm 16,90	228,45 \pm 78,58

TABELA 24 – Valores absolutos (média \pm e.p.m.) de FC para os grupos controle, sem tratamento e tratados com Ipriflavona veiculada no sistema autoemulsionável, nas diferentes doses.

Tempo (min)	FC (bpm)			
	Agudo 30mg/kg	Agudo 240mg/kg	Sub-agudo 30mg/kg	Sub-agudo 240mg/kg
0	246,30 \pm 14,63	319,89 \pm 11,45	359,34 \pm 10,53	359,26 \pm 13,24
1	197,06 \pm 21,35	230,52 \pm 12,37	322,73 \pm 4,08	320,04 \pm 14,17
2	199,67 \pm 18,48	255,19 \pm 14,89	310,85 \pm 8,42	326,95 \pm 15,46
3	201,02 \pm 17,81	254,08 \pm 14,70	282,54 \pm 23,52	325,61 \pm 15,93
4	194,22 \pm 17,82	255,28 \pm 14,11	284,66 \pm 24,41	329,82 \pm 12,98
5	195,36 \pm 18,02	254,39 \pm 14,01	311,31 \pm 11,26	332,34 \pm 12,19
7	197,01 \pm 18,53	261,48 \pm 12,77	304,81 \pm 13,49	324,59 \pm 13,48
10	191,76 \pm 18,60	266,30 \pm 13,36	296,01 \pm 11,88	322,50 \pm 14,36
15	193,02 \pm 16,58	255,11 \pm 18,72	288,59 \pm 14,26	315,73 \pm 13,71
20	176,26 \pm 18,03	260,23 \pm 15,53	261,36 \pm 24,10	314,72 \pm 15,04
25	189,38 \pm 14,78	254,35 \pm 17,00	274,74 \pm 16,37	304,28 \pm 16,87
30	184,67 \pm 16,86	236,33 \pm 18,56	267,68 \pm 17,96	285,24 \pm 24,17

TABELA 25 – Variação (média ± e.p.m.) da área sob a curva do segmento ST após a ligadura da coronária em relação ao período controle, antes da ligadura

	Tempo (min)					
	1	2	3	4	5	7
Sem Tratamento	322,39 ± 63,78	328,92 ± 58,81	332,06 ± 57,37	325,54 ± 51,17	311,80 ± 49,32	329,77 ± 62,26
Controle (Sham)	62,90 ± 16,50 (*)	38,03 ± 14,87 (*)	35,75 ± 13,63 (*)	39,43 ± 11,40 (*)	32,59 ± 9,69 (*)	29,74 ± 11,02 (*)
Livre 30mg/kg	215,48 ± 48,01	244,13 ± 89,40	250,23 ± 82,67	245,18 ± 58,86	220,06 ± 53,27	192,97 ± 52,72
Livre 1g/kg	108,38 ± 63,01	157,45 ± 70,65	126,26 ± 71,64	84,42 ± 72,75	104,66 ± 51,91	81,25 ± 43,23 (*)
Agudo 30mg/kg	223,88 ± 63,73	208,47 ± 42,55 (*)	151,18 ± 45,54 (*)	158,98 ± 36,44 (*)	117,73 ± 25,82 (*)	117,49 ± 25,81 (*)
Agudo 240mg/kg	148,75 ± 59,15 (*)	155,63 ± 52,37	146,54 ± 52,22 (*)	146,58 ± 48,75	129,97 ± 50,85 (*)	129,81 ± 51,44 (*)
Sub-Agudo 30mg/kg	189,18 ± 54,62	141,17 ± 63,66 (*)	168,20 ± 61,06	161,40 ± 54,51	139,46 ± 42,88	103,55 ± 45,82 (*)
Sub-Agudo 240mg/kg	99,40 ± 19,34	100,06 ± 23,24 (*)	86,52 ± 14,19 (*)	56,90 ± 19,39 (*)	77,13 ± 14,34 (*)	82,65 ± 15,30 (*)

	Tempo (min)				
	10	15	20	25	30
Sem Tratamento	283,67 ± 76,57	307,81 ± 82,93	298,09 ± 83,61	344,10 ± 85,89	337,21 ± 80,98
Controle (Sham)	29,18 ± 12,04 (*)	42,10 ± 12,69 (*)	36,09 ± 12,76 (*)	40,88 ± 16,70 (*)	38,87 ± 21,45 (*)
Livre 30mg/kg	172,20 ± 50,00	139,93 ± 39,09 (*)	131,49 ± 28,36 (*)	160,24 ± 20,60	170,56 ± 37,56
Livre 1g/kg	93,73 ± 71,80 (*)	125,59 ± 64,17 (*)	130,65 ± 21,48 (*)	113,50 ± 76,88 (*)	118,17 ± 87,47 (*)
Agudo 30mg/kg	160,67 ± 27,14 (*)	199,88 ± 39,57 (*)	160,23 ± 31,71 (*)	213,96 ± 36,29 (*)	170,66 ± 36,92 (*)
Agudo 240mg/kg	136,24 ± 63,13 (*)	98,87 ± 47,48 (*)	90,04 ± 37,12 (*)	46,80 ± 30,54 (*)	56,29 ± 29,69 (*)
Sub-Agudo 30mg/kg	117,27 ± 48,87 (*)	126,32 ± 67,75 (*)	125,07 ± 86,67 (*)	129,05 ± 93,19 (*)	147,26 ± 10,93 (*)
Sub-Agudo 240mg/kg	64,28 ± 19,45 (*)	68,20 ± 30,83 (*)	45,08 ± 25,90 (*)	49,45 ± 23,27 (*)	59,36 ± 24,08 (*)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)